

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

TESE DE DOUTORADO

**EFEITOS DE INSULTO HIPÓXICO-ISQUÊMICO NEONATAL EM RESPOSTAS
COMPORTAMENTAIS E BIOQUÍMICAS ANALISADAS EM CURTO, MÉDIO E
LONGO PRAZO EM RATOS.**

Andressa de Souza

Orientadora: Prof. Dra. Iraci Lucena da Silva Torres

Porto Alegre, 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

TESE DE DOUTORADO

**EFEITOS DE INSULTO HIPÓXICO-ISQUÊMICO NEONATAL EM RESPOSTAS
COMPORTAMENTAIS E BIOQUÍMICAS ANALISADAS EM CURTO, MÉDIO E
LONGO PRAZO EM RATOS.**

Autora: Andressa de Souza

Orientadora: Prof. Dra. Iraci Lucena da Silva Torres

Tese apresentada como requisito parcial para
obtenção do título de Doutor em Ciências
Médicas, da Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação
em Medicina: Ciências Médicas.

Porto Alegre, 2013

CIP - Catalogação na Publicação

Souza, Andressa

EFEITOS DE INSULTO HIPÓXICO-ISQUÊMICO NEONATAL EM
RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS E BIOQUÍMICAS ANALISADAS
EM CURTO, MÉDIO E LONGO PRAZO EM RATOS. / Andressa
Souza. -- 2013.
120 f.

Orientadora: Iraci L S Torres.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-
Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto
Alegre, BR-RS, 2013.

1. Hipóxia-isquemia. 2. Nocicepção . 3. C-fos . 4.
Comportamento . 5. Biomarcadores. I. L S Torres,
Iraci, orient. II. Título.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Matheus Roriz

(PPGCM-UFRGS)

Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos

(PPG Neurociências – UFSC)

Prof. Dr. Régis Gemerasca Mestriner

(PUCRS)

Prof. Dr. Rafael Vercelino

(Pos-doutorando PPGCM- UFRGS)

Profa. Dra. Andreia Buffon

(PPGCF - UFRGS)

Suplente

“ Há uma força motriz mais poderosa que o vapor,
a eletricidade e a energia: a vontade.”

Albert Eisnten

Dedicatória

À **Deus**, aos meus **pais**, e a minha
Mestre **Dra. Iraci**, pelo cuidado e carinho.

AGRADECIMENTOS

- À Deus por mais uma vitória. “O homem encontra Deus por trás da cada porta que a ciência consegue abrir.” Albert Einstein.
- Aos meus pais, João Antônio de Souza e Tanis B. de Souza, pelo amor, carinho e dedicação.
- Aos meus irmãos, Ana Cláudia, Ângela e João Antonio, pela união e companheirismo.
- À meu marido, querido Jairo Alberto Dussan-Sarria, companheiro em um dos momentos mais importantes do doutorado, colega e amigo. Obrigada pelo carinho e amor nesse período.
- À Profa. Dra. Iraci L. S. Torres, por ser orientadora e amiga. Obrigada pela oportunidade, paciência e conhecimentos adquiridos no período de doutoramento.
- Aos colegas do Laboratório de Farmacologia da Dor e Neuromodulação: Modelos Animais. Em especial aos amigos: Ana Cláudia de Souza, Carla de Oliveira, Lauren S. Adachi, Liciane Fernandes Medeiros, Paulo Marques, Stefânia Giotti Cioato, Vanessa Leal Scarabelot, agradeço pela ajuda nos experimentos e companheirismo.
- Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre - GPPG-HCPA, pelo apoio financeiro para o desenvolvimento do projeto (10-0285), por dispor da Unidade de Experimentação Animal (UEA) e da Unidade de Análises Moleculares e Proteína (UAMP) onde o trabalho foi desenvolvido com qualidade e segurança.
- A PIBIC CNPq/UFRGS, pelas bolsas dos alunos que participaram deste trabalho.
- A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa concedida, bem como às agências de fomento, Fapergs (Fundação de Amparo à Pesquisa do estado do Rio Grande do Sul) e CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), que contribuíram na realização deste trabalho.

- À PIBIC CNPq/UFRGS pela bolsa de iniciação científica, contribuindo para o aperfeiçoamento de alunos de graduação e incentivo a pesquisa.
- FAPERGS (Pronem) e CNPq (Universal) pelo incentivo com materiais e equipamentos.
- A Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas (PPGCM). Ao querido professor Dr. Wolnei Caumo, coordenador deste PPG. A secretaria do programa, em especial à Vera Suzana Ribeiro e Rodrigo Peçanha.

RESUMO

A hipóxia-isquemia (HI) neonatal é uma causa importante de deficits neurológicos. Estimativas relatam que 3-5 em cada 1.000 nascidos vivos ocorrem encefalopatia neonatal, sendo que, encefalopatia hipóxico-isquêmica (EHI) moderada ou grave acomete 0,5-1/1000 dos nascidos vivos. Aproximadamente 10 a 60% das crianças com EHI morrem, e pelo menos 25% dos que sobrevivem, apresentam deficiência permanente, como paralisia cerebral, epilepsia e dificuldades na aprendizagem. Evidências clínicas e experimentais sugerem que a exposição a estímulos nocivos no início da vida pode resultar em mudanças duradouras no processamento sensorial. Apesar da magnitude do problema, pouco se conhece sobre a modulação da dor e mecanismos envolvidos durante um processo hipóxico-isquêmico em neonatos e suas conseqüências ao longo da vida. Sendo assim, a presente tese objetivou avaliar respostas comportamentais e bioquímicas de filhotes de ratos submetidos à hipóxia/isquemia no 7º dia de vida, avaliados em diferentes idades. Ninhadas de ratos *Wistar* machos foram randomizadas em 6 grupos experimentais: controle, hipóxia-isquemia, isquemia, hipóxia, sham-ischemia, sham-hipóxia. O modelo experimental utilizado foi de HI unilateral descrito por Levine (1960) e adaptado por Rice e colaboradores (1981), realizando-se isquemia através da oclusão da carótida esquerda e hipóxia com câmara hipóxica de 92% de nitrogênio e 8% de oxigênio. Avaliaram-se os animais no 14º (P14), 30º (P30) e 60º (P60) dias de vida. Para avaliação da (s) resposta (s): nociceptiva térmica foram utilizados testes de tail-flick e placa quente; e alodinia mecânica utilizou-se teste de Von Frey eletrônico. Para as avaliações dos biomarcadores foram utilizados kits comerciais de BDNF e TNF por métodos ELISA e LDH por espectrofotometria. A ativação neuronal foi quantificada em lâminas de imunistoquímica de *c-fos* em regiões CA1 e giro dentado de hipocampo bilateral. Foi observado que ratos com hipóxia e/ou isquemia tiveram diminuição irreversível de neurônios com ativação por *c-fos* em área CA1 do hipocampo, região ipsilateral do insulto. Maior sensibilidade em animais com HI em P14 foi observado no teste do Von Frey, mas não foi observada em P30 e P60. Independentemente do grupo experimental, a idade do animal desempenhou um papel significativo na resposta de comportamento nociceptivo, bem como sobre o BDNF e dos níveis séricos de TNF- α , mas não sobre os níveis séricos de LDH. Em conclusão, o insulto cerebral da HI induz uma redução significativa e irreversível sobre a ativação neuronal ipsilateral à lesão, com a evidência de uma alteração da resposta comportamental nociceptiva manifestada no curto, mas não a médio ou longo prazo. Biomarcadores de neuroplasticidade, inflamação e danos celulares apresentaram poucas alterações sobre o insulto cerebral, mas mudanças mais pronunciadas foram observadas com relação à idade.

Palavras-chave: Hipóxia-isquemia, resposta nociceptiva, proteína *c-fos*, LDH, BDNF, TNF- α .

ABSTRACT

Neonatal hypoxia-ischemia (HI) is an important cause of neurological deficits. It is estimated that 3-5 in 1000 newborns suffer neonatal encephalopathy, and moderate or severe hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE) in 0,5-1/1000 of the newborns. Approximately 10 to 60% of the children with HIE die, and at least 25% of the survivors present permanent deficits such as cerebral palsy, epilepsy and learning difficulties. Clinical and experimental evidence suggest that the exposure to noxious stimuli at the beginning of the life might result in long lasting changes in sensorial processing. Despite the magnitude of the problem, few is known regarding pain modulation and its involved mechanisms during the HI process in neonates and its life lasting consequences. Hence, the present thesis aimed to evaluate behavioral and biochemical responses in rats' litters submitted to HI during their seventh day of life, evaluated at different ages. Male Wistar rats' litters were randomized into 6 experimental groups: control, HI, ischemia, hypoxia, sham-ischemia and sham-hypoxia. The experimental model was the one of unilateral HI described by Levine (1960) and adapted by Rice et al (1981), inducing ischemia by occlusion of the left carotid artery, and hypoxia using hypoxic chamber with nitrogen 92% and oxygen 8%. Animals were evaluated in their 14th (P14), 30th(P30) and 60th (P60) postnatal day. To assess the thermal nociceptive response the tail flick and hot plate test were employed; and mechanical allodynia was assessed by means of the digital Von Frey test. To evaluate biomarkers, commercial BDNF and TNF kits with ELISA, and LDH kits with spectrophotometry were used. Neuronal activation was quantified by *c-fos* immunohistochemistry in CA1 and dentate gyrus of bilateral hippocampi. It was observed that rats with hypoxia and/or ischemia had irreversible diminution of neurons with *c-fos* activation in the CA1 area of the hippocampus ipsilateral to the insult. Higher sensitivity in animals with HI at P14 was observed in the Von Frey test, but was not observed at P30 or at P60. Irrespective of the experimental group, animals' age played a significant role in the nociceptive behavioral response, as well as on the BDNF and TNF- α serum levels, but not on the LDH serum levels. In conclusion, cerebral HI insult induces a significant and irreversible reduction on neuronal activation ipsilateral to the insult, with evidence of a significant alteration on the nociceptive behavioral response manifested in the short, but not in the medium or long term. Biomarkers of neuroplasticity, inflammation and cellular damage present few alterations after the cerebral insult, however more pronounced changes were observed related with age.

Keywords: hypoxia-ischemia, nociceptive response, *c-fos* protein, LDH, BDNF, TNF- α .

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figure 1. Vias de transmissão e modulação da dor.....	25
Figura 2. Linha de tempo da nocicepção.....	27

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPA = ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazolpropiónico

BDNF= fator nerotrófico derivado do cérebro (*Brain Derived Neurotrophic Factor*, em inglês)

CA1= Corno de Ammon 1

CGRP = peptídeo relacionado ao gene da calcitonina

EHI = Encefalopatia Hipóxico-isquêmica

HI = hipóxia-isquemia

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

ICV= intracerebroventricular

IL= interleucina

IL1 α = interleucina 1 alfa

IL1 β = interleucina 1 beta

IL 2 = interleucina 2

IL 4 = interleucina 4

IL 6 = interleucina 6

IL10 = interleucina 10

IL13 = interleucina 13

O₂ = oxigênio

P0 = dia do nascimento

P7= 7º dia pós-natal

P10 = 10º dia pós-natal

P14 = 14º dia pós-natal

P21 = 21º dia pós-natal

P30 = 30º dia pós-natal

RN = recém-nascido

RNs = recém-nascidos

SCP = substância cinzenta periaquedutal

SN = sistema nervoso

SNC = sistema nervoso central

TNF= fator de necrose tumoral (*Tumor Necrosis Factor*, em inglês)

TNF α = fator de necrose tumoral alfa (*Tumor Necrosis Factor alfa*, em inglês)

trkB= tirosina cinase B (*tyrosine kinase B*, em inglês)

UTIN = Unidades de Terapia Intensiva Neonatal

VIP = peptídeo intestinal vasoativo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1. HIPÓXIA-ISQUEMIA	19
2.2. DOR	21
2.2.1. Definição de Dor	21
2.2.2. Transmissão do estímulo nociceptivo	22
2.2.3. Modulação da Dor	24
2.3. CITOCINAS	28
2.4. FATOR NEUROTROFICO DERIVADO DO CÉREBRO (BDNF)	30
2.5. ENZIMA LACTATO DESIDROGENASE (LDH)	31
2.6. PROTEÍNA <i>c-FOS</i>	33
3. OBJETIVOS	35
3.1. OBJETIVO GERAL	36
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
4. REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA	37
5. ARTIGO CIENTÍFICO	52
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	94
7. ANEXOS	97

1. INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

Estimativas relatam que 3-5 em cada 1.000 nascidos vivos ocorrem encefalopatia neonatal, sendo que, encefalopatia hipóxico-isquêmica (EHI) moderada ou grave em 0,5-1/1000 nascidos vivos (Jacobs *et al.*, 2013). Apesar dos avanços na terapia intensiva neonatal, aproximadamente 10 a 60% das crianças com EHI morrem, e pelo menos 25% dos que sobrevivem, apresentam comprometimento neurológico ao longo da vida, com ocorrências comuns de dificuldades de aprendizagem, epilepsia e paralisia cerebral (Jacobs *et al.*, 2013; Fang *et al.*, 2013).

Evidências clínicas e experimentais sugerem que a exposição a estímulos nocivos no início da vida podem resultar em mudanças duradouras no processamento sensorial (Laprairie & Murphy, 2007; Ren *et al.*, 2004; Grunau *et al.*, 1994a). Em recém-nascidos prematuros, uma maior frequência de procedimentos invasivos é associada a um aumento significativo nas respostas à dor em até 32 semanas de idade (Grunau *et al.*, 2001). As alterações na nocicepção não são de natureza transitória, de modo que recém-nascidos a termo ou prematuros com experiência prévia em UTIN (Unidade de Terapia Intensiva Neonatal) apresentam diminuição na sensibilidade à dor até os 14 anos de idade (Hermann *et al.*, 2006). Apesar da magnitude do problema, pouco se conhece sobre a modulação de dores agudas no período neonatal, como as que cursam durante o processo hipóxico-isquêmico, e suas consequências ao longo da vida.

Historicamente, acreditava-se que os recém-nascidos não sentiam dor, porém, nas últimas décadas este conceito tem mudado. Pesquisas recentes têm abordado e aumentado o conhecimento sobre os mecanismos da dor nesta faixa etária e sugerem que estes pacientes não somente experimentam dor e estresse da mesma maneira que crianças de maior idade e

adultos, mas que suas respostas à estimulação dolorosa podem comprometer sua condição clínica e fisiológica (Miura & Procianoy, 1997). Vários fatores dificultam a avaliação da dor em pacientes pediátricos, como vocabulário reduzido, pouca experiência com eventos dolorosos, limitada expressão comportamental e habilidade em entender as questões relativas à dor. Além de poucos estudos científicos relacionados à fisiologia da dor e ao comportamento de pacientes pediátricos.

Além disso, ferramentas que busquem auxiliar no prognóstico precoce de lesão ou no manejo desses pacientes que sofrem o insulto hipóxico-isquêmico se fazem necessárias, dentre elas, podemos citar o uso de biomarcadores periféricos, como BDNF (fator neurotrófico derivado do cérebro), citocinas, como o TNF- α (Fator de necrose tumoral alfa), e LDH (lactato desidrogenase) como marcador de dano celular.

O entendimento de todo o processo fisiopatológico da HI (hipóxia-isquemia) reveste-se de importância visto sua necessidade para compreensão de mecanismos compensatórios utilizados pelo organismo. Como alternativa é possível, utilizando modelos animais, investigar processos intracelulares centrais, como, com a investigação de ativação da proteína *c-fos* em hipocampo de ratos com EHI proposta neste trabalho.

A *c-fos* é um marcador indireto da atividade neuronal, tendo sua expressão aumentada quando potenciais de ação são desencadeados (VanElzakker *et al.*, 2008; Dragunow & Faull, 1989). Além disso, tem sido utilizada para o mapeamento funcional das áreas cerebrais ativadas em processos que afetam o Sistema Nervoso Central (SNC) (Sagar *et al.*, 1988, Sharp *et al.*, 1993) como por exemplo o estímulo nociceptivo (Bullit, 1990).

Considerando a alta incidência do evento hipóxico-isquêmico no período neonatal e escassez de estudos que abordem suas consequências em curto, médio e longo prazos, e mecanismos que possibilitem novas terapêuticas, pesquisas nesta área devem ser estimuladas. É importante salientar dentre os estudos que abordam as consequências de EHI poucos

trabalhos avaliam a resposta nociceptiva a este evento no período neonatal e suas consequências ao longo da vida. Desta forma, a avaliação de processos fisiopatológicos de um evento hipóxico-isquêmico a curto, médio e longo prazo, utilizando um modelo animal, permite avaliar a extensão do dano causado ao sistema nervoso e suas consequências ao longo da vida, assim como, o estudo de possíveis mecanismos envolvidos neste processo.

Esta tese de doutorado objetivou trazer contribuições para o aprimoramento dos conhecimentos pertinentes à área de dor em indivíduos de menor idade, bem como investigar os biomarcadores e processos intracelulares envolvidos na EHI. Nesse contexto, é importante a realização de estudos em modelos animais focados em sistemas envolvidos nos mecanismos de dor, pois podem ser muito úteis para o estabelecimento dos mecanismos adaptativos à lesões e de alterações neuroquímicas decorrentes da exposição a evento hipóxico/isquêmico neonatal.

2. REVISÃO DA LITERATURA

1. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. HIPÓXIA-ISQUEMIA

Em países desenvolvidos a prevalência de lesão cerebral fetal e neonatal é aproximadamente 3-5/1000 nascidos (Jacobs *et al.*, 2013); podendo ocorrer em consequência de infecções, parto prematuro, complicações obstétricas, doenças metabólicas ou genéticas, e epilepsia materna (Hermansen & Lorah, 2007; Bartha *et al.*, 2007; Jensen, 2006; Volpe, 2001). Os danos cerebrais decorrentes destes eventos podem resultar em prejuízo na atividade locomotora, convulsões, paralisia cerebral, epilepsia, alterações cognitivas e no comportamento alimentar, etc (Volpe, 2008; van Handel *et al.*, 2007; Silveira *et al.*, 2004; Arteni *et al.*, 2003; Low, 1993).

A HI é condição patológica que se estabelece quando o suprimento de oxigênio (O₂) ao tecido cerebral é insuficiente para a sua demanda metabólica. Isto pode ocorrer em decorrência da hipoxemia, de uma perfusão sanguínea tecidual insuficiente (isquemia) ou por uma combinação destes fatores – hipóxia-isquemia. Em humanos, acredita-se que a HI possa ser iniciada por um evento hipóxico, o qual causa hipotensão que leva à ocorrência de isquemia cerebral (Hankins & Speer, 2003). Apesar do incremento, em países mais desenvolvidos, nos métodos de diagnóstico e nas condições médico-hospitalares, ainda há poucos recursos no tratamento da HI (Volpe, 2008; Hamrick & Ferriero, 2003; Berger *et al.*, 2002).

O modelo experimental mais utilizado para o estudo da HI é o descrito por Levine (1960), e modificado por Rice et al, (1981) para ser usado em ratos neonatos. Este modelo utiliza ratos no 7º dia pós-natal (P7) e combina hipóxia sistêmica com a isquemia cerebral

unilateral. A isquemia só se torna significativa, em termos circulatórios, quando a hipóxia é instaurada, mimetizando a fisiopatologia humana. O P7 é o período de maturidade cerebral do rato que mais se assemelha ao de um bebê humano nascido a termo (Marsh *et al.*, 1997). Estudos realizados em humanos demonstram que neonatos prematuros apresentam maior incidência e diferente vulnerabilidade à HI, com ocorrência de danos cerebrais predominantemente na substância branca profunda; por outro lado, em neonatos nascidos a termo os danos ocorrem com mais frequência nas regiões neocortical e subcortical (Volpe, 2008). Diferentemente da patologia humana, naquele modelo animal o dano cerebral causado pela HI atinge apenas o hemisfério ipsilateral à isquemia carotídea de forma significativa, sendo o hipocampo, o estriado e o córtex parieto-temporal as estruturas mais atingidas (Vannucci & Vannucci, 1997; Rice *et al.*, 1981). Porém, provavelmente devido a este fato, o modelo possui a vantagem de permitir uma longa sobrevivência dos animais (Vannucci & Vannucci, 1997; Hagberg *et al.*, 1997).

Os mecanismos celulares do dano HI têm sido bastante estudados. Estes envolvem principalmente excitotoxicidade, alterações no potencial de membrana, aumento intracelular de cálcio, geração de radicais livres e indução de apoptose (Berge & Garnier, 1999). Resumidamente, com o insuficiente fornecimento de O₂, os processos celulares dependentes de energia como a manutenção do gradiente iônico da membrana celular e a recaptção de neurotransmissores são interrompidos. Como consequência, ocorre aumento da concentração de neurotransmissores excitatórios na fenda sináptica (excitotoxicidade), aumento excessivo do cálcio livre intracelular, ativação excessiva de enzimas dependentes de cálcio (proteases, lipases, endonucleases) e geração de radicais livres. Estes últimos agravam demasiadamente o dano que culmina em morte celular por necrose (fases iniciais) ou por apoptose (períodos prolongados após o evento HI) (Kaur & Ling, 2009; Volpe, 2008). Além de investigar alterações de mecanismos celulares induzidos pela HI, diversos estudos têm sido realizados

avaliando parâmetros comportamentais em longo prazo, como prejuízos na memória espacial de curto e longo prazo (Pereira *et al.*, 2007; Arteni *et al.*, 2003; Ikeda *et al.*, 2001; Balduini *et al.*, 2000), na memória aversiva (Arteni *et al.*, 2003) e em tarefas sensoriomotoras (Bona *et al.*, 1997; Jansen & Low, 1996).

2.2. DOR

2.2.1. Definição de Dor

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

A dor pode ser classificada: temporalmente, em aguda ou crônica; etiologicamente, maligna ou não maligna; e mesmo fisiologicamente, nociceptiva, inflamatória ou neuropática. A dor aguda esta frequentemente associada a lesão ou trauma, responde a terapia analgésica clássica, e ocorre em tempo menor que 3 meses (Barkin & Barkin, 2001). Geralmente exerce uma função de proteção essencial, associando estímulos nocivos potencialmente prejudiciais, com uma sensação desagradável (Woolf, 2004).

A dor crônica ocorre quando persiste além do estágio de proteção da região lesada, segundo a IASP, a dor que persiste mais que três meses, tendo como base a experiência médica para classificar a dor crônica, considerando este como o ponto mais conveniente de transição da dor aguda à dor crônica não maligna (Merskey & Bogduk, 1994). A dor crônica é

reconhecida internacionalmente como um problema de saúde que apresenta considerável impacto individual, social e econômico (Ng *et al.*, 2002; Siddall *et al.*, 2004). Adicionalmente, pacientes com dor crônica normalmente apresentam menor qualidade de vida, escores menores em escalas que avaliam o bem-estar, e maior uso de serviços de saúde (Becker *et al.*, 1997).

Importante destacar que a dor apresenta dois componentes: reatividade à dor e nocicepção. Sendo a nocicepção, o processo neurobiológico pelo quais estímulos nocivos são codificados como impulsos neurais e enviados para o cérebro onde são decodificados de acordo com as propriedades dos estímulos (térmico, mecânico, químico) (Chapman & Nakamura, 1999).

2.2.2. Transmissão do estímulo nociceptivo

A nocicepção consiste ou resulta de estímulos de origem térmica, mecânica e química que são detectados por uma subpopulação de fibras nervosas periféricas chamadas nociceptores (Basbaum & Jessell, 2000). Estes nociceptores estão localizados nas terminações nervosas livres, com o seu corpo celular localizado nos gânglios da raiz dorsal e nos gânglios do trigêmeo. Os nociceptores que detectam estímulos térmicos são ativados por temperaturas moderadamente elevadas ($>45^{\circ}\text{C}$ ou $<5^{\circ}\text{C}$) e os mecânicos são ativados por pressão aplicada na pele, são constituídas por fibras cutâneas mielinizadas (tipo $A\delta$) com velocidade de condução em torno de 5-30 m/s (condução rápida). Enquanto que os nociceptores polimodais, ativados por estímulos químicos, térmicos ou mecânicos, são constituídos por fibras não mielinizadas (tipo C) com velocidade de condução em torno de 1,0 m/s (condução lenta). A diferença de velocidade de condução explica a dupla sensação da dor, onde a primeira dor percebida é aguda transmitida por fibras $A\delta$ com alta velocidade de condução de estímulo, e a segunda é uma dor difusa lenta transmitida pelas fibras C com baixa velocidade de condução.

Os nociceptores ou neurônios de 1ª ordem terminam suas projeções no corno dorsal da medula espinal em diferentes lâminas organizadas anatômica e eletrofisiologicamente (Basbaum & Jessell, 2000) onde fazem conexões com os neurônios de 2ª ordem e interneurônios inibitórios. Por exemplo, os nociceptores do tipo A δ apresentam projeções até laminas I e V, enquanto que os do tipo C até laminas I e II (para revisão ver, Basbaum *et al.*, 2009). A comunicação entre os neurônios de 1ª e 2ª ordem ocorre por meio de sinapse química, ou seja, é mediada por neurotransmissores, como o glutamato, substância P e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP). O glutamato promove potenciais excitatórios pós-sinápticos rápidos, através da ativação de receptores AMPA (ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico), já os potenciais lentos são induzidos por meio da liberação de peptídeos como substância P e CGRP (Menescal-de-Oliveira, 2008).

Os tratos espinotalâmico, espinoreticular, espinomesencefálico e espinohipotalâmico conduzem a informação através da medula espinal até centros superiores. O trato espinotalâmico é a via nociceptiva ascendente mais proeminente na medula espinal, onde os axônios cruzam a linha média ao nível da comissura anterior e chegam até o tálamo. É subdividido em duas vias: a) Via neoespinotalâmica: projeta-se no núcleo póstero-lateral do tálamo, de onde partem projeções para o córtex somatossensorial primário, onde ocorre a percepção da dor; este trato é relacionado com aspectos discriminativos da dor (localização, intensidade e duração) (Loeser *et al.*, 2001); b) Via paleoespinotalâmica: a partir da medula projeta-se para o tálamo medial e posteriormente para o córtex cerebral de ambos os hemisférios; perde-se a somatotopia do estímulo (Ferreira, 2004).

O tálamo e a estrutura responsável pela integração dos impulsos nociceptivos e envia projeções até o córtex através de neurônios de 3ª ordem (De Marco & Pascoe, 2008). O córtex é essencial para determinar aspectos discriminativos como localização, intensidade, duração e

natureza do estímulo nocivo, e aspectos afetivo-cognitivos como emoção, percepção, aprendizado e memória (Craig & Dostrovsky, 1999; Sherman & Guillery, 1996).

2.2.3. Modulação da Dor

O estímulo nociceptivo está sujeito à modulação tanto nas vias ascendentes da dor, quanto a partir de centros superiores. O sitio inicial da modulação ocorre em nível espinal, onde a estimulação mecânica de fibras aferentes de maior diâmetro como fibras A β favorecem a ativação de interneurônios inibitórios e estes diminuem a excitação dos neurônios aferentes primários e inibem a neurotransmissão nociceptiva para os neurônios de 2ª ordem (Giordano, 2005; Westlund, 2005).

Estruturas supraespinais como a substância cinzenta periaquedutal (SCP), a formação reticular e o núcleo magno da rafe participam do sistema inibitório descendente (Menescal-de-Oliveira, 2008) e atuam nas terminações pré-sinápticas de aferentes primários diminuindo a liberação de neurotransmissores excitatórios; nas terminações pós-sinápticas de neurônios de 2ª ordem reduz a excitabilidade; e também em interneurônios (Fields, 1991) (Figura 1).

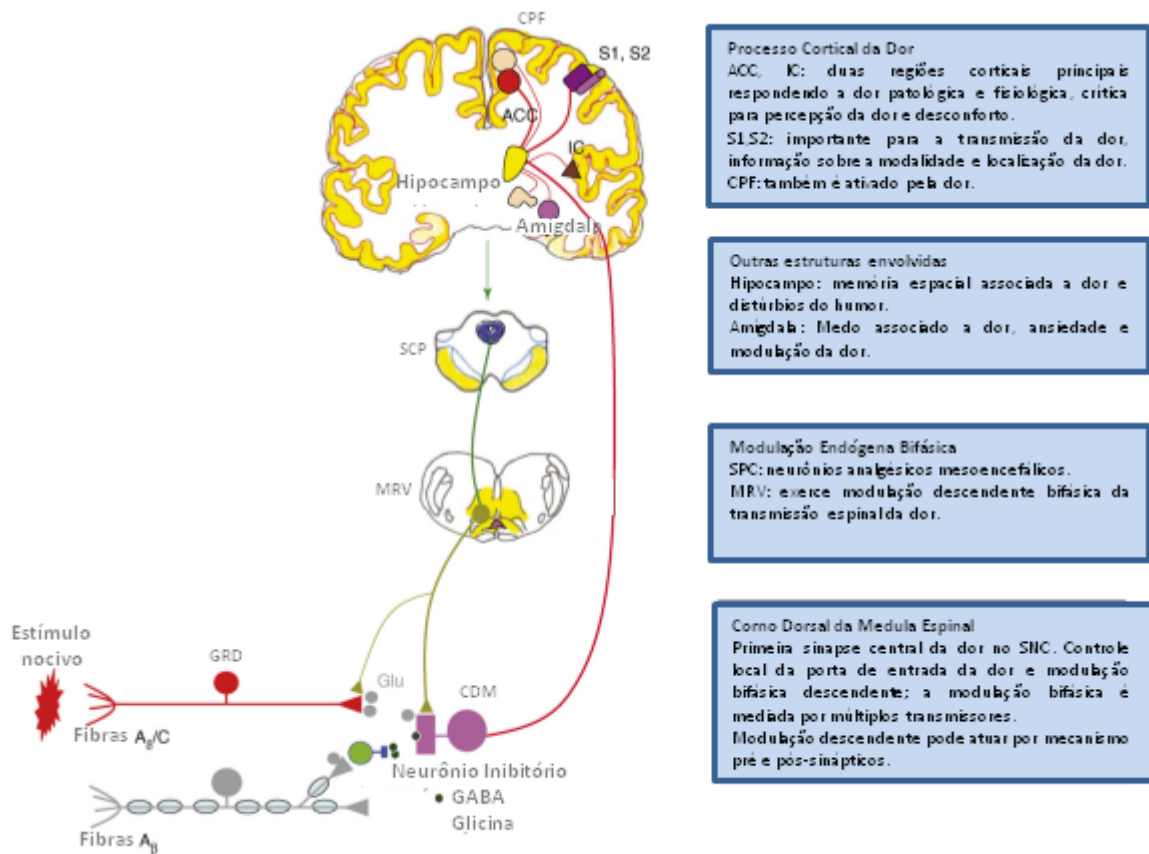


Figure 1. Vias de transmissão e modulação da dor. CPF (córtex pré-frontal), S1 (córtex primário somatosensorial), S2 (córtex secundário somatosensorial), ACC (córtex cingulado anterior), IC (córtex insular), SCP (substância cinzenta periaquidutal), MRV (medula rostroventral), CDM (corno dorsal da medula espinal), GRD (gânglio da raiz dorsal) (Adaptado de Zhuo, 2008).

2.2.4. Maturação do Sistema Nociceptivo

Os componentes do sistema nervoso (SN) necessários para a transmissão do estímulo doloroso ao córtex cerebral estão presentes em recém-nascidos (RN) prematuros e a termo, no entanto a maturação e a organização desse sistema neurosensorial continua durante a vida pós-natal (Falcon *et al.*, 1996; Guinsburg *et al.*, 2000).

O sistema nociceptivo inicia seu desenvolvimento durante os 2º e 3º trimestres de gestação, e sua maturação ocorre durante os dois primeiros anos de vida (Anand, 1987). O desenvolvimento de vários tipos celulares neuronais, o estabelecimento de conexões interneuronais e a expressão de neurotransmissores começam antes da 13ª semana de gestação e se completam entre 30ª a 32ª semanas de gestação. Os neurotransmissores, como substância P, CRGP e somatostatina, são produzidos na medula espinal entre 8ª a 10ª semanas em feto humano. Glutamato e peptídeo intestinal vasoativo (VIP) começam a ser expressos em torno da 12ª a 16ª semana de gestação (Deshpande & Anand, 1996). As aferências nociceptivas estão completamente mielinizadas na 30ª semana de gestação (Kostovic & Rakic, 1990), e as fibras talamocorticais, na 37ª semana sendo de fundamental importância para a percepção cortical da dor (Deshpande & Anand, 1996).

A densidade e as propriedades neurofisiológicas dos nociceptores no neonato são semelhantes às do adulto (Deshpande & Anand, 1996), no entanto as vias inibitórias estão em desenvolvimento no período pós-natal (revisado por Berde & Sethna, 2002). Especificamente em ratos, o sistema inibitório descendente não está totalmente funcional até três semanas após o nascimento (Boucher *et al.*, 1998; van Praag & Frenk, 1991). A estimulação da SCP não produz analgesia até P21 (21º dia de vida), o que indica que a inibição descendente tem pouco impacto no corno dorsal neonatal (van Praag & Frenk, 1991). As fibras noradrenérgicas parecem estar funcionalmente ativas antes das serotoninérgicas, uma vez que, a administração de agonistas α -2-seletivos reverte a hiperalgesia inflamatória em todas as idades do período pós-natal de ratos (Fitzgerald, 2005).

O desenvolvimento neurológico de ratos recém-nascidos se assemelha a um feto humano de 24 semanas de gestação (Dobbing & Sands, 1979; Andrews & Fitzgerald, 1997; Marsh *et al.*, 1997); quando completam uma semana de vida equivalem a um humano RN a

termo, e com três semanas equivalem a uma criança de um ano de idade (Fitzgerald & Anand, 1993) (Figura 2).

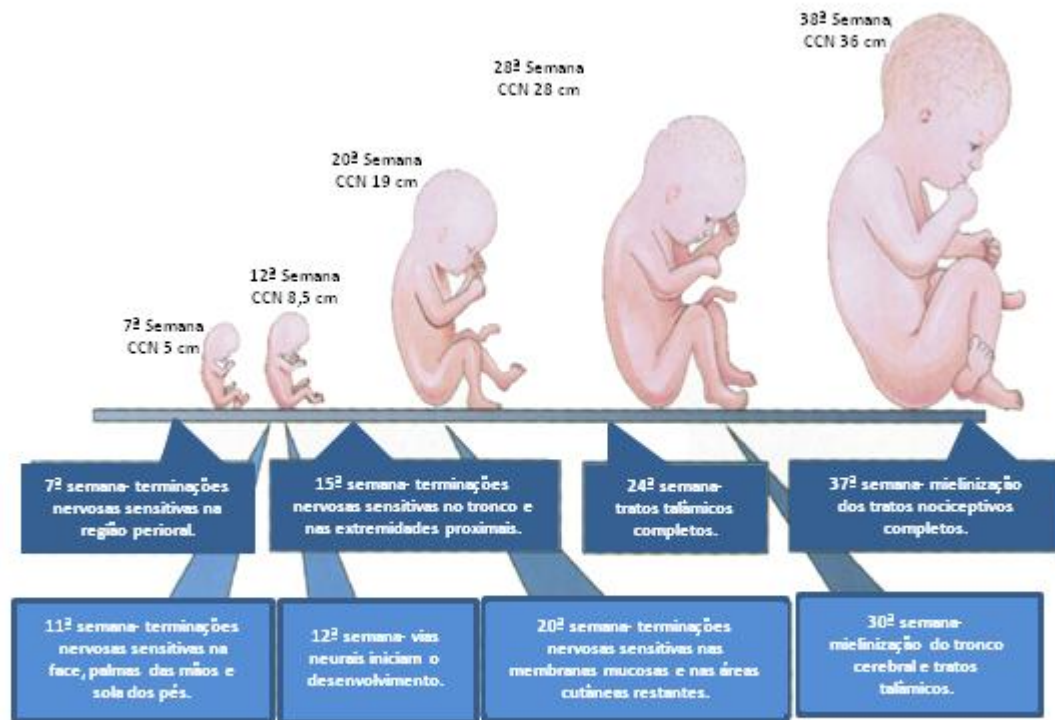


Figura 2. Linha de tempo da nociceção. CCN (comprimento cabeça-nádega) (Adaptado de Moore & Persuad, 1998).

Adicionalmente, as fibras do tipo C estão totalmente funcionantes no primeiro dia pós-natal, enquanto que as fibras do tipo A δ necessitam de um longo período pós-natal para adquirir sua completa funcionalidade (para revisão ver Fitzgerald, 2005). Além disso, o limiar de retirada ao calor é menor em animais jovens, e a resposta de ratos neonatos ao teste da formalina é mais pronunciada em relação aos ratos avaliados após 21º dia pós-natal (Falcon *et al.*, 1996; Teng & Abbott, 1998). Até o P10 (10º dia pós-natal), o comportamento em relação à formalina injetada na pata é considerado um movimento não específico; e a resposta bifásica

clássica desencadeada pela formalina parece estar envolvida com o completo desenvolvimento do sistema descendente inibitório (Guy & Abbott, 1992).

As memórias para eventos precoces podem não estar acessíveis por meio de memória explícita (consciente), mas, provavelmente, se incorporam à memória implícita (condicionamento) que é codificada por mudanças estruturais ou funcionais dentro do sistema de dor e mapas neurais (Grunau *et al.*, 2000). Estudos demonstram que a exposição de RNs a estímulos nocivos pode resultar em alterações comportamentais e nociceptivas na idade adulta (Anand *et al.*, 1999; Bhutta *et al.*, 2001; Anseloni *et al.*, 2005), bem como apresentar aumento ou diminuição da sensibilidade aos estímulos nociceptivos na idade adulta, dependendo do tipo e duração do estímulo (Ruda *et al.*, 2000; Lin & Al-Chaer, 2003; Wang *et al.*, 2004; Hohmann *et al.*, 2005; Randich *et al.*, 2006). Tem sido relatado que processos como ansiedade, depressão e esquizofrenia presentes na vida adulta podem ser decorrentes da exposição a processos dolorosos na infância (Reichert *et al.*, 2000).

2.3. CITOCINAS

Estudo das alterações cerebrais fisiológicas ou patológicas, especialmente *in vivo* tem sido um permanente estímulo para a busca de marcadores periféricos que possam refletir como o cérebro reage aos mais variados estímulos (Busnello *et al.*, 2008).

As proteínas imunomoduladoras, denominadas citocinas, têm uma ampla variedade de atividades biológicas, por exemplo, as principais citocinas pró-inflamatórias são a IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-6 e TNF- α . Os achados sugerem efeitos principalmente algícos para estas citocinas, promovendo a manutenção da dor, e as citocinas anti-inflamatórias IL-4, IL-10, e IL-13 têm função analgésica (Üçeyler *et al.*, 2009). As citocinas afetam funções do sistema

nervoso central por meio de mecanismos autonômicos, neuroendócrinos e comportamentais (Webster *et al.*, 2002).

O factor de necrose tumoral, do inglês *Tumour necrosis factor* (TNF), é uma citocina próinflamatória, inicialmente descrita como um factor de necrose na inflamação periférica, o qual induziu a morte celular em linhagens de células de tumores transplantados *in vitro* e *in vivo* (Carswell *et al.*, 1975). No cérebro, TNF é sintetizada e liberada pelos astrócitos (Lieberman *et al.*, 1989), microglia (Cacci *et al.*, 2005) e os neurônios (Kogo *et al.*, 2006; Tchelingirian *et al.*, 1996), e suas variadas e complexas funções estão atualmente sob intensa investigação. Estudos têm demonstrado que esta citocina pode estar envolvida em uma multiplicidade de processos fisiológicos, tais como proliferação e diferenciação celular (Jelinek & Lipsky, 1987; Murphy *et al.*, 1988), transcrição gênica (Collins *et al.*, 1986; Grilli *et al.*, 1993) e regulação de substâncias endógenas neuroprotetoras (Wilde *et al.*, 2000; Ginis *et al.*, 2002). Há evidências mostrando que o TNF- α pode estar aumentado em alguns transtornos neurológicos, incluindo a Doença de Alzheimer, Doença de Parkinson, isquemia, esclerose múltipla e traumatismo crânio-encefálico (Bessler *et al.*, 1999; Goodman *et al.*, 1990; Hofman *et al.*, 1989; Liu *et al.*, 1994; Musumeci *et al.*, 2011), entre outros. Também tem sido descrito que a expressão central de TNF- α pode regular a sinalização e a plasticidade sináptica induzindo a mudanças estruturais em nível sináptico (Pickering *et al.*, 2005; Pickering & O'Connor, 2007).

Quando encontramos baixos níveis de oxigênio no tecido, caracterizando hipoxia, são desencadeadas alterações fisiológicas e alterações em mecanismos de homeostase celular intrínsecas (Ikeda, 2005). Até o momento, grande parte das pesquisas tem se concentrado na adaptação celular, incluindo alterações na expressão de genes envolvendo fatores de transcrição (Ratan *et al.*, 2007). Além disto, a hipóxia é uma ocorrência tanto aguda quanto crônica de inflamação na região afetada induzindo liberação de mediadores inflamatórios, por

exemplo, TNF- α em suínos (Tam *et al.*, 2007), em seres humanos (Ryan *et al.*, 2006) e em ratos (Savransky *et al.*, 2007) e de radicais livres (Row *et al.*, 2003; Zhan *et al.*, 2005). Os níveis de TNF- α podem permanecer elevados no tecido cerebral afetado durante pelo menos 24 horas após um insulto isquêmico (Liu *et al.*, 1994; Bullock *et al.*, 1995).

Tem sido demonstrado que o TNF tem um papel importante nos eventos de hipóxia e isquemia (O'Connor, 2013), atuando como mediador neuroinflamatório e estando envolvido em vários processos do SNC. Suas cascatas de sinalização podem dar origem a vários efeitos sobre a transmissão sináptica e o processo de plasticidade neuronal (Pickering *et al.*, 2005; Pickering & O'Connor, 2007).

2.4. FATOR NEUROTRÓFICO DERIVADO DO CÉREBRO (BDNF)

O fator neurotrófico derivado do cérebro (do inglês *Brain Derived Neurotrophic Factor* - *BDNF*) é uma neurotrofina, inicialmente isolada a partir de cérebro de porcos por Barde no laboratório Hans Thoenen (Barde *et al.*, 1982). Estudos com camundongos geneticamente modificados revelaram um papel fundamental do BDNF durante o desenvolvimento de alguns neurônios sensoriais (Hellard *et al.*, 2004).

Existem também evidências de que o BDNF atua como modulador central da dor e em condições inflamatórias, sua expressão é regulada periféricamente. A ativação de nociceptores centrais libera o BDNF que, através de receptores trkB pós-sinápticos desencadeia cascatas de sinalização intracelulares favorecendo fenômenos de sensibilização central (Pezet & McMahon, 2006).

Os fatores neurotróficos constituem um grupo heterogêneo de peptídeos que participam dos processos de comunicação celular (Zheng *et al.*, 2012). O BDNF em particular é capaz de induzir a plasticidade e regeneração neuronal, estimular a sobrevivência dos

neurônios e/ou retardar a morte celular (Park & Poo, 2013). É capaz de atravessar bidirecionalmente a barreira hemato encefálica, sendo assim parte do BDNF sanguíneo origina-se de células do sistema nervoso central, podendo também contribuir com o processo de neuroplasticidade periférica (Zagrebelsky & Korte, 2013). Estudo demonstrou que 75% do nível sanguíneo de BDNF representam o nível central, podendo ser considerado um bom biomarcador para eventos do SNC (Rasmussen *et al.*, 2009).

As neurotrofinas podem proteger os neurônios responsivos contra a morte celular em alguns paradigmas de lesões cerebrais (Cheng *et al.*, 1997). Embora o papel do BDNF na hipóxia-isquemia neonatal não seja claro, evidências sugerem que o BDNF pode ter efeitos no desenvolvimento do cérebro o que não ocorre em adultos. Cheng e colaboradores (1997) demonstraram que uma única injeção intracerebroventricular (ICV) de BDNF resultou na fosforilação rápida e robusta de receptores trk em várias regiões do cérebro de rato com 7 dias pós-natal (P7). Também mostraram que o BDNF protegeu contra 90% de perda de tecido devido a hipóxia-isquemia, quando administrado imediatamente antes do insulto e contra 50% de perda de tecido quando administrado após o insulto. Em contraste, a injeção ICV de BDNF no P21 e em ratos adultos resultou em pouca fosforilação de trk e menor proteção contra a lesão hipóxico-isquêmica unilateral no P21.

O BDNF tem um papel importante nos mecanismos de adaptação neuronal tanto no desenvolvimento do sistema nervoso, como nas situações de estresse e dano. No entanto, os mecanismos moleculares envolvidos nos processos da neuroplasticidade e suas manifestações comportamentais na nocicepção após um insulto hipóxico e/ou isquêmico ainda precisam ser estudados mais detalhadamente.

2.5. ENZIMA LACTATO DESIDROGENASE (LDH)

Muitas vezes a EHI apresenta sintomas sutis, o que dificulta fazer um diagnóstico precoce (Lindstrom *et al.*, 2008; Lawn *et al.*, 2005; Peliowski *et al.*, 1992). Um importante mecanismo de defesa endógeno de um neonato exposto a hipoxia-isquemia (HI) baseia-se na capacidade de direcionar o débito cardíaco para os órgãos priorizados como o cérebro, coração e suprarrenais, promovendo assim uma consequente disfunção múltipla dos órgãos (Jensen *et al.*, 2005). Além disso, as células lesadas promovem o extravazamento de enzimas intracelulares, algumas das quais é possível mensurar seus níveis periféricos, como por exemplo, a lactato desidrogenase (LDH) (Karlsson *et al.*, 2010). Os níveis aumentados desta enzima têm sido relatados após asfixia neonatal (Karlsson *et al.*, 2006; Lackmann *et al.*, 1993; Zanardo *et al.*, 1985). O aumento substancial da LDH, (Karlsson *et al.*, 2006; Gibson & Dudley, 1984; Lackmann & Tollner, 1995; Seeto *et al.*, 2000), imediatamente após o nascimento, pode ser resultado de dano de órgãos por falta de oxigênio (Lackmann *et al.*, 1993; Lackmann & Tollner, 1995) e suas diferentes taxas de diminuição no plasma (5-36 h) (Reichling & Kaplan, 1988), podem fazer dessa enzima um potencial preditor de gravidade da lesão hipóxico-isquêmica.

Ensaio clínico randomizado, realizado por Karlsson e colaboradores (2010) objetivou investigar se a LDH plasmático avaliado nas primeiras 12 h após o nascimento poderia prever o EHI e as consequências lesivas ao para o neurodesenvolvimento de recém-nascidos, com sinais de sofrimento fetal no parto. Foi observado que LDH com ponto de corte de 1049 U/L é um bom preditor para EHI, apresentando 100% de sensibilidade e 98% de especificidade, avaliados por meio de curvas ROC. Este resultado é interessante, pois o LDH pode ser um potencial marcador de prognóstico de baixo custo e seguro.

Um estudo retrospectivo recente descrito por Thoresen e colaboradores (2012), sugere que a LDH pode ser um biomarcador para detecção de HI no seguimento dos pacientes tratados com hipotermia. Os resultados mostram que a LDH apresenta um alto valor preditivo

negativo para o tratamento de HI com o uso desta técnica, ou seja, quando foram observadas reduções de LDH houve melhora do quadro clínico. No entanto, como este é um estudo retrospectivo, há necessidade de validação com estudos prospectivos.

Além do exposto acima não há mais estudos mostrando evidências do envolvimento da enzima LDH em EHI a médio e longo prazo, demonstrando a relevância de se investigar possíveis alterações e oscilações desta enzima no curso desta encefalopatia e ao longo da vida.

2.6. PROTEÍNA *c-FOS*

A *c-fos* é uma proteína que está envolvida em importantes eventos celulares, incluindo a proliferação, diferenciação e sobrevivência celular, indução de genes associados a hipóxia, e angiogênese (Tulchinsky, 2000). Esta proteína é considerada um marcador indireto da atividade neuronal porque é expressa quando são desencadeados potenciais de ação neuronais (VanElzakker *et al.*, 2008; Dragunow & Faull, 1989). Um aumento de mRNA de *c-fos* neuronal indica atividade recente (Day *et al.*, 2008).

A detecção de *c-fos* tem sido amplamente utilizada para o mapeamento funcional de áreas cerebrais ativadas em processos que afetam o SNC (Sagar *et al.*, 1988, Sharp *et al.*, 1993) como por exemplo o estímulo nociceptivo (Bullit, 1990).

Lehner e colaboradores (2006) realizaram um estudo explorando vias anatômicas e neuroquímicas envolvidas em diferentes respostas a estímulo aversivo. Foram avaliadas respostas neuroquímicas e comportamentais a estímulo doloroso agudo, um choque elétrico, os animais foram randomizados conforme a resposta obtida: ratos com alta sensibilidade, média sensibilidade e baixa sensibilidade. Os animais com alta sensibilidade mostraram um aumento em células positivas para *c-fos* no núcleo basolateral e médio da amígdala, e em área CA1 do hipocampo. Por outro lado, em animais com baixa sensibilidade, o maior aumento de

células positivas para *c-fos* foi observada no córtex pré-frontal, no hipotálamo e no giro denteado do hipocampo. No núcleo mediano da rafe, a densidade da coloração positiva *c-fos* foi significativamente reforçada no grupo de baixa sensibilidade comparado ao grupo alta sensibilidade.

Estes dados, obtidos por Lehner e colaboradores (2006), confirmam estudos prévios que indicam o envolvimento dos núcleos da amígdala, sub-regiões do hipocampo, hipotálamo, e córtex pré-frontal, no processamento de estímulos condicionados relacionados ao contexto aversivo (Salomé *et al.*, 2004; Spencer *et al.*, 2004; Strelakova *et al.*, 2003).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi avaliar respostas nociceptivas, parâmetros bioquímicos periféricos e morfológicos centrais de filhotes de ratos submetidos à hipóxia/isquemia no 7º dia de vida, avaliados em diferentes idades.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Ratos neonatos submetidos à hipóxia/isquemia no P7 foram avaliados em P14, P30 e P60, quanto aos seguintes parâmetros:

- a) resposta nociceptiva térmica utilizando o teste do tail-flick e o teste da placa quente (hot plate);
- b) alodinia mecânica utilizando o Von Frey eletrônico;
- c) neurotrofinas utilizando níveis de BDNF em soro;
- d) citocinas pró-inflamatórias utilizando o TNF em soro;
- e) dano celular utilizando medida de LDH em soro.
- f) ativação de neuronal de *c-fos* em regiões CA1 e giro denteado de hipocampo bilateral.

4. REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA

REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA

Anand KJ, Hickey PR (1987), Pain and its effects in the human neonate and fetus. *N Engl J Med* 317:1321–1329.

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

Anand KJ, Coskun V, Thirivikraman KV, Nemeroff CB, Plotsky PM. (1999). Long-term behavioral effects of repetitive pain in neonatal rat pups. *Physiol Behav* 66:627-37.

Andrews K, Fitzgerald M (1997), Biological barriers to paediatric pain management. *Clin J Pain* 13:138–143.

Anseloni VC, He F, Novikova SI, Turnbach Robbins M, Lidow IA, Ennis M, Lidow MS (2005), Alterations in stress-associated behaviors and neurochemical markers in adult rats after neonatal short-lasting local inflammatory insult. *Neuroscience* 131: 635–645.

Arteni NS, Salgueiro J, Torres I, Achaval M, Netto CA (2003), Neonatal cerebral hypoxia-ischemia causes lateralized memory impairments in the adult rat. *Brain Res* 973:171-178.

Barde YA, Edgar D, Thoenen H (1982), Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J* 1:549-53.

Balduini W, De Angelis V, Mazzoni E, Cimino M (2000), Long-lasting behavioral alterations following a hypoxic/ischemic brain injury in neonatal rats. *Brain Res* 859:318-25.

Barkin RL, Barkin D (2001), Pharmacologic management of acute and chronic pain: focus on drug interactions and patient-specific pharmacotherapeutic selection. *South Med J* 94:756–770.

Bartha AI, Shen J, Katz KH, et al. Neonatal seizures: multicenter variability in current treatment practices. *Pediatr Neurol.* 2007; 37:85-90.

Basbaum, A.I., and Jessell, T. (2000). The perception of pain. In *Principles of Neuroscience*, E.R. Kandel, J. Schwartz, and T. Jessell, eds. (New York: Appleton and Lange), pp. 472–491.

Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D (2009), Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* 139:267-84. Review.

Becker N, Bondegaard Thomsen A, Olsen AK, Sjøgren P, Bech P, Eriksen J (1997), Pain epidemiology and health related quality of life in chronic non-malignant pain patients referred to a Danish multidisciplinary pain center. *Pain* 73:393-400.

Berde CB, Sethna NF (2002), Drug therapy: analgesics for the treatment of pain in children. *N Engl J Med* 347:1094-1103.

Berger R, Garnier Y, Jensen A (2002), Perinatal brain damage: underlying mechanisms and neuroprotective strategies. *J Soc Gynecol Investig* 9:319-28.

Bessler H, Djaldetti R, Salman H, Bergman M, Djaldetti M (1999), IL-1 beta, IL-2, IL-6 and TNF-alpha production by peripheral blood mononuclear cells from patients with Parkinson's disease. *Biomed Pharmacother* 53:141-5.

Bhutta AT, Rovnaghi C, Simpson PM, Gossett JM, Scalzo FM, Anand KJ (2001), Interactions of inflammatory pain and morphine in infant rats. Long-term behavioral effects. *Physiol Behav* 73:51-8.

Bona E, Johansson BB, Hagberg H (1997), Sensorimotor function and neuropathology five to six weeks after hypoxia-ischemia in seven-day-old rats. *Pediatr Res* 42:678-83.

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

Bullitt E (1990), Expression of *c-fos* -like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat. *J. Comp. Neurol* 296:17–530.

Bullock R, Zauner A, Woodward J, Young HF. Massive persistent release of excitatory amino acids following human occlusive stroke. *Stroke*. 1995 Nov;26(11):2187-9.

Cacci E, Claassen JH, Kokaia Z (2005), Microglia-derived tumor necrosis factor-alpha exaggerates death of newborn hippocampal progenitor cells in vitro. *J Neurosci Res* 80:789–797.

Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B (1975), An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 72:3666-70.

Chapman CR, Nakamura Y (1999), A passion of the soul: an introduction to pain for consciousness researchers. *Conscious Cogn* 8:391-422. Review.

Cheng Y, Gidday JM, Yan Q, Shah AR, Holtzman DM (1997), Marked age-dependent neuroprotection by brain-derived neurotrophic factor against neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Ann Neurol* 41:521-9.

Collins T, Lapierre LA, Fiers W (1986), Recombinant human tumor necrosis factor increases mRNA levels and surface expression of HLA-A, B antigens in vascular endothelial cells and dermal fibroblasts in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:446–450

Craig A, Dostrovsky JO (1999), Medulla to thalamus. In “Textbook of Pain” (P. Wall and R. Melzack 183–214. Churchill, Edinburgh.

Day HE, Kryskow EM, Nyhuis TJ, Herlihy L, Campeau S (2008), Conditioned Fear Inhibits *c-fos* mRNA Expression in the Central Extended Amygdala. *Brain Res* 1229:137–46.

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

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

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

Dragunow M, Faull R (1989), "The use of *c-fos* as a metabolic marker in neuronal pathway tracing". *Journal of Neuroscience Methods* 29 (3): 261–265.

Falcon M, Guendellman D, Stolberg A, Frenk H, Urca G (1996), Development of thermal nociception in rats. *Pain* 67:203-8.

Fang AY, Gonzalez FF, Sheldon RA, Ferriero DM (2013), Effects of combination therapy using hypothermia and erythropoietin in a rat model of neonatal hypoxia-ischemia. *Pediatr Res* 73:12-7.

Ferreira MBC (2004), Dor crônica. In: Kapczinski FP, Quevedo JL, Izquierdo IA. *Bases biológicas dos transtornos psiquiátricos*. Porto Alegre: Artmed 181-200.

Fields HL, Heinricher MM, Mason P (1991), Neurotransmitters in nociceptive modulatory circuits. *Annu. Rev. Neurosci* 14:219–245.

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

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

Gibson PR, Dudley FJ (1984), Ischemic hepatitis: clinical features, diagnosis and prognosis. *Aust NZ J Med* 14:822–5.

Ginis I, Jaiswal R, Klimanis D, Liu J, Greenspon J, Hallenbeck JM (2002), TNF- α -induced tolerance to ischemic injury involves differential control of NF- κ B

transactivation: the role of NF-kappaB association with p300 adaptor. *J Cereb Blood Flow Metab* 22:142-52.

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

Goodman JC, Robertson CS, Grossman RG, Narayan RK (1990), Elevation of tumor necrosis factor in head injury. *J Neuroimmunol* 30:213-7.

Grilli M, Chen-Tran A, Lenardo MJ (1993), Tumor necrosis factor alpha mediates a T cell receptor-independent induction of the gene regulatory factor NF-kappa B in T lymphocytes. *Mol Immunol* 30:1287–1294.

Grunau RV, Whitfield MF, Petrie JH (1994a), Pain sensitivity and temperament in extremely lowbirth-weight premature toddlers and preterm and full-term controls. *Pain* 58: 341–346.

Grunau RV, Whitfield MF, Petrie JH, Fryer EL (1994b), Early pain experience, child and family factors, as precursors of somatization: a prospective study of extremely premature and fullterm children. *Pain* 56:353–359.

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

Grunau RE, Oberlander TF, Whitfield MF, Fitzgerald C, Lee SK (2001), Demographic and therapeutic determinants of pain reactivity in very low birth weight neonates at 32 weeks' postconceptional age. *Pediatrics* 107:105-112.

Guinsburg CAP, Branco de Almeida MF, Balda RCX, Berenguel RC, Tonelotto J, Kopelman BI (2000), Differences in pain expression between male and female newborn infants, *Pain* 85:127–133.

Guy ER, Abbott FV (1992), The behavioral response to formalin in preweanling rats. *Pain* 51:81–90.

Hagberg H, Bona E, Gilland E, Puka-Sundvall M (1997), Hypoxia-ischaemia model in the 7-day-old rat: possibilities and shortcomings. *Acta Paediatr Suppl* 422:85-8.

Hamrick SE, Ferriero DM (2003), The injury response in the term newborn brain: can we neuroprotect? *Curr Opin Neurol* 16:147-54.

Hankins GD, Speer M (2003), Defining the pathogenesis and pathophysiology of neonatal encephalopathy and cerebral palsy. *Obstet Gynecol* 102:628-36.

Hellard D, Brosenitsch T, Fritzsich B, Katz DM (2004), Cranial sensory neuron development in the absence of brain-derived neurotrophic factor in BDNF/Bax double null mice. *Dev. Biol* 275:34-43.

Hermann C, Hohmeister J, Demirakca S, Zohsel K, Flor H (2006), Longterm alteration of pain sensitivity in school-aged children with early pain experiences. *Pain* 125:278-285.

Hermansen CL, Lorah KN (2007), Respiratory distress in the newborn. *Am Fam Physician* 76:987-94.

Hofman FM, Hinton DR, Johnson K, Merrill JE (1989), Tumor necrosis factor identified in multiple sclerosis brain. *J Exp Med* 170:607-12.

Hohmann AG, Neely MH, Pina J, Nackley AG (2005), Neonatal chronic hind paw inflammation alters sensitization to intradermal capsaicin in adult rats: A behavioral and immunocytochemical study. *J. Pain* 6, 798-808.

Ikeda T, Mishima K, Yoshikawa T, Iwasaki K, Fujiwara M, Xia YX, Ikenoue T (2001), Selective and long-term learning impairment following neonatal hypoxic-ischemic brain insult in rats. *Behav Brain Res* 118:17-25.

Ikeda E (2005), Cellular response to tissue hypoxia and its involvement in disease progression. *Pathol Int* 55:603-610.

Jacobs SE, Berg M, Hunt R, Tarnow-Mordi WO, Inder TE, Davis PG (2013), Cooling for newborns with hypoxic ischaemic encephalopathy. *Cochrane Database Syst Rev* 1:CD003311

Jansen EM, Low WC (1996), Quantitative analysis of contralateral hemisphere hypertrophy and sensorimotor performance in adult rats following unilateral neonatal ischemic-hypoxic brain injury. *Brain Res* 708:93-9.

Jelinek DF, Lipsky PE (1987), Enhancement of human B cell proliferation and differentiation by tumor necrosis factor-alpha and interleukin 1. *J Immunol* 139:2970–2976

Jensen A, Garnier Y, Berger RA (1999), Dynamics of fetal circulatory responses to hypoxia and asphyxia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 84: 155–72.

Jensen FE (2006), Developmental factors regulating susceptibility to perinatal brain injury and seizures. *Curr Opin Pediatr* 18:628-33.

Johnston CC, Stevens BJ (1996), Experience in a neonatal intensive care unit affects pain response. *Pediatrics* 98:925-30.

Karlsson M, Blennow M, Nemeth A, Winbladh B (2006), Dynamics of hepatic enzyme activity following birth asphyxia. *Acta Paediatr* 95:1405–11.

Karlsson M, Wiberg-Itzel E (2010), Chakkarapani E, Blennow M, Winbladh B, Thoresen M. Lactate dehydrogenase predicts hypoxic ischaemic encephalopathy in newborn infants: a preliminary study. *Acta Paediatr* 99:1139-44.

Kaur C, Ling EA (2009), Periventricular white matter damage in the hypoxic neonatal brain: role of microglial cells. *Prog Neurobiol* 87:264-80.

Kogo J, Takeba Y, Kumai T et al (2006) Involvement of TNF-a in glutamate-induced apoptosis in a differentiated neuronal cell line. *Brain Res* 1122:201–208

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

Lackmann GM, Tollner U, Mader R (1993), Serum enzyme activities in full-term asphyxiated and healthy newborns: enzyme kinetics during the first 144 hours of life. *Enzyme Protein* 47:160-72.

Lackmann GM, Tollner U (1995), The predictive value of elevation in specific serum enzymes for subsequent development of hypoxic-ischemic encephalopathy or intraventricular hemorrhage in full-term and premature asphyxiated newborns. *Neuropediatrics* 26:192-8.

LaPrairie JL, Murphy AZ (2007), Female rats are more vulnerable to the long-term consequences of neonatal inflammatory injury. *Pain* 132:124-133.

Lehner M, Taracha E, Skórzewska A, Maciejak P, Wisłowska-Stanek A, Zienowicz M, Szyndler J, Bidziński A, Płaźnik A (2006), Behavioral, immunocytochemical and biochemical studies in rats differing in their sensitivity to pain. *Behav Brain Res* 171:189-98.

Levine S (1960), Anoxic-ischemic encephalopathy in rats. *Am J Pathol* 36:1-17.

Lieberman AP, Pitha PM, Shin HS, Shin ML (1989), Production of tumor necrosis factor and other cytokines by astrocytes stimulated with lipopolysaccharide or a neurotropic virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:6348-52.

Lin C, Al-Chaer ED (2003), Long-term sensitization of primary afferents in adult rats exposed to neonatal colon pain. *Brain Res* 971:73-82.

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

Liu T, Clark RK, McDonnell PC, Young PR, White RF, Barone FC, Feuerstein GZ (1994), Tumor necrosis factor-alpha expression in ischemic neurons. *Stroke* 25:1481-8.

Loeser JD, Butler SH, Chapman CR, Turk DC (2001), *Bonica's Management of Pain*. 3ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.

Low JA (1993), The relationship of asphyxia in the mature fetus to long-term neurologic function. *Clin Obstet Gynaecol* 36:82–90.

Marsh DF, Hatch DJ, Fitzgerald M (1997), Opioid system and the newborn. *Br J Anaesth* 79:787-95.

Merskey H, Bogduk N (1994), *Classification of Chronic Pain Descriptions of Chronic Pain Syndromes and Definitions of Pain Terms* 1–215. IASP press, Seattle,WA.

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

Miura E, Procianoy RS (1997), *Neonatologia: Princípios e Prática*. 2ed. Porto Alegre: Artes Médicas.

Moore KL, Persaud TVN (1998), *Before We Are Born: Essentials of Embryology and Birth Defects* (5th edition), W.B. Saunders Company, Philadelphia.

Murphy M, Perussia B, Trinchieri G (1988), Effects of recombinant tumor necrosis factor, lymphotoxin, and immune interferon on proliferation and differentiation of enriched hematopoietic precursor cells. *Exp Hematol* 16:131–138.

Musumeci G, Grasselli G, Rossi S, De Chiara V, Musella A, Motta C, Studer V, Bernardi G, Haji N, Sepman H, Fresegna D, Maccarrone M, Mandolesi G, Centonze D (2011), Transient receptor potential vanilloid 1 channels modulate the synaptic effects of TNF- α and of IL-1 β in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neurobiol Dis* 43:669-77.

Ng KF, Tsui SL, Chan WS (2002), Prevalence of common chronic pain in Hong Kong adults. *Clinical Journal of Pain* 18:275-81.

Oberlander TF, Grunau RE, Whitfield MF, Fitzgerald C, Pitfield S, Saul JP (2000), Biobehavioral pain responses in former extremely low birth weight infants at four months' corrected age. *Pediatrics* 105:e6.

O'Connor JJ (2013), Targeting tumour necrosis factor- α in hypoxia and synaptic signalling. *Ir J Med Sci* 182:157-62.

Park H, Poo MM (2013), Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. *Nat Rev Neurosci* 14:7-23. Review.

Pereira P, Vinadé E, Rodrigues L, De David e Silva TL, Ardenghi P, da Silva Brum LF, Gonçalves CA, Izquierdo I (2007), Effect of radicicol infusion on the Src tyrosine kinase activity of rat hippocampus before and after training in an inhibitory avoidance task. *Neurochem Res* 32:1150-5.

Pezet S, McMahon SB (2006), Neurotrophins: mediators and modulators of pain. *Annu Rev Neurosci* 29:507-38. Review.

Pickering M, Cumiskey D, O'Connor JJ (2005), Actions of TNF- α on glutamatergic synaptic transmission in the central nervous system. *Exp Physiol* 90:663–670

Pickering M, O'Connor JJ (2007), Pro-inflammatory cytokines and their effects in the dentate gyrus. *Prog Brain Res* 163:339–354

Randich A, Uzzell T, DeBerry JJ, Ness TJ (2008), Neonatal urinary bladder inflammation produces adult bladder hypersensitivity. *J. Pain* 7:469–479.

Rasmussen P, Brassard P, Adser H, Pedersen MV, Leick L, Hart E, Secher NH, Pedersen BK, Pilegaard H (2009), Evidence for a release of brain-derived neurotrophic factor from the brain during exercise. *Exp Physiol* 94:1062-1069.

Ratan RR, Siddiq A, Smirnova N, Karpisheva K, Haskew-Layton R, McConoughey S, Langley B, Estevez A, Huerta PT, Volpe B, Roy S, Sen CK, Gazaryan I, Cho S, Fink M,

LaManna J (2007), Harnessing hypoxic adaptation to prevent, treat, and repair stroke. *J Mol Med (Berl)* 85:1331-8. Review.

Reichert APS, Silva SLF, Oliveira JM (2000), Dor no recém-nascido: uma realidade a ser considerada. *Rev. Nursing* 3:28-30.

Reichling JJ (1988), Kaplan MM. Clinical use of serum enzymes in liver disease. *Dig Dis Sci* 33:1601-14.

Ren K, Anseloni V, Zou SP, Wade EB, Novikova SI, Ennis M, Traub RJ, Gold MS, Dubner R, Lidow MS (2004), Characterization of basal and re-inflammation-associated long-term alteration in pain responsivity following short-lasting neonatal local inflammatory insult. *Pain* 110:588-596.

Rice JE, Vannucci RC, Brierley JB (1981), The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Ann Neurol* 9:131-141.

Row BW, Liu R, Xu W, Kheirandish L, Gozal D (2003), Intermittent hypoxia is associated with oxidative stress and spatial learning deficits in the rat. *Am J Respir Crit Care Med* 167:1548-53.

Ruda MA, Ling QD, Hohmann AG, Peng YB, Tachibana T (2000), Altered nociceptive neuronal circuits after neonatal peripheral inflammation. *Science* 289:628-631.

Ryan S, Taylor CT, McNicholas WT (2006), Predictors of elevated nuclear factor-kappaB-dependent genes in obstructive sleep apnea syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 174:824-830.

Salomé N, Salchner P, Viltart O, Sequeira H, Wigger A, Landgraf R, Singewald N (2004), Neurobiological correlates of high (HAB) versus low anxiety-related behavior (LAB): differential Fos expression in HAB and LAB rats. *Biol Psychiatry* 55:715-23.

Sagar SM, Sharp FR, Curran T (1988), Expression of *c-fos* protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. *Science* 240:1328-1331.

Savransky V, Bevans S, Nanayakkara A, Li J, Smith PL, Torbenson MS, Polotsky VY (2007), Chronic intermittent hypoxia causes hepatitis in a mouse model of diet-induced fatty liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 293:871-7.

Seeto RK, Fenn B, Rockey DC (2000), Ischemic hepatitis: clinical presentation and pathogenesis. *Am J Med* 109: 109–13.

Sharp FR, Sagar SM, Swanson RA (1993), Metabolic mapping with cellular resolution: *c-fos* vs. 2-deoxyglucose. *Crit. Rev. Neurobiol* 7:205–228.

Sherman SM, Guillery RW (1996), Functional organization of thalamocortical relays. *J. Neurophysiol* 76:1367–1395.

Sherman SM, Guillery RW (2002). The role of the thalamus in the flow of information to the cortex. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci* 357:1695–1708.

Siddall PJ, Cousins MJ (2004), Persistent Pain as a Disease Entity: Implications for Clinical Management. *Anesth Analg* 99:510-20.

Silveira PP, Portella AK, Clemente Z, Gamaro GD, Dalmaz C (2005), The effect of neonatal handling on adult feeding behavior is not an anxiety-like behavior. *Int J Dev Neurosci* 23:93-9.

Spencer SJ, Day TA (2004), Role of catecholaminergic inputs to the medial prefrontal cortex in local and subcortical expression of Fos after psychological stress. *J Neurosci Res* 78:279-88.

Strekalova T, Zörner B, Zacher C, Sadovska G, Herdegen T, Gass P (2003), Memory retrieval after contextual fear conditioning induces *c-fos* and JunB expression in CA1 hippocampus. *Genes Brain Behav* 2:3-10.

Tam CS, Wong M, Tam K, Aouad L, Waters KA (2007), The effect of acute intermittent hypercapnic hypoxia treatment on IL-6, TNF-alpha, and CRP levels in piglets. *Sleep* 30:723-7.

Tchelingerian JL, Le Saux F, Jacque C (1996), Identification and topography of neuronal cell populations expressing TNF alpha and IL-1 alpha in response to hippocampal lesion. *J Neurosci Res* 43:99–106.

Teng CJ, Abbott FV (1998), The formalin test: a dose-response analysis at three developmental stages. *Pain* 76:337-47.

Thoresen M, Liu X, Jary S, Brown E, Sabir H, Stone J, Cowan F, Karlsson M (2012), Lactate dehydrogenase in hypothermia-treated newborn infants with hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Acta Paediatr* 101:1038-44.

Tulchinsky E (2000), Fos family members: regulation, structure and role in oncogenic transformation. *Histol. Histopathol* 15:921–8.

Uçeyler N, Schäfers M, Sommer C (2009), Mode of action of cytokines on nociceptive neurons. *Exp Brain Res* 196:67-78.

VanElzakker M, Fevurly RD, Breindel T, Spencer RL (2008), Environmental novelty is associated with a selective increase in Fos expression in the output elements of the hippocampal formation and the perirhinal cortex. *Learn. Mem.* 15:899–908.

van Handel M, Swaab H, de Vries LS, Jongmans MJ (2007), Long-term cognitive and behavioral consequences of neonatal encephalopathy following perinatal asphyxia: a review. *Eur J Pediatr* 166:645-54.

Vannucci RC, Vannucci SJ (1997), A model of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *Ann N Y Acad Sci* 835:234-49.

Van Praag H, Frenk H (1991), Evidence for opiate tolerance en newborn rats. *Dev Brain Res* 60:99-102.

Volpe JJ (2001), Neurobiology of periventricular leukomalacia in the premature infant. *Pediatr Res* 50:553-62.

Volpe JJ (2008), *Neurobiology of the newborn*. 5th ed. 2008.

Wang G, Ji Y, Lidow MS, Traub RJ (2004), Neonatal hind paw injury alters processing of visceral and somatic nociceptive stimuli in the adult rat. *J Pain* 5:440–449.

Webster JI, Tonelli L, Sternberg EM (2002), Neuroendocrine regulation of immunity. *Annual Review of Immunology* 20:125-163.

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

Wilde GJ, Pringle AK, Sundstrom LE, Mann DA, Iannotti F (2000), Attenuation and augmentation of ischaemia-related neuronal death by tumour necrosis factor-alpha in vitro. *Eur J Neurosci* 12:3863-70.

Zagrebelsky M, Korte M (2013), Form follows function: BDNF and its involvement in sculpting the function and structure of synapses. *Neuropharmacology* [Epub ahead of print].

Zanardo V, Bondio M, Perini G, Temporin GF (1985), Serum glutamic-oxaloacetic transaminase and glutamic-pyruvic transaminase activity in premature and full-term asphyxiated newborns. *Biol Neonate* 47:61–9.

Zhan G, Serrano F, Fenik P, Hsu R, Kong L, Pratico D, Klann E, Veasey SC (2005), NADPH oxidase mediates hypersomnolence and brain oxidative injury in a murine model of sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med* 172:921-9.

Zheng F, Zhou X, Moon C, Wang H (2012), Regulation of brain-derived neurotrophic factor expression in neurons. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol* 4:188-200.

Zhuo M (2008), Cortical excitation and chronic pain. *Trends Neurosci* 31:199-207. Review.

5. ARTIGO CIENTÍFICO

**ARTIGO: NEONATAL HYPOXIC-ISCHEMIC BRAIN INJURY REDUCES c-FOS
ACTIVATION IN RATS HIPPOCAMPUS: LONG LASTING EFFECT**

Periódico: Neuroscience

Status: Submetido

**NEONATAL HYPOXIC-ISCHEMIC BRAIN INJURY REDUCES *c-FOS*
ACTIVATION IN RATS HIPPOCAMPUS: LONG LASTING EFFECT**

Andressa Souza^{a,c,d}, Jairo Alberto Dussan-Sarria^a, Liciane Fernandes Medeiros^{b,c,d}, Ana Cláudia Souza, Carla Oliveira^{a,c,d}, Vanessa Leal Scarabelot^{b,c,d}, Lauren Naomi Adachi, Elisa Cristiana Winkelmann-Duarte^e, Bárbara Beatriz Philippi-Martins^e, Carlos Alexandre Netto, Wolnei Caumo^{a,c}, Iraci LS Torres^{a,b,c,d*}

^a Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90035-003, Porto Alegre, Brazil.

^b Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90035-003, Porto Alegre, Brazil.

^c Laboratório de Farmacologia da Dor e Neuromodulação: Modelos Animais, Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90050-170, Porto Alegre – Brazil.

^d Unidade de Experimentação Animal, Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 90035-003, Porto Alegre, Brazil.

^e Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900, Florianópolis – Brazil.

Conflict of Interest: There was no financial interest between any of the authors or any commercial interest in the outcome of this study.

* Corresponding author:

Iraci Lucena da Silva Torres

Departamento de Farmacologia - ICBS, UFRGS.

Rua Sarmiento Leite, 500 sala 202.

90050-170 - Porto Alegre, RS, Brazil.

Phone: 0055-51 3316 3183; FAX: 0055-51 3316 3121.

E-mail: iracitorres@gmail.com

Abstract

The effect of hypoxic-ischemic (HI) brain insult in neonates' nociceptive pathways modulation has been sparsely explored. A full factorial 6 x 3 experimental design, with six levels of brain insult (control, hypoxia-ischemia, ischemia, hypoxia, sham-ischemia or sham-hypoxia) and three levels of assessment time (14th, 30th and 60th postnatal day) was conducted in *Wistar* rats aiming to study the effects of unilateral HI on nociceptive (tail flick, hot plate and electronic von Frey tests), biochemical [brain derived neurotrophic factor (BDNF), tumor necrosis factor α (TNF- α), lactate dehydrogenase (LDH) serum levels] and immunohistochemical (hippocampus *c-fos* activation) parameters. Rats with hypoxia and/or ischemia had irreversibly less *c-fos* activated neurons in the CA1 hippocampal area ipsilateral to the insult, contralaterally appearing the same response only seven weeks later (P60). Higher mechanical sensitivity was observed early post injury in rats with HI, but was back to normal in subsequent assessments. LDH serum levels were significantly lower in rats submitted to hypoxia. Irrespective of the experimental group, the age of the animal played a significant role in the nociceptive response, as well as on the BDNF, TNF- α and LDH serum levels. In conclusion, the HI brain insult induces a significant and irreversible reduction on neuronal activation ipsilateral to the lesion indexed by *c-fos* protein evaluation, with evidence of an altered nociceptive response manifested in the short but not in the medium or long term. Hypoxia rats had lower LDH serum levels. Biomarkers of neuroplasticity, inflammation and cellular damage present little variation regarding the brain insult, although more pronounced changes are related to the rats' age.

Keywords: hypoxia-ischemia, nociceptive response, *c-fos* protein, LDH, BDNF, TNF- α .

1. Introduction

The hypoxia-ischemia (HI) duplet occurs in approximately 3-5/1000 newborns (Jacobs et al., 2013), and it appears as a consequence of infections, premature labor, obstetric complications, metabolic or genetic diseases or status epilepticus among others (Hermansen and Lorah, 2007; Bartha et al., 2007; Jensen, 2006; Volpe, 2001). Although few therapeutic options for HI are currently available, developments in intensive care units have improved neonatal mortality and morbidity (Volpe, 2008; Hamrick and Ferriero, 2003; Berger et al., 2002). However, HI survivors might still suffer different lifetime consequences such as developmental delays, cognitive and behavioral dysfunction, cerebral palsy, epilepsy, and autism (Fang et al., 2013; Volpe, 2008; van Handel et al., 2007; Silveira et al., 2005; Arteni et al., 2003; Low, 1993) hence impacting significantly the future quality of life of the survivors and their caregivers.

Nociception alteration induced by HI has been scarcely studied in both animals and humans. In humans, nociceptive system development occurs during the second and third gestational trimesters and continues maturing in the first two years of life (Anand, 1987). The neuronal development begins around the 13th gestational week but only completes myelination in the 30th week for nociceptive afferents (Kostovic and Rakic, 1990); in the 37th week for talamocortical fibers (Deshpande and Anand, 1996); and during the third postnatal week for inhibitory pathways (Boucher et al., 1998; van Praag and Frenk, 1991). Rats' neonates neuronal maturing resembles the one of a 24 gestational week's human (Dobbing and Sands, 1979, Andrews and Fitzgerald, 1997; Marsh et al., 1997).

Among the consequences of neonatal HI some alterations on pain processing have been described, involving from molecular to behavioral disruption, as will be briefly presented as follows. As cellular damage occurs, enzymes as the lactate dehydrogenase (LDH) are liberated into the bloodstream allowing its use as marker of hypoxic

encephalopathy (Thoresen et al., 2012). Such damages elicits inflammatory responses where Tumor Necrosis Factor α (TNF- α) have been associated to modulation of synaptic signaling (O'Connor, 2013), working in conjunction with different neurotrophins and mediators, such as the brain derived neurotrophic factor (BDNF) linked to plasticity and survival neuronal (Park and Poo, 2013). The *c-fos* protein has been proposed as a mean of assess neuronal activity, due to its involvement with proliferation, differentiation and survival cellular, particularly in the hypoxia context (Tulchinsky, 2000). Moreover, *c-fos* protein expression in the hippocampus has also been linked to sensitivity to pain in rats (Lehner et al, 2006).

Some studies indicate that severe or persistent pain in premature neonates is capable of altering pain perception that persists until adult life (Anseloni et al., 2005; Bhutta et al., 2001; Anand et al., 1998). Animal models have also shown that sensitivity to pain might be increased or decreased according to the duration and type of the stimuli (Medeiros, 2010; Ruda et al., 2000; Lin and Al-Chaer, 2003; Wang et al., 2004; Hohmann et al., 2005; Randich et al., 2006). Besides these pain effects of early nociceptive exposure on pain modulation, psychiatric disorders in adulthood (i.e. anxiety, depressive and schizophrenia disorders) also have been associated with painful processes during childhood (Reichert et al., 2000).

The acute effects of such early painful stimuli on pain processing of neonates with HI are not yet fully explored. The study of such phenomena in human neonates is challenging due to the complexity of evaluating pain and its inherent ethical aspects in the population of interest. In order to study acute pain response in neonates with HI our team chose the animal model described by Levine (1960) and adapted by Rice et al. (1981) which reproduces unilateral brain HI. The present study aimed to understand the effects of unilateral HI in the nociceptive and in the biochemical and morphological parameters in the short, medium and long-term.

2. Experimental procedures

2.1 Animals

Neonate male *Wistar* rats, 7-day-old at the beginning of the experiment were used. All animals were provided by the center for experimental reproduction of laboratory animals, which belongs to the Federal University of Rio Grande do Sul. The rats were accommodated in home cages made of polypropylene (49x34x16 cm) with the floor covered with sawdust, with their mothers, maintained on a standard 12-h dark/light cycle (lights on at 07:00 a.m. and lights off at 07:00 p.m.) at room temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$). The animals had free access to food and water. All experiments in this study were conducted in male rats because the nociceptive process and drug responses are altered by hormonal states (Ribeiro et al., 2005). At birth, the male litters were standardized in accordance with Silveira et al. (Silveira et al., 2010; Silveira et al., 2011) with minor modifications, containing 8 male pups per dam. Adjustment of litters in the first days of birth was performed in order to homogenize nutritional conditions for all puppies (Tanaka, 2004). All experiments were performed in accordance with Brazilian Law No. 11.794 of October 8, 2008 and Guide for the Care and Use of Laboratory Animals 8th edition (2011). Animal handling and all experiments were performed in accordance with international guidelines for animal welfare and measures were taken to minimize animal pain and discomfort and use only the number of animals necessary to produce reliable scientific data. To control the possible effect of outliers, we excluded rats that did not present any response on nociceptive testing at baseline. The experiment used the number of animals necessary to produce reliable scientific data, and each animal participated only in one single behavioral test. All of the animals were killed by decapitation in order to collect the biological material avoiding cellular and biomarkers alterations. All the tests were

performed in postnatal days 14 (P14), 30 (P30) and 60 (P60). These timing were chosen taking into account that rats are considered to reach puberty by P30, and sexual maturity by P60 (adult rat) (Baker et al., 1979). All experiments and procedures were approved by the Institutional Committee for Animal Care and Use (GPPG-HCPA protocol No. 10-0285).

2.2 Body weight

The animals were weighed manually at each age using a semi-analytical balance. The data were expressed as grams (g) of body weight.

2.3 Model of Neonatal Cerebral hypoxia-ischemia

The animals were submitted to the hypoxic–ischemic brain injury described by Levine (1960), as adapted by Rice et al. (1981). This model of HI used (proposed by Levine and modified by Rice for newborn rats) was chosen in order to provide a reproducible pattern of hemispheric injury ipsilateral to the ligated common carotid artery (Ramirez et al., 2003). The procedure consisted of a unilateral common carotid artery occlusion combined with a hypoxic atmosphere. The day (P7) of submission to the experimental intervention (either hypoxia, ischemia, both or sham) was chosen as this stage of development of the rat's brain has histological similitude to the brain of a human fetus or newborn at the 32-34 gestational weeks (Tuor et al., 1996), which is the age at which these insults can occur in humans depending on the underlying cause (e.g. infectious, metabolic, traumatic). Briefly, 7-day-old *Wistar* pups males were randomly chosen, anesthetized with isoflurane, and a small midline longitudinal neck incision was made. The left vagus nerve, internal jugular vein and common carotid artery were identified, and the later was finally isolated and occluded with a 4.0 surgical silk thread. The entire surgical procedure was completed within 10 min. After 15 min of recovery under a heating lamp, animals were returned to their cages and allowed to recover

for another 2 hours with the dams. After this period, rats were exposed to a hypoxic atmosphere (8% oxygen balanced with 92% nitrogen) during 90 min. The hypoxia chamber was kept in a water bath to maintain environmental inner temperature at 37°C. Following the hypoxic exposure, pups were left 15 min under warming and returned to the dams for recovery. Sham-operated rat pups were randomly chosen from the same litters of HI rats; they were subjected to maternal separation and received anesthesia and the same neck incision without artery ligation or hypoxia period (Arteni et al., 2010). The mortality rate was less than 5% in HI rats. After the surgical procedure, rats were randomly assigned to six experimental groups: control, sham-ischemia, sham-hypoxia, ischemia, hypoxia and hypoxia-ischemia (n=7–9 rats per group).

2.4 Nociceptive tests

The experimental animals were previously exposed to all the apparatus to acclimate to the procedure 24 h prior to the test sessions. This was done because the novelty of the apparatus can itself induce antinociception (Netto et al., 2004).

2.4.1 Tail Flick measurement (TFL)

TFL is used to assess heat threshold (Castilho et al., 2002). Each animal was placed on the apparatus and its tail was laid across a nichrome wire coil that was then heated using an electric current. The equipment was calibrated to obtain three consecutive baseline tail-flick latencies between 3 s and 5 s. If at any time the animal failed to flick its tail before the temperature reached 75 °C, the tail was removed from the coil to prevent skin damage. Three TFL baselines were taken at 3 min intervals.

2.4.2 Hot Plate test

The hot-plate test was carried out to assess the effects of hypoxia-ischemia on the thermal nociceptive threshold. The temperature of the plate was kept at 55°C. The animals were placed in glass funnels onto the heated surface. With a stopwatch, the experimenter recorded, for the latency of response in seconds, the time between placement of the animals and the onset of paw licking or jumping behavior (Woolfe and MacDonald, 1944). Maximum observation time allowed was of 30 seconds.

2.4.3 von Frey test

The von Frey test is used to assess mechanical allodynia (pain induced by non-noxious stimuli) (Wegert et al. 1997). Paw withdrawal threshold in response to a mechanical stimulus was determined using a electronic von Frey device. Animals were placed in a cage with a metal mesh floor, allowing them to move freely. von Frey device stimuli were applied to the mid-plantar surface of the hind paw through the mesh floor. Application was only performed when the animal's paw was in contact with the floor, and was repeated three times with an interstimuli interval of at least 5 seconds. The withdrawal threshold of the right hind paw was expressed in force: grams (g).

2.5 Histological procedures

The whole brain specimen was removed from the animal and stored in 10% formaldehyde. Coronal cuts were performed 24 hours later, taking tissues for preservation in paraffin. Then, 3 microns cuts were performed and fixed in microscopy sheets, so they could later be dewaxed and hydrated. Antigenic retrieval employed primary antibodies (Sheep ANTI-c-fos Polyclonal Antibody, Millipore®, cat# AB1584) and secondary antibodies (Polyvalent detection kit Sprint®).

2.5.1 Quantification of *c-Fos* positive cells

The CA1 region and the dentate gyrus of both hippocampi were identified according to the atlas of rat brain (Paxinos and Watson, 2008). The quantification of cells stained immunohistochemically for *c-Fos* protein was performed using a light microscope (Olympus BX-41) equipped with a digital camera (3.3 Mpixels QCOLOR3C, Qimaging TM) and an image acquisition software (Qcapture Pro 5.1) with a 40 × lens. The score of each region of the neurons was performed using both right and left hemispheres.

The number of *c-Fos* positive cells was obtained by count inside a frame of 12100 μm^2 (test area). Another condition for inclusion required that *c-Fos* positive cells should be inside the test area, but it could not touch two borders of the previously chosen test areas (forbidden lines) (Gundersen, 1977; Winkelmann-Duarte et al., 2011). The cuts were made from each region along its entire length, with a gap of 400 microns. We analyzed 5 sections throughout the hippocampus of each animal, between figures 27 (bregma 2.30) and 42 (bregma 6.04) of the atlas (Paxinos & Watson 2008). The same counting procedures were applied for all groups.

2.6 BDNF, TNF- α , and LDH serum levels

Blood samples were centrifuged in plastic tubes during 10 minutes at 5000×g at 4°C. Serum was obtained and frozen at -80°C until assays were perform. The biomarkers levels in blood serum samples were determined using BDNF (Chemicon/Millipore, catalog no. CYT306, with the lower detection limit of the kit of 7.8 pg/mL), TNF- α (Invitrogen, catalog no. KHC3011, with the lower detection limit of the kit of 1.7 pg/mL) enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits, and the LDH (Laborclin, catalog no. LB172022) was performed using the kinetic test by spectrophotometer. All the tests were executed according to the manufacturer's instructions.

2.7 Statistical Analysis

Descriptive statistics according to the variables characteristics were used. Continuous variables were summarized using means and standard error. For evaluation of weight among the six experimental groups (i.e. control, hypoxia-ischemia, ischemia, hypoxia, sham-ischemia or sham-hypoxia) at each postnatal day evaluated (i.e. P14, P30 and P60) was used one-way ANOVA following Student Newman Keuls (SNK). Two-way analysis of variance (ANOVA) was used for the rest of the analyses, using experimental groups and age as independent factors, and adjusting with Bonferroni correction for post hoc tests when appropriate. The respective interactions were evaluated for all tests. For the Von Frey test and hippocampus assessments, left and right paws pain threshold as well as laterality of neuronal activation evaluated by *c-Fos* were compared using paired sample *t* test. The significance level was set at 0.05. SPSS 20.0 for Windows was used for all the statistical analyses.

3. Results

3.1 Weight

There were no significant differences between rats weight among the six experimental groups (i.e. control, hypoxia-ischemia, ischemia, hypoxia, sham-ischemia or sham-hypoxia) at each postnatal day evaluated (i.e. P14, P30 and P60) (one-way ANOVA for age, $P > 0.05$).

3.2 Tail Flick

There were not significant effects or interactions between the experimental groups and the tail withdrawal latency (two-way ANOVA, $P > 0.05$), nevertheless age showed a

significant effect (two-way ANOVA, $F_{(2,129)}=21.46$, $P<0.001$). The animals had reduced latency as age increased; presenting a tail withdrawal latency of 5.41 ± 0.15 seconds at P14 ($n=45$), which was significantly different to P30 (4.22 ± 0.16 seconds, $n=43$, two-way ANOVA/Bonferroni, $P<0.001$) and to P60 (4.13 ± 0.16 , $n=44$, two-way ANOVA/Bonferroni, $P<0.001$). However, tail withdrawal latency was not significantly different between P30 and P60 (two-way ANOVA/Bonferroni, $P>0.05$), (Figure 1-A).

3.3 Hot Plate test

There were no significant effects or interaction between experimental groups and latency, however age showed a significant effect (two-way ANOVA, $F_{(2,130)}=43.43$, $P<0.001$, see Figure 1). The latency in the hot plate test was significantly different at each postnatal time assessed. At P60 the latency was higher (4.32 ± 0.16 s, $n=45$) in comparison to P30 (2.19 ± 0.17 s, $n=43$, two-way ANOVA/Bonferroni, $P<0.001$) and to P14 (2.83 ± 0.16 s, $n=45$, two-way ANOVA/Bonferroni, $P<0.001$), however at P30 rats had lower latency than at P14 (two-way ANOVA/Bonferroni, $P=0.024$) (Figure 1-B).

.....Insert Figure 1

3.4 von Frey test

Control rats did not have significant differences between right and left paw withdrawal threshold at each time assessed (Paired t test, $P>0.05$). A significant difference (Paired t test, $P=0.012$) between right (12.69 ± 0.91 g) and left (10.26 ± 0.36 g) paw withdrawal threshold was observed in the HI group at P14 ($n=8$). No other differences between same animal paws of other groups were observed (Paired t test, $P>0.05$). On the other hand, age had a significant effect when analyzing paws independently, as follows. Right paws

withdrawal thresholds increased with age (two-way ANOVA, $F_{(2,106)}=100.10$, $P<0.001$), having a lower threshold at P14 (12.04 ± 1.41 g, $n=43$) in comparison to P30 (19.50 ± 1.40 g, $n=44$, two-way ANOVA/Bonferroni, $P<0.001$) and P60 (46.88 ± 2.05 g, $n=22$, two-way ANOVA/Bonferroni, $P<0.001$); at the same time the thresholds at P30 and P60 were also significantly different (two-way ANOVA/Bonferroni, $P<0.001$). Left paws withdrawal thresholds increased with age, too (two-way ANOVA, $F_{(2,104)}=127.59$, $P<0.001$), having a lower threshold at P14 (12.05 ± 1.41 g, $n=43$) in comparison to P30 (17.41 ± 1.39 g, $n=44$, two-way ANOVA/Bonferroni, $P=0.024$) and P60 (49.90 ± 2.00 g, $n=22$, two-way ANOVA/Bonferroni, $P<0.001$); at the same time the thresholds at P30 and P60 were also significantly different (two-way ANOVA/Bonferroni, $P<0.001$) (Figure 2).

.....Insert Figure 2

3.5 Histological Analysis

3.5.1 Hippocampal CA1 area

When analyzing the number of neurons per field with *c-fos* activation at the region CA1 of the right hippocampus no interactions between group and age were found (two-way ANOVA, $P>0.05$). However, main effects for experimental group (two-way ANOVA, $F_{(5,102)}=5.88$, $P<0.001$) and age (two-way ANOVA, $F_{(2,105)}=7.23$, $P<0.001$) were present. When pooling all experimental groups, a higher number of activated neurons were observed at P30 (4.83 ± 0.13 , $n=36$) in comparison to P14 (4.11 ± 0.13 , $n=36$, two-way ANOVA/Bonferroni, $P<0.001$) and P60 (4.25 ± 0.13 , $n=36$, two-way ANOVA/Bonferroni, $P=0.005$). At P60, the ischemia group (3.83 ± 0.32 , $n=6$, two-way ANOVA/Bonferroni, $P=0.033$), hypoxia group (3.83 ± 0.32 , $n=6$, two-way ANOVA/Bonferroni, $P=0.033$) and HI

group (3.67 ± 0.32 , $n=6$, two-way ANOVA/Bonferroni, $P=0.007$) presented less neuron per field with *c-fos* activation in comparison to control rats of the same age (5.50 ± 0.32 , $n=6$). Regarding the HI group there was decreased *c-fos* activation at P60 in comparison to P30 (5.33 ± 0.32 , two-way ANOVA/Bonferroni, $P=0.033$).

Regarding the left CA1 region of the hippocampus main effects of age (two-way ANOVA, $F_{(2,105)}=5.04$, $P=0.008$) and experimental group (two-way ANOVA, $F_{(5,102)}=29.24$, $P<0.001$) were present, but there is not interaction between these factors. A higher number of activated neurons was observed at P30 (3.86 ± 0.12 , $n=36$, two-way ANOVA/Bonferroni, $P=0.002$) and P60 (3.69 ± 0.12 , $n=36$, two-way ANOVA/Bonferroni, $P=0.048$) in comparison to P14 (3.28 ± 0.12 , $n=36$). At P14, HI group (2.17 ± 0.30 , $n=6$, two-way ANOVA/Bonferroni, $P<0.001$), the ischemia group (2.00 ± 0.30 , $n=6$, two-way ANOVA/Bonferroni, $P<0.001$) and hypoxia group (2.33 ± 0.30 , $n=6$, two-way ANOVA/Bonferroni, $P<0.001$) had less neuronal activation than control (4.83 ± 0.30 , $n=6$). At P30 HI group (3.17 ± 0.30 , $n=6$, two-way ANOVA/Bonferroni, $P<0.001$), ischemia (3.17 ± 0.32 , $n=6$, two-way ANOVA/Bonferroni, $P<0.001$) and the hypoxia (3.00 ± 0.30 , $n=6$, two-way ANOVA/Bonferroni, $P<0.001$) groups had also less number of neuronal activation in comparison to control (5.17 ± 0.30 , $n=6$). At P60 the HI (2.67 ± 0.30 , $n=6$, two-way ANOVA/Bonferroni, $P<0.001$), the ischemia (2.67 ± 0.30 , $n=6$, two-way ANOVA/Bonferroni, $P<0.001$) and the hypoxia (3.33 ± 0.30 , $n=6$, two-way ANOVA/Bonferroni, $P=0.013$) groups had also less number of neuronal activation in comparison to control (5.00 ± 0.30 , $n=6$). For both, left and right CA1 region of the hippocampi the sham intervention groups had no significant differences in neuronal activation when compared to controls at every age assessed (two-way ANOVA/Bonferroni, $P>0.05$).

When comparing CA1 region of both right and left hippocampus by age, no significant differences were found in controls (paired *t* test, $P>0.05$), however at P14 the HI (right 4.50 ± 0.22 , left 2.17 ± 0.17 , $n=6$, paired *t* test, $P<0.001$), ischemia (right 3.33 ± 0.21 , left

2.00±0.45, n=6, paired *t* test, P<0.01) and hypoxia (right 3.83±0.17, left 2.33±0.42, n=6, paired *t* test, P=0.017) groups showed differences. At P30 the HI (right 5.33±0.42, left 3.17±0.40, n=6, paired *t* test, P=0.003), ischemia (right 4.17±0.30, left 3.17±0.17, n=6, paired *t* test, P=0.012) and hypoxia (right 4.67±0.21, left 3.00±0.26, n=6, paired *t* test, P=0.011) groups were different. At P60 only HI group showed significant difference between CA1 region of right and left hippocampus (right 5.33±0.42, left 3.17±0.40, n=6, paired *t* test, P=0.012). The rest of the groups did not present significant differences (Figure 3-A, B, C).

3.5.2. Hippocampal dentate gyrus

When assessing the *c-fos* activation at the right dentate gyrus of the hippocampus no effects or interactions between experimental group and age were observed (two-way ANOVA, P>0.05). When assessing the left dentate gyrus, the experimental group demonstrated to have an effect on neuronal activation (two-way ANOVA, $F_{(5,102)}=6.14$, P<0.001), however neither age or the interaction between the factors had significant effects (two-way ANOVA, P>0.05). In the left dentate gyrus too, when pooling all ages together, rats with HI (5.89±0.30, n=18, two-way ANOVA/Bonferroni, P=0.017), ischemia (5.55±0.30, n=18, two-way ANOVA/Bonferroni, P=0.011) and hypoxia (5.89±0.30, n=18, two-way ANOVA/Bonferroni, P=0.003) had less neuronal activation in comparison to controls (6.50±0.30, n=18). Sham intervention groups had no significant differences in neuronal activation in the left dentate gyrus (two-way ANOVA, P>0.05). When comparing both right and left dentate gyrus of the hippocampus, controls did not have significant differences (n=18, paired *t* test, P>0.05), however a significant difference was observed in the HI group at P14 (right 5.17±0.54, left 3.83±0.30, n=6, paired *t* test, P=0.043) and at P30 (right 6.33±0.42, left 4.33±0.42, n=6, paired *t* test, P=0.012). No other significant differences were observed (Figure 3-D, E, F).

.....Insert Figure 3

3.6 BDNF serum level

BDNF serum levels increased significantly with age (two-way ANOVA, $F_{(2,127)}=187.33$, $P<0.001$). At P14 (3.73 ± 0.31 ng/mL, $n=42$) levels were significantly lower than at P30 (5.14 ± 0.30 ng/mL, $n=43$, two-way ANOVA/Bonferroni, $P=0.004$) and at P60 (11.43 ± 0.30 ng/mL, $n=45$, two-way ANOVA/Bonferroni, $P<0.001$). At the same time, BDNF serum levels were significantly different in P30 and P60 (two-way ANOVA/Bonferroni, $P<0.001$). There were no significant effects or interactions between experimental groups (two-way ANOVA, $P>0.05$) (Figure 4-A).

3.7 TNF- α serum level

Age had a significant effect on TNF- α serum levels (two-way ANOVA, $F_{(2,79)}=3.15$, $P=0.049$), as follows. Levels were higher at P14 (15.95 ± 0.32 pg/mL, $n=26$) in comparison to P60 (14.82 ± 0.31 pg/mL, $n=28$, two-way ANOVA/Bonferroni, $P=0.044$), however levels at P30 (15.38 ± 0.32 pg/mL, $n=28$) were not different to those at P14 (two-way ANOVA/Bonferroni, $P>0.05$) and at P60 (two-way ANOVA/Bonferroni, $P>0.05$). Experimental groups (i.e. control, hypoxia, ischemia, HI, sham-ischemia and sham-hypoxia) did not have an effect on TNF- α serum level (two-way ANOVA, $P>0.05$) (Figure 4-B).

3.8 LDH serum level

Experimental group (i.e. control, hypoxia, ischemia, HI, sham-ischemia, sham-hypoxia) (two-way ANOVA, $F_{(5,100)}=6.94$, $P<0.001$), and age (two-way ANOVA, $F_{(2,103)}=3.12$, $P=0.049$) had significant effects, but no significant interactions (two-way ANOVA, $P>0.05$). When pooling all ages, rats that received hypoxia had lower LDH serum

levels (847.29 ± 31.40 U/L, $n=19$) in comparison to controls (1070.60 ± 37.15 U/L, two-way ANOVA/Bonferroni, $P < 0.001$, $n=14$), to HI group (1059.40 ± 35.57 U/L, two-way ANOVA/Bonferroni, $P < 0.001$, $n=18$) and to sham-hypoxia group (1061.76 ± 33.23 U/L, two-way ANOVA/Bonferroni, $P < 0.001$, $n=17$). When pooling all groups, rats at P60 (959.40 ± 21.45 U/L, $n=42$) had lower LDH levels in comparison to those at P14 (1043.13 ± 26.11 U/L, two-way ANOVA/Bonferroni, $P = 0.045$, $n=29$), however at P30 (984.22 ± 23.52 U/L, two-way ANOVA/Bonferroni, $P > 0.05$, $n=35$) LDH levels had no significant differences to the other times assessed (Figure 4-C).

.....Insert Figure 4

4. Discussion

The present study showed important decrease in the quantification of *c-fos* positive neurons in the hippocampal CA1 area of rats subjected to hypoxia and/or ischemia, as well as the modulation of a promising biomarker of hypoxia situations, the LDH. In addition, we observed that irrespective of the hypoxia and/or ischemia exposure, the age of the animal played a significant role in the nociceptive response to the different painful stimuli, as well as on the BDNF and TNF- α serum levels, but not on the LDH serum levels. In addition, during each postnatal day studied (i.e. P14, P30 and P60) all of the experimental groups had comparable weights.

The *c-fos* is a protein involved in proliferation, differentiation and survival cellular, which have also been related to angiogenesis and hypoxia genes (Tulchinsky, 2000). Some authors have also considered it as surrogate indicator of neuronal activity, since it is expressed by neurons when action potentials are triggered (VanElzakker et al., 2008; Dragunow and Faull, 1989).

Regarding pain, increased *c-fos* positive cells have been found in the amygdale and the CA1 area of the hippocampus of animals with higher sensitivity to painful stimuli (Lehner et al., 2006). Hippocampal CA1 pyramidal cells are known to receive pain input from peripheral nociceptors (Wei et al., 2000). The hippocampus is involved in the affective processing of pain; and it has a significant influence on the plasticity of nociceptive responses via synaptic potentiation of pyramidal cells and interneurons in the prefrontal cortex (Nakamura et al., 2010).

In our study there were no significant differences in the number of *c-fos* positive cells at any age evaluated in the control rats. However hypoxia, ischemia and HI caused a significant and irreversible reduction in *c-fos* activation on the left CA1 area of the hippocampus, ipilateral to the carotid artery ligated. Such reduction was particularly accentuated with time in the HI group only, suggesting that the combined lesion causes an irreversible and greater impact on neuronal activation. Moreover, *c-fos* activation in the corresponding contralateral area that was initially preserved (i.e. at P14 and P30), presented a significant reduction afterwards (i.e. at P60). Although our experimental model deprives us of demonstrating more depth biological explanatory mechanisms, we hypothesize that such delayed in the reduction of neuronal activation in the CA1 area of the right hippocampus could be consequence of an overload of the injured left structure. Taking into account that a bidirectional neuroplasticity modulation exists between the hippocampus and bilateral sensory cortices (Nakamura et al., 2010), this hypothesis is reasonable. Thus, we could suggest that alterations in the nociception and processing left structures could be inducing to contralateral synaptic inhibition, ultimately leading to reduce neuronal activation.

Although another research group showed that high counts of *c-fos* positive neurons in the hippocampal dentate gyrus of the rat were associated with lower sensitivity to pain (Lehner et al., 2006), the opposite was observed in our experiment. We found that at P14

those rats with HI had lower *c-fos* activation in the dentate gyrus ipsilateral to the ligated carotid artery, but also had higher sensitivity (i.e. lower paw withdrawal threshold) ipsilateral to the brain lesion. This finding suggests that the effect of the hypoxic-ischemic insult goes beyond the ipsilateral neuronal damage. And, it is capable of altering the pain modulation occurring in contralateral brain structures. However, to know the explanatory mechanisms for this phenomenon it needs a more depth study. We hypothesize that the early and transient increased ipsilateral sensitivity could have been evoked as a compensatory mechanism, possibly induced by intracortical plasticity. The divergent results in comparison to Lehner's group experiments could be explained due to the differences in experimental model and tests used (Lenher et al., 2006).

Although the experimental model used was successful reproducing cerebral hypoxia, ischemia, and HI as confirmed by optical microscopy; we did not find significant effect in nociceptive thermal tests. On the other hand, irrespective of the experimental groups, we observed that the tail flick response decreases whereas the response in the hot plate test increases with age. The TFL evaluates phasic pain, in other words, a short-duration nociceptive stimulus related to nociceptive threshold and involving minimal surface stimulation. This thermal test involves the stimulation of A δ fibers (Le Bars et al., 2001), which are known to be present at birth (P0). In contrast, the hot plate test involves tonic pain, a long-duration stimulus triggering a nociceptive response mainly involving C-fibers (Le Bars et al., 2001), which are still undergoing maturation during the first three weeks of life (Fitzgerald, 2005). In this period, there is an increase in the number of C-fibers connecting to the spinal cord and a gradual decrease in the number of A δ fibers. Therefore, in the first three weeks of life, both fiber populations take up the same space in the spinal cord (Fitzgerald, 2005). Tail-flick involves reflex descending supraspinal inhibitory control that travels through the dorsolateral funiculus (Necker et al., 1978). This control plays a significant

modulatory role, which is accentuated by the stimuli of the heat intensity, and by visual and auditory cues provided during the test (King et al., 1997). In addition, the tail flick latency can be altered according to the tail and room temperature (Berge et al., 1988). As previously described, all of our experiments were performed in a temperature-controlled environment ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$), with high coil temperatures (up to 75°C) and avoiding any visual or auditory cues, hence making our observations reliable. Although the experimental model induces a supraspinal lesion, it is possible that in our experiment the inhibitory role of the descending modulation in the tail flick reflex had been minimized because of the lesion itself, or due to the strict control of the conditions described to alter the tail withdrawal latency in the test (i.e. constant environment temperature, absence of visual or auditory cues). The lack of significant differences in tail withdrawal latency between control rats and those in the experimental group supports the latter explanation. To understand the reduction in the tail withdrawal latency observed with the increased age it is important to highlight that descending inhibitory modulation becomes apparent between the 15th (Guy and Abbott, 1992; Weber et al., 1977) and the 21st postnatal day (van Praag et al., 1991) due to the delay in receptors maturation in the dorsal horn and the time-dependent myelination of A δ fibers (involved with thermal sensitivity) (Fitzgerald et al., 1991). So, in accordance with growing of rats the receptors reach to maturity and A δ fibers, become myelinated, both collaborate with faster conduction velocities and the reduced tail withdrawal latencies observed. Mainly A-fibers are responsible of the response to temperatures below the perceptual pain threshold in humans (Dubin and Patapoutian, 2010). Although conduction speed of this type of fibers increases with the increased age due to myelination (Fitzgerald et al., 1991), such increment in the conduction velocities is not necessarily correlated with the withdrawal behavior latency assessed in the hot plate test. In neonates and young rats there is a lack of keratin in paw skin as well as high penetration of nerve fiber in the epidermis (Fitzgerald, 1966) leaving

neuronal terminals and non-neuronal cells more exposed to the plate thermal insult. On the other side of the spectrum, older rats have thicker paws (more keratinized) and less nerve penetration, hence protecting the animal from the noxious heat insult and collaborating with the delay in the presentation of nociceptive behavior observed at the P60.

Additionally, we did not find significant differences in sensory function between paws of experimental groups when assessed by the electronic von Frey test, excepting for the HI group at P14 where the left paw had lower withdrawal threshold in comparison to the right. The von Frey filaments test is used in animal models to evaluate allodynia (Wegert et al. 1997). It has been proposed that tactile hypersensitivity can be a consequence of functional and phenotypic switching in primary afferent neurons innervating the inflamed tissue, e to the pattern of excitation produced in the spinal neurons. The last presumption was partially confirmed by the finding that a subpopulation of A beta primary afferent neurons begins to express substance P following conditioning inflammation. Thus, it enhances the synaptic transmission in the spinal cord exaggerating the central response to innocuous stimuli (Ma and Woolf, 1996; Neumann et al., 1996). Although other research groups had previously studied the alterations in sensory function induced by HI (Bona et al., 1998; Hunter et al., 2000; Lim et al., 2008) few of them used von Frey filaments test. Previous studies reported significant differences in infarct volumes and in the percent weight borne by the paretic limb in Wistar rats submitted to transient ischemia temporarily occluding the middle cerebral artery during one, two and three hours. But, there were not significant differences between paws withdrawal threshold assessed by the von Frey test (Lim et al., 2008). And, they hypothesized that sensory alterations induced by their stroke model (medial carotid artery occlusion) could be more subtle than those elicited in the allodynia model, making them undetectable for the von Frey test (Lim et al., 2008).

On the other hand, we did not find significant differences in sensory function between paws when assessed by the electronic von Frey test in the postnatal days evaluated (i.e. P14, P30, P60). Since rats did not have significant differences in weights during each postnatal day assessed, they are considered to be comparable and the influence of the weight in the von Frey test results can be disregarded. Even so, our group detected a significant reduction in the withdrawal threshold of the paw ipsilateral to the HI lesion at P14 although no evidence of it was found in the subsequent evaluation (i.e. at P30).

Beyond this, we also observed that the withdrawal threshold assessed by the von Frey test increased with age, corroborating our results from the hot plate test. This effect could also be attributed to the higher keratinization and less nerve penetration of the paws that occur as with the increased age of the rats. In other strain of rats (Brown Norway) also has been described that older rats present reduced mechanical sensitivity compared to their younger counterpart (Chaloner et al., 2013), which at the same time is consistent with clinical observations of increased somatic pain thresholds in old patients (Gibson et al., 2001).

In addition, in this study, irrespective of the experimental group, it was observed a significant increase in BDNF serum levels at every age assessed, which can be considered a reliable surrogate marker of its production in the central nervous system (CNS) consistent with the nervous mass growth with aging animal. Although, the BDNF is mainly originated in the CNS, it is capable of crossing the brain-blood barrier, allowing up to 75% of its serum levels to be representative of CNS events (Rasmussen et al., 2009). Different roles have been attributed to the BDNF, including neuronal plasticity and survival (Park and Poo, 2013) due to its ability to promote neurotransmitters differentiation and cellular communication enhancement (Zheng et al., 2012). Despite its attributed role in regeneration and protection neuronal, no significant differences were observed in BDNF serum levels between experimental groups. If some change occurred in this neurotrophin levels due to the hypoxic

and/or ischemic insult, it could have appeared earlier than the seven post-injury days of the first assessment; or it could have been restricted by the blood-brain barrier and this was undetected in the our peripheral quantifications. Further experiments aimed to BDNF measure directly in the central compartment and the bloodstream in the hyper-acute and acute phase should be conducted in order to clarify this point.

TNF- α has been associated as a synaptic signaling modulator and neuronal plasticity activator as part of the cascade of cytotoxic and inflammatory events caused by the HI insult in the brain (O'Connor, 2013). It has been found elevated in swine (Tam et al., 2007), humans (Ryan et al., 2006) and rats (Savransky et al., 2007) submitted to hypoxia. However, in this study no significant difference was observed in TNF- α serum levels between experimental groups. On the other hand, we showed an elevated TNF- α serum levels at P14 in comparison with the other assessed ages. Similar to BDNF, it is possible that TNF- α serum levels might have reached higher concentrations during the initial post-injury period, so that the first evaluation performed caught only the tail of the serum peak. This hypothesis is in agreement with previous descriptions that indicated that TNF- α serum levels can remain elevated in the brain tissue during around 24 hours after an ischemic insult (Liu et al., 1994; Bullock et al., 1995). Moreover, few have been written about TNF- α ability to cross the brain-blood barrier (quais??).

Elevated LDH serum levels have been previously associated to neonatal hypoxia (Karlsson et al., 2006; Lackmann et al., 1993; Zanardo et al., 1985). Recent works demonstrated that when measured up to twelve hours after birth, LDH levels above 1049 U/L are 100% sensible and 98% specific to detect hypoxic-ischemic encephalopathy (Karlsson et al., 2010). Even having passed seven days from the hypoxic insult, at P14 LDH serum levels were still close enough to the cutoff value described in humans with 100% sensitivity for hypoxic-ischemic encephalopathy. Highlighting LDH specificity, in our experiment only the

hypoxia group showed a significant difference to controls. In addition, in our study was observed a significant difference between P14 and P60 LDH levels. Since LDH have also potential for prognosis evaluation in HI encephalopathy (Thoresen et al., 2012), future experiments involving therapeutic approaches should consider LDH inclusion as surrogate marker for neuronal damage.

Thus, it is possible that the sensory changes induced by our experimental model were lesser than the detection limit of the test. It is also plausible to hypothesize that neuroplasticity processes were capable of coping sufficiently with the sensory impairment induced by the intervention in a time inferior to seven days, which was the interval between exposure to the insult and the first assessment. We suggested that both phenomenon could be occurring together, although the first hypothesis presented could have more weight since other authors have reported similar findings even when assessing sensory function the same day of an ischemic insult (Lim et al., 2008). In order to understand with greater precision the pathophysiologic and functional changes occurring in the sensory function after a HI insult, more accurate tests oriented to its study in this particular experimental model should be considered. Other authors (Hunter et al., 2000) have successfully used the SHIRPA (mouse phenotypic assessment protocol) (Rogers et al., 1997) to show that mouse with acute ischemic damage develop plenty of behavioral changes in comparison to healthy animals, however the information regarding specifically to sensory function and its validity to assess its evolution further than the seven days described should be deepened.

The limitation of the animal studies concerns the potential for their results to be translated. For instance, all experiments in this study were conducted in male rats, complicating the translation of the results to both genders in humans, particularly because the nociceptive process is altered by modulations in hormone state (Ribeiro et al., 2005). Our limitations also could be related to fact that our experiment involved plenty of nociceptive,

biochemical and immunohistochemical assessments, each one of them evaluated in six different experimental groups at three different moments. Such complex model demanded multiple comparisons, which although always properly adjusted with the described statistical methods, still have a chance of incurring in a type I error.

5. Conclusion

In conclusion, our results demonstrate the importance to extending studies related to HI in a maturation period of CNS, where different systems are in processes of development or maturing. In the present study, we observed long-term alteration in *c-fos* activation and LDH serum levels after hypoxia at P7. Further studies are necessary to elucidate the real mechanisms involved in these alterations.

Acknowledgements

This work was supported by the Brazilian funding agencies: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (Dr. I.L.S.Torres, Dr W. Caumo, V.L. Scarabelot); Graduate Research Group (GPPG) at Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Dr I.L.S. Torres– Grant # 10-0285); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES (A. Souza, A.C. Souza, L.F. Medeiros, C. Oliveira). PROPESQ/UFRGS; FAPERGS/PRONEM (ILS Torres –Grant #11/2050); Edital Universal/ CNPq (ILS Torres – Grant #2011-5).

References

- Anand KJ, Hickey PR (1987), Pain and its effects in the human neonate and fetus. *N Engl J Med* 317:1321–1329.
- Anand KJ (1998), Clinical importance of pain and stress in preterm neonates. *Biol Neonate* 73:1-9.
- Andrews K, Fitzgerald M (1997), Biological barriers to paediatric pain management. *Clin J Pain* 13:138–143.
- Anseloni VC, He F, Novikova SI, Turnbach Robbins M, Lidow IA, Ennis M, Lidow MS (2005), Alterations in stress-associated behaviors and neurochemical markers in adult rats after neonatal short-lasting local inflammatory insult. *Neuroscience* 131: 635–645.
- Arteni NS, Salgueiro J, Torres I, Achaval M, Netto CA (2003), Neonatal cerebral hypoxia-ischemia causes lateralized memory impairments in the adult rat. *Brain Res* 973:171-178.
- Arteni NS, Pereira LO, Rodrigues AL, Lavinsky D, Achaval ME, Netto CA (2010), Lateralized and sex-dependent behavioral and morphological effects of unilateral neonatal cerebral hypoxia-ischemia in the rat. *Behav Brain Res* 210:92-98.
- Baker H, Lindsay J, Weisbroth, S (1979), *The Laboratory Rat*. (Baker H, Lindsay J), pp 79-82. New York: Academic Press.
- Bartha AI, Shen J, Katz KH, Mischel RE, Yap KR, Ivacko JA, Andrews EM, Ferriero DM, Ment LR, Silverstein FS (2007), Neonatal seizures: multicenter variability in current treatment practices. *Pediatr Neurol* 37:85-90.
- Berge OG, Garcia-Cabrera I, Hole K (1988), Response latencies in the tail-flick test depend on tail skin temperature. *Neurosci Lett* 86:284-288.
- Berger R, Garnier Y, Jensen A (2002), Perinatal brain damage: underlying mechanisms and neuroprotective strategies. *J Soc Gynecol Investig* 9:319-328.

Bhutta AT, Rovnaghi C, Simpson PM, Gossett JM, Scalzo FM, Anand KJ (2001), Interactions of inflammatory pain and morphine in infant rats. Long-term behavioral effects. *Physiol Behav* 73:51-58.

Bona E, Hagberg H, Løberg EM, Bågenholm R, Thoresen M (1998), Protective effects of moderate hypothermia after neonatal hypoxia-ischemia: short- and long-term outcome. *Pediatr Res* 43:738-745.

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

Castilho VM, Macedo CE, Brandão ML (2002), Role of benzodiazepine and serotonergic mechanisms in conditioned freezing and antinociception using electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray as unconditioned stimulus in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 165:77-85.

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

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

Dragunow M, Faull R (1989), The use of c-fos as a metabolic marker in neuronal pathway tracing. *Journal of Neuroscience Methods* 29: 261–265.

Fang AY, Gonzalez FF, Sheldon RA, Ferriero DM (2013), Effects of combination therapy using hypothermia and erythropoietin in a rat model of neonatal hypoxia-ischemia. *Pediatr Res* 73:12-17.

Fecho K, Nackley AG, Wu Y, Maixner W (2005), Basal and carrageenan-induced pain behavior in Sprague-Dawley, Lewis and Fischer rats. *Physiol Behav* 85:177-186.

Fitzgerald MJ (1966), Perinatal changes in epidermal innervation in rat and mouse. *J Comp Neurol* 126:37-41.

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

Gundersen HJ (1977), Notes on the estimation on the numerical density of arbitrary profiles: the edge effect. *J Microsc* 111:219–223.

Guy ER, Abbott FV (1992), The behavioral response to formalin in preweanling rats. *Pain* 51:81–90.

Hamrick SE, Ferriero DM (2003), The injury response in the term newborn brain: can we neuroprotect? *Curr Opin Neurol* 16:147-154.

Hermansen CL, Lorah KN (2007), Respiratory distress in the newborn. *Am Fam Physician* 76:987-994.

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

Jacobs SE, Berg M, Hunt R, Tarnow-Mordi WO, Inder TE, Davis PG (2013), Cooling for newborns with hypoxic ischaemic encephalopathy. *Cochrane Database Syst Rev* 1:CD003311.

Jensen FE (2006), Developmental factors regulating susceptibility to perinatal brain injury and seizures. *Curr Opin Pediatr* 18:628-33.

Karlsson M, Blennow M, Nemeth A, Winbladh B (2006), Dynamics of hepatic enzyme activity following birth asphyxia. *Acta Paediatr* 95: 1405–1411.

Karlsson M, Wiberg-Itzel E, Chakkarapani E, Blennow M, Winbladh B, Thoresen M (2010), Lactate dehydrogenase predicts hypoxic ischaemic encephalopathy in newborn infants: a preliminary study. *Acta Paediatr* 99:1139-1144.

King TE, Joynes RL, Grau JW (1997), Tail-flick test: II. The role of supraspinal systems and avoidance learning. *Behav Neurosci* 111:754-767.

Kostovic I, Rakic P (1990), Developmental history of the transient subplate zone in the visual and somatosensory cortex of the macaque monkey and human brain. *J Comp Neurol* 297:441-470.

Lackmann GM, Tollner U, Mader R (1993), Serum enzyme activities in full-term asphyxiated and healthy newborns: enzyme kinetics during the first 144 hours of life. *Enzyme Protein* 47:160–172.

Le Bars D, Gozariu M, Cadden SW (2001), Animal models of nociception. *Pharmacol Rev* 53:597-652.

Lehner M, Taracha E, Skórzewska A, Maciejak P, Wisłowska-Stanek A, Zienowicz M, Szyndler J, Bidziński A, Płaźnik A (2006), Behavioral, immunocytochemical and biochemical studies in rats differing in their sensitivity to pain. *Behav Brain Res* 171:189-198.

Levine S (1960), Anoxic-ischemic encephalopathy in rats. *Am J Pathol* 36:1-17.

Lim SH, Lee JS, Lee JI, Im S, Ko YJ, Kim HW (2008), The quantitative assessment of functional impairment and its correlation to infarct volume in rats with transient middle cerebral artery occlusion. *Brain Res* 1230:303-109.

Low JA (1993), The relationship of asphyxia in the mature fetus to long-term neurologic function. *Clin Obstet Gynaecol* 36:82–90.

Ma QP, Woolf CJ (1996), Progressive tactile hypersensitivity: an inflammation-induced incremental increase in the excitability of the spinal cord. *Pain* 67:97–106

Marsh DF, Hatch DJ, Fitzgerald M (1997), Opioid system and the newborn. *Br J Anaesth* 79:787-795.

Medeiros, LF (2010), Efeito da administração de anestésicos gerais, associado ou não ao procedimento cirúrgico, sobre: parâmetros comportamentais, atividades e-ntpdásica e de

ecto-5'-nucleotidase em medula espinhal de ratos. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia.

Nakamura H, Katayama Y, Kawakami Y (2010), Hippocampal CA1/subiculum-prefrontal cortical pathways induce plastic changes of nociceptive responses in cingulate and prelimbic areas. *BMC Neurosci* 11:100.

Necker R, Hellon RF (1978), Noxious thermal input from the rat tail: modulation by descending inhibitory influences. *Pain* 4:231-242.

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

Neumann S, Doubell TP, Leslie T, Woolf CJ (1996), Inflammatory pain hypersensitivity mediated by phenotypic switch in myelinated primary sensory neurons. *Nature* 384:360-364

O'Connor JJ (2013), Targeting tumour necrosis factor- α in hypoxia and synaptic signalling. *Ir J Med Sci* 182:157-162.

Park H, Poo MM (2013), Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. *Nat Rev Neurosci* 14:7-23

Paxinos G, Watson C (2008) *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 6th ed. Academic Press, San Diego.

Ramirez MR, Muraro F, Zylbersztein DS, Abel CR, Arteni NS, Lavinsky D, Netto CA, Trindade VM (2003), Neonatal hypoxia-ischemia reduces ganglioside, phospholipid and cholesterol contents in the rat hippocampus. *Neurosci Res* 46:339-347.

Randich A, Uzzell T, DeBerry JJ, Ness TJ (2006), Neonatal urinary bladder inflammation produces adult bladder hypersensitivity. *J Pain* 7:469-479.

Rasmussen P, Brassard P, Adser H, Pedersen MV, Leick L, Hart E, Secher NH, Pedersen BK, Pilegaard H (2009), Evidence for a release of brain-derived neurotrophic factor from the brain during exercise. *Exp Physiol* 94:1062-1069.

Reichert APS, Silva SLF, Oliveira JM (2000), Dor no recém-nascido: uma realidade a ser considerada. *Rev Nursing* 3:28-30.

Ribeiro S, Yang P, Reyes-Vazquez C, Swann A, Dafny N (2005), Sex differences in tail-flick latency of non-stressed and stressed rats. *Int J Neurosci* 115:1383-1395.

Rice JE, Vannucci RC, Brierley JB (1981), The influence of immaturity on hypoxic–ischemic brain damage in the rat. *Ann Neurol* 9:131–141.

Rogers DC, Fisher EM, Brown SD, Peters J, Hunter AJ, Martin JE (1997), Behavioral and functional analysis of mouse phenotype: SHIRPA, a proposed protocol for comprehensive phenotype assessment. *Mamm Genome* 8:711-713.

Ruda MA, Ling QD, Hohmann AG, Peng YB, Tachibana T (2000), Altered nociceptive neuronal circuits after neonatal peripheral inflammation. *Science* 289:628–631.

Ryan S, Taylor CT, McNicholas WT (2006), Predictors of elevated nuclear factor-kappaB-dependent genes in obstructive sleep apnea syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 174:824–830.

Savransky V, Bevans S, Nanayakkara A, Li J, Smith PL, Torbenson MS, Polotsky VY (2007), Chronic intermittent hypoxia causes hepatitis in a mouse model of diet-induced fatty liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 293:G871-G877.

Silveira PP, Portella AK, Clemente Z, Gamaro GD, Dalmaz C (2005), The effect of neonatal handling on adult feeding behavior is not an anxiety-like behavior. *Int J Dev Neurosci* 23:93-9.

Silveira PP, Portella AK, Assis SA, Nieto FB, Diehl LA, Crema LM, Peres W, Costa G, Scorza C, Quillfeldt JA, Lucion AB, Dalmaz C (2010), Early life experience alters

behavioral responses to sweet food and accumbal dopamine metabolism. *Int J Dev Neurosci* 28:111-118.

Silveira PP, Portella AK, Benetti Cda S, Zugno AI, Scherer EB, Mattos CB, Wyse AT, Lucion AB, Dalmaz C (2011), Association between Na⁺,K⁺-ATPase activity and the vulnerability/resilience to mood disorders induced by early life experience. *Neurochem Res* 36:2075-2082.

Tam CS, Wong M, Tam K, Aouad L, Waters KA (2007), The effect of acute intermittent hypercapnic hypoxia treatment on IL-6, TNF-alpha, and CRP levels in piglets. *Sleep* 30:723-727.

Tanaka T (2004), The relationships between litter size, offspring weight and behavioral development in laboratory mice. *Mammal Study* 29:147-153

Thoresen M, Liu X, Jary S, Brown E, Sabir H, Stone J, Cowan F, Karlsson M (2012), Lactate dehydrogenase in hypothermia-treated newborn infants with hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Acta Paediatr* 101:1038-1044.

Tulchinsky E (2000), Fos family members: regulation, structure and role in oncogenic transformation. *Histol Histopathol* 15: 921–928.

Tuor UI, Del Bigio MR, Chumas PD (1996), Brain damage due to cerebral hypoxia/ischemia in the neonate: pathology and pharmacological modification. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 8:159-193.

van Handel M, Swaab H, de Vries LS, Jongmans MJ (2007), Long-term cognitive and behavioral consequences of neonatal encephalopathy following perinatal asphyxia: a review. *Eur J Pediatr* 166:645-654

VanElzakker M, Fevurly RD, Breindel T, Spencer RL (2008), Environmental novelty is associated with a selective increase in Fos expression in the output elements of the hippocampal formation and the perirhinal cortex. *Learn Mem* 15:899–908.

Van Praag H, Frenk H (1991), Evidence for opiate tolerance en newborn rats. *Dev Brain Res* 60:99-102.

Volpe JJ (2001), Neurobiology of periventricular leukomalacia in the premature infant. *Pediatr Res* 50:553-562.

Volpe JJ (2008), *Neurobiology of the newborn*, 5th ed., Saunders Elsevier, Philadelphia, PA.

Wang G, Ji Y, Lidow MS, Traub RJ (2004), Neonatal hind paw injury alters processing of visceral and somatic nociceptive stimuli in the adult rat. *J Pain* 5:440–449.

Wei F, Xu Z, Qu Z, Milbrandt J, Zhuo M (2000), Role of EGR1 in hippocampal synaptic enhancement induced by tetanic stimulation and amputation. *J Cell Biol* 149:1325-1334.

Wegert S, Ossipov MH, Nichols ML, Bian D, Vanderah TW, Malan TP Jr, Porreca F (1997), Differential activities of intrathecal MK-801 or morphine to alter responses to thermal and mechanical stimuli in normal or nerve-injured rats. *Pain* 71:57–64.

Winkelmann-Duarte EC, Padilha-Hoffmann CB, Martins DF, Schuh AF, Fernandes MC, Santin R, Merlo S, Sanvitto GL, Lucion AB (2011), Early-life environmental intervention may increase the number of neurons, astrocytes, and cellular proliferation in the hippocampus of rats. *Exp Brain Res* 215:163-172.

Zanardo V, Bondio M, Perini G, Temporin GF (1985), Serum glutamic-oxaloacetic transaminase and glutamic-pyruvic transaminase activity in premature and full-term asphyxiated newborns. *Biol Neonate* 47:61–69.

Zhao C, Tall JM, Meyer RA, Raja SN (2004), Antiallodynic effects of systemic and intrathecal morphine in the spared nerve injury model of neuropathic pain in rats. *Anesthesiology* 100:905-911.

Zheng F, Zhou X, Moon C, Wang H (2012), Regulation of brain-derived neurotrophic factor expression in neurons. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol* 4:188-200.

Legends

Figure 1. Thermal nociceptive response after hypoxic and/or ischemic insult assessed at ages P14, P30 and P60. Data is expressed as the Mean \pm SEM. C: control, HI: hypoxia-ischemia, I: ischemia, H: hypoxia, SI: sham-ischemia, SH: sham-hypoxia. (A) Tail Flick test.

(B) Hot plate test.

&Significantly different from the other ages (two-way ANOVA/Bonferroni $P<0.05$).

**Significantly different from the groups at P14 (two-way ANOVA/Bonferroni $P<0.05$).

Figure 2. Mechanical nociceptive response after hypoxic and/or ischemic insult assessed with the electronic Von Frey test at ages P14, P30 and P60. Data were expressed as the Mean \pm SEM. C: control, HI: hypoxia-ischemia, I: ischemia, H: hypoxia, SI: sham-ischemia, SH: sham-hypoxia.

(A) P14, (B) P30, (C) P60. There is no interaction or group effect (two-way ANOVA, $P>0.05$) for the paws. The age effect was observed for both paws (two-way ANOVA, $P<0.05$).

Significant difference between right and left paw of the same animal (Paired t test, $P=0.012$, $n=8$).

Figure 3. Hippocampus *c-Fos* neuronal activation after hypoxic and/or ischemic insult assessed at ages P14, P30 and P60. Data is expressed as the Mean \pm SEM. C: control, HI: hypoxia-ischemia, I: ischemia, H: hypoxia, SI: sham-ischemia, SH: sham-hypoxia.

(A) Hippocampal CA1 area at P14; (B) Hippocampal CA1 area at P30; (C) Hippocampal CA1 area at P60.

Hippocampus Left CA1 area: there is no interaction between group and age (two-way ANOVA, $P > 0.05$). There is group effect (two-way ANOVA, $F_{(5,102)} = 29.24$, $P = 0.001$), where HI, I and H had lower activation than other groups (two-way ANOVA/Bonferroni $P < 0.05$). There is age effect (two-way ANOVA, $F_{(2,105)} = 5.04$, $P = 0.008$).

Hippocampus right CA1 area: there is no interaction between group and age (two-way ANOVA, $P > 0.05$). There is group effect (two-way ANOVA, $F_{(5,102)} = 5.88$, $P = 0.001$). There is age effect (two-way ANOVA, $F_{(2,105)} = 7.23$, $P = 0.001$).

(D) Hippocampal dentate gyrus (DG) at P14 (E) Hippocampal DG at P30 (F) DG of the hippocampus at P60.

Hippocampus left DG: without interaction between group and age neither age effect (two-way ANOVA, $P > 0.05$). There is group effect (two-way ANOVA, $F_{(5,102)} = 6.14$, $P = 0.001$), HI, I, H had lower activation than control (all the ages together).

Hippocampus right DG: there is no interaction between group and age, neither group effect and age effect (two-way ANOVA, $P > 0.05$ for all).

*Significant difference in relation to control group (two-way ANOVA/Bonferroni, $P < 0.05$).

Significant difference in relation to the contralateral hippocampus (paired t test, $P < 0.05$).

Figure 4. Biomarkers serum levels after hypoxia-ischemia insult assessed at ages P14, P30 and P60. Data is expressed as the Mean \pm SEM. C: control, HI: hypoxia-ischemia, I: ischemia, H: hypoxia, SI: sham-ischemia, SH: sham-hypoxia.

(A) BDNF serum level: there is no significant effect of the groups, neither interaction between age and group (two-way ANOVA). There is age effect (two-way ANOVA, $F_{(2,127)} = 187.33$, $P = 0.001$), $P14 < P30 < P60$ (two-way ANOVA/Bonferroni, $P = 0.001$).

(B) TNF- α serum levels: there is no significant effect of the groups, neither interaction between age and groups (two-way ANOVA, $P > 0.05$ for all). There is age effect (two-way ANOVA, $F_{(2,79)} = 3.15$, $P = 0.049$), $P_{14} > P_{60}$ and $P_{30} = P_{14}$ and P_{60} (two-way ANOVA/Bonferroni, $P = 0.001$).

(C) LDH serum levels: there is no interaction between group (two-way ANOVA, $P > 0.05$). There are group effect (two-way ANOVA, $F_{(5,100)} = 6.94$, $P = 0.001$) and age effect (two-way ANOVA, $F_{(2,103)} = 3.12$, $P = 0.049$). The groups with hypoxia had decreased LDH serum levels in comparison to the C, HI, SH groups (two-way ANOVA/Bonferroni, $P = 0.001$). There is age effect, where $P_{60} < P_{14}$ (two-way ANOVA/Bonferroni, $P = 0.001$) and $P_{30} = P_{14}$ and $P_{30} = P_{60}$ (two-way ANOVA/Bonferroni, $P > 0.05$).

Figures:

Figure 1

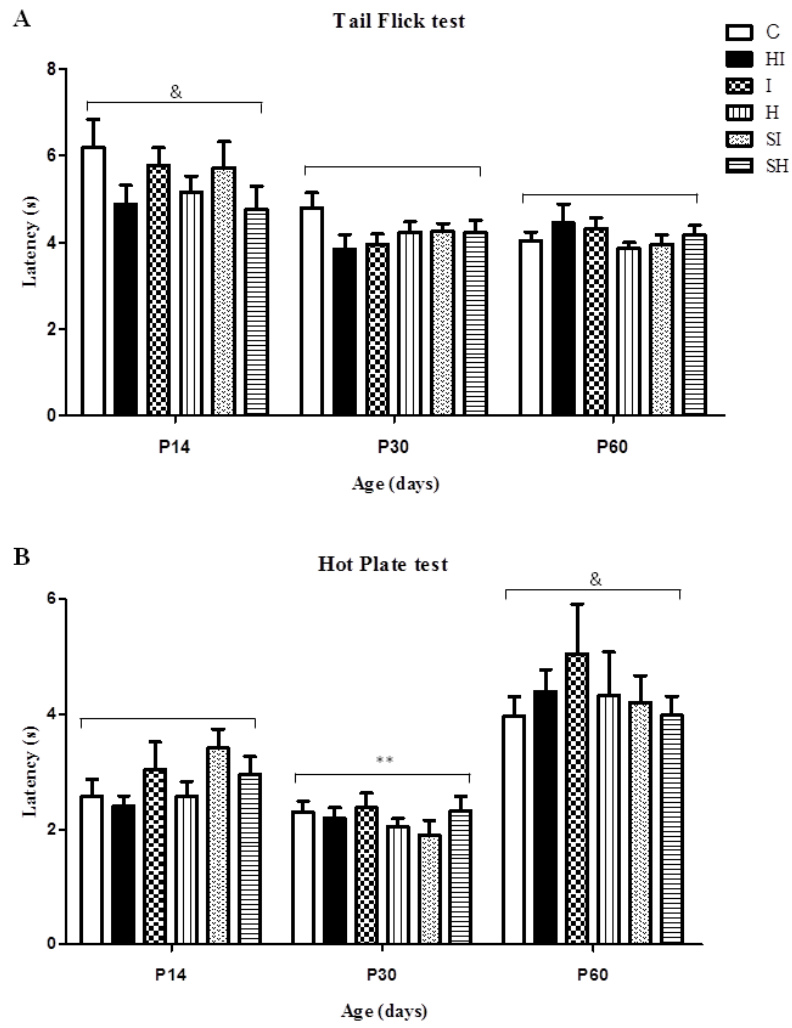


Figure 2

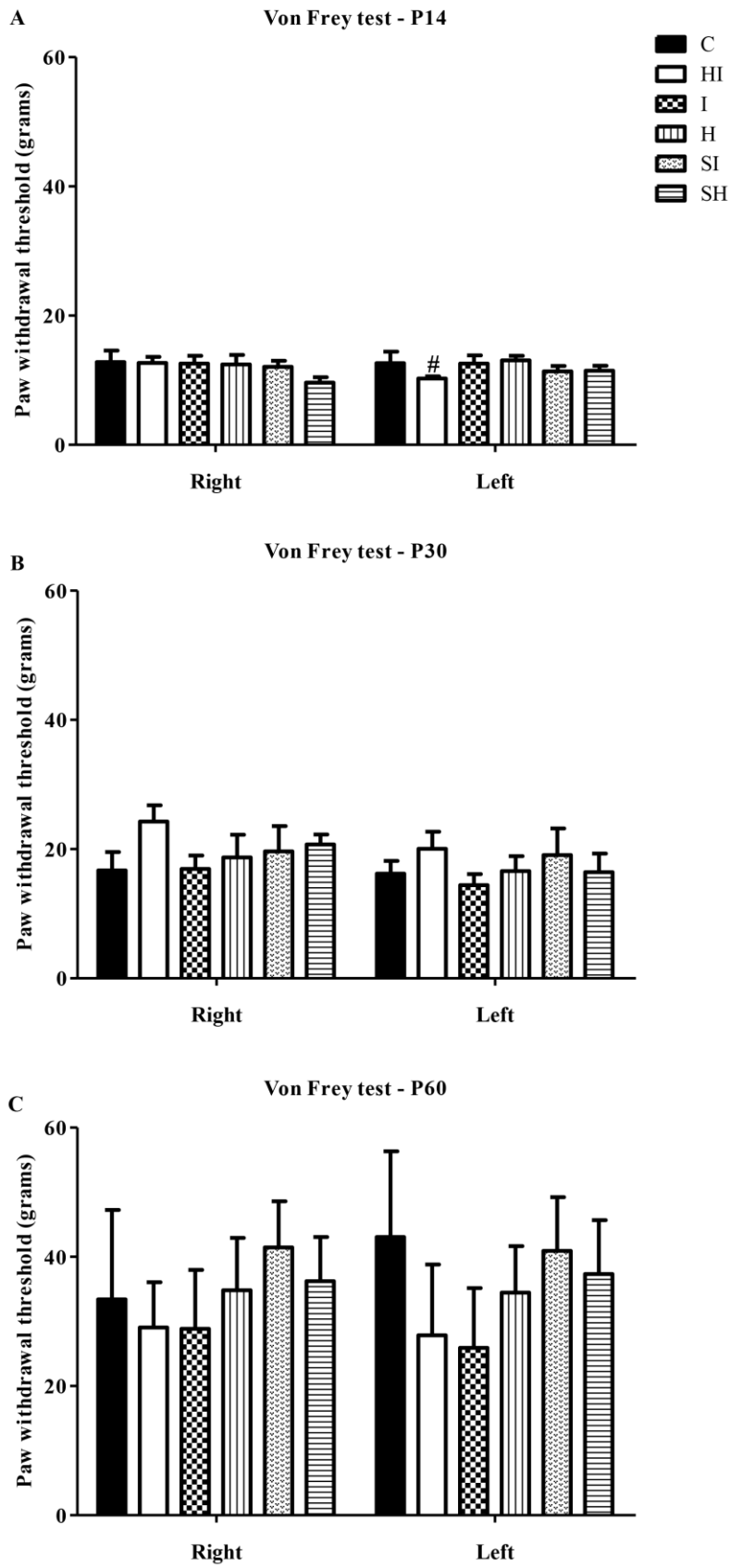


Figure 3

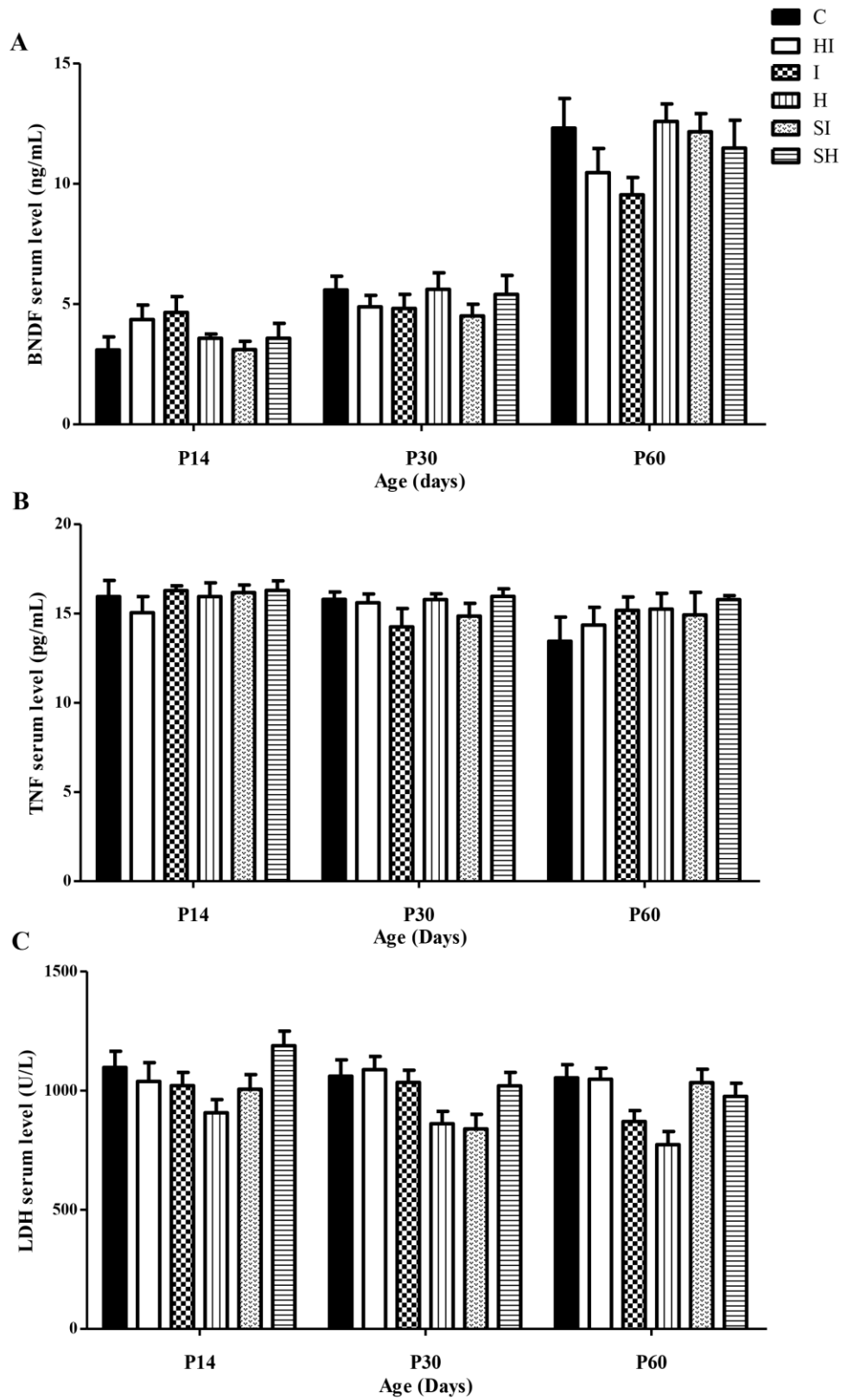
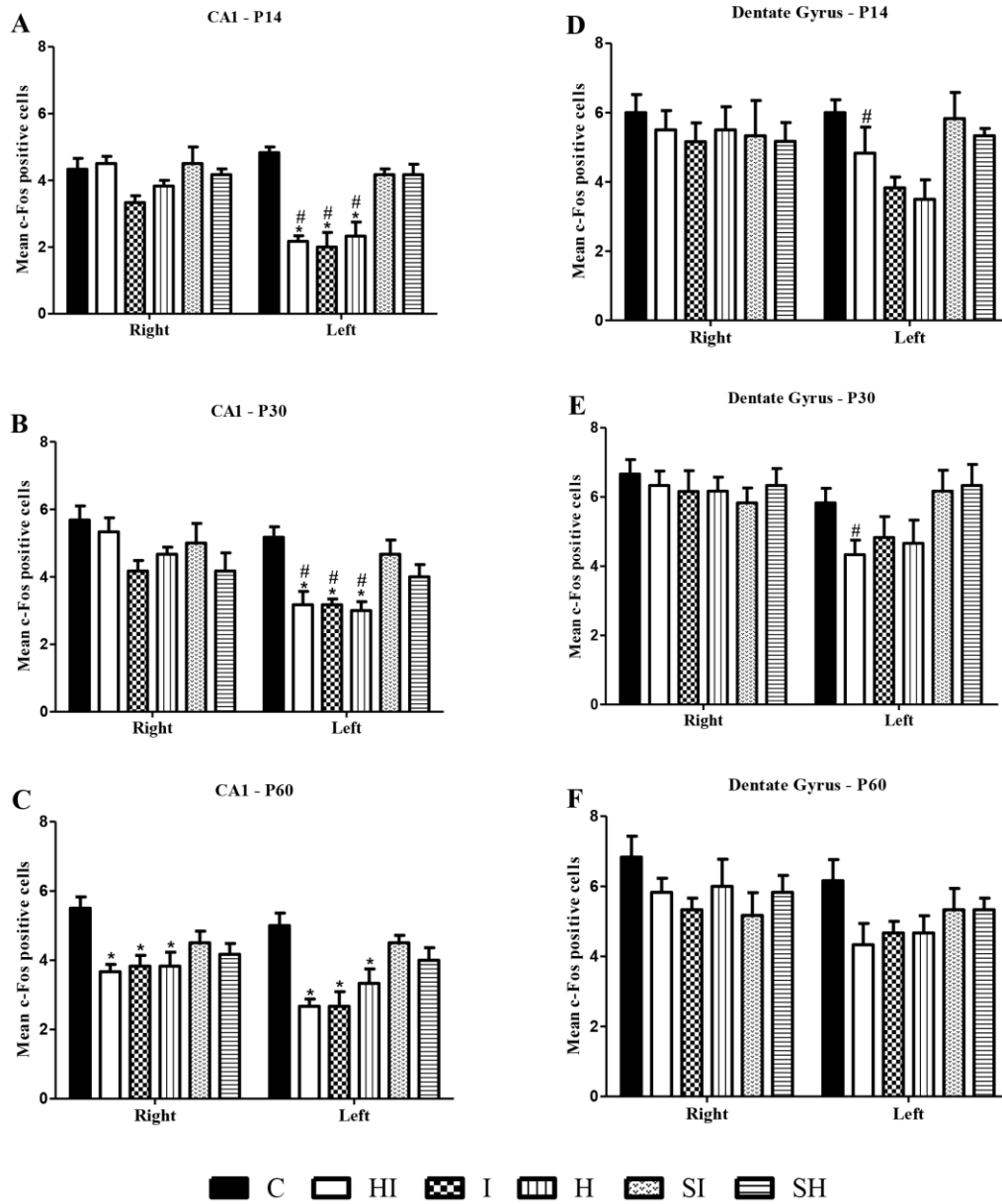


Figure 4



6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos com esta tese de doutorado permitem emitir as seguintes considerações:

- ✓ a lesão hipóxica e/ou isquêmica produzida pelo modelo utilizado nesta dissertação não alterou a nocicepção térmica avaliada pelo TFL e placa-quente, nem nocicepção mecânica avaliada pelo teste de von Frey;
- ✓ as avaliações ontogênicas quanto à sensibilidade térmica e mecânica nos permitem concluir que:
 - quanto maior a idade dos animais menor o limiar de nocicepção avaliado no teste de tail flick;
 - o limiar nociceptivo avaliado no teste da placa quente varia com a idade atingindo o menor limiar aos 30º dia (P30);
 - quanto maior a idade maior menor e a alodinia mecânica avaliada no teste de von Frey;
- ✓ o modelo experimental proposto não induziu alterações significativas no BDNF sérico;
- ✓ o BDNF apresentou efeito ontogênico mostrando maiores níveis em P60;
- ✓ o TNF- α , citocina pro-inflamatória, não foi modificado com a lesão hipóxica e/ou isquêmica;
- ✓ o TNF- α apresentou efeito ontogênico mostrando maiores níveis em P14;

- ✓ os ratos submetidos a hipóxia neonatal apresentaram menores níveis da enzima LDH, importante marcador de dano celular, em comparação com controles, hipóxia-isquemia e sham-hipóxia;
- ✓ a enzima LDH apresentou efeito ontogênico mostrando menores níveis em P14;
- ✓ a lesão hipóxica e/ou isquêmica, induzida pelo modelo animal utilizado nesta tese, gerou redução significativa no número de neurônios ativados avaliados pela marcação da proteína *c-fos* na área CA1 do hipocampo ipsilateral a lesão, tal efeito foi observado até o 60º dia pós-natal;
- ✓ em P60 foi observada diminuição de neurônios ativos também no hipocampo contralateral;
- ✓ no giro dentado do hipocampo não foi observado efeito da lesão hipóxica e/ou isquêmica, no entanto foi observada uma lateralização da lesão no grupo hipóxia-isquemia em P14, onde os animais desse grupo apresentaram diminuição em relação a mesma região contralateral, o mesmo foi observado em P30;
- ✓ o insulto hipóxico e/ou isquêmico induziu alterações neuronais em hipocampo que persistem pelo menos até o P60;
- ✓ estudos que elucidem melhor os mecanismos dessas modificações devem ser incentivados para possibilitar desenvolvimento de técnicas de tratamento precoce das vítimas deste tipo de lesão.

7. ANEXOS

A) Aprovação do Comitê de Ética



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

A Comissão Científica e a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/HCPA) analisaram o projeto:

Projeto: 100285

Versão do Projeto: 30/11/2010

Pesquisadores:

CARLOS ALEXANDRE NETTO

WOLNEI CAUMO

NICE SARMENTO ARTENI

LICIANE FERNANDES MEDEIROS

IZABEL CRISTINA CUSTODIO DE SOUZA

STEFANIA GIOTTI CIOATO

ANDRESSA DE SOUZA


FERNANDA URRUTH FONTELLA

IRACI LUCENA DA SILVA TORRES

Título: EFEITOS DE INSULTO HIPÓXICO-ISQUÊMICO PERINATAL NAS RESPOSTAS NOCICEPTIVA, COMPORTAMENTAIS E BIOQUÍMICAS AVALIADAS EM CURTO, MÉDIO E LONGO PRAZO.

Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08/10/2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais. Os membros da CEUA/HCPA não participaram do processo de avaliação de projetos onde constam como pesquisadores. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada imediatamente a CEUA/HCPA.

Porto Alegre, 12 de janeiro de 2011.


Alessandro Bersch Osvaldt
Coordenador da CEUA/HCPA

B) Produção científica durante o período de doutoramento (2010-2013).**Artigos completos publicados em periódicos**

1. SCHWERTNER, ANDRÉ, CONCEIÇÃO DOS SANTOS, CLAUDIA C., COSTA, GISLENE DALFERTH, DEITOS, ALÍCIA, **SOUZA, A.**, SOUZA, IZABEL CRISTINA CUSTODIO DE, S. Torres, Iraci L., Torres Ida S, DA CUNHA FILHO, JOÃO SABINO L., CAUMO, Wolnei. Efficacy of melatonin in the treatment of endometriosis: a phase II, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Pain (Amsterdam. Print)*. v.664, p.S0304-3959(13) - 2013.
2. MACEDO, I.C., MEDEIROS, L.F., OLIVEIRA, C., OLIVEIRA, C.M., ROZISKY, J.R., SCARABELOT, V.L., **SOUZA, A.**, SILVA, F.R., SANTOS, V.S., CIOATO, S.G., CAUMO, W., TORRES, I.L.S. Cafeteria diet-induced obesity plus chronic stress alter serum leptin levels. *Peptides (New York, N.Y. 1980)*. v.38, p.189 - 196, 2012.
3. MEDEIROS, L. F., SOUZA, A. C., **SOUZA, A.**, CIOATO, S.G., SCARABELOT, V. L., CAUMO, W., FERNANDES, L. C., TORRES, I. L. S. Fentanyl administration in infant rats produces long-term behavioral responses. *International Journal of Developmental Neuroscience*. v.30, p.25 - 30, 2012.
4. MEDEIROS, LICIANE FERNANDES, DE SOUZA, IZABEL CRISTINA CUSTODIO, VIDOR, LILIANE PINTO, **DE SOUZA, ANDRESSA**, DEITOS, ALÍCIA, VOLZ, MAGDALENA SARAH, FREGNI, FELIPE, CAUMO, WOLNEI, TORRES, IRACI L. S.

Neurobiological Effects of Transcranial Direct Current Stimulation: A Review. *Frontiers in Psychiatry*. , v.3, p.110 - 2012.

5. SPEZIA ADACHI, LAUREN NAOMI, CAUMO, WOLNEI, LASTE, GABRIELA, FERNANDES MEDEIROS, LICIANE, RIPOLL ROZISKY, JOANNA, **DE SOUZA, ANDRESSA**, FREGNI, FELIPE, TORRES, IRACI L.S. Reversal of chronic stress-induced pain by transcranial direct current stimulation (tDCS) in an animal model. *Brain Research*. v.1489, p.17 – 26 – 2012.
6. SCARABELOT, V. L., GUTIERREZ, L. M. O., **SOUZA, A.**, OLIVEIRA, M. G., CHAVES, A. C. M., MUNERATO, M. C., HIDALGO, M.P., CAUMO, W., TORRES, I. L. S. Avaliação de fatores associados ao diagnóstico de queimação bucal: um estudo preliminar. *Revista HCPA (Online)*. , v.31, p.318 - 325, 2011.
7. **SOUZA, A.**, MEDEIROS, A.R., SOUZA, A. C., WINK, M. R., SIQUEIRA, I. R., HIDALGO, M.P., FERNANDES, L. C., FERREIRA, M. B. C., TORRES, I. L. S. Avaliação do impacto da exposição a agrotóxicos sobre a saúde de população rural. Vale do Taquari (RS, Brasil). *Ciência & Saúde Coletiva (Online)*. , v.16, p.3519 - 3528, 2011.
8. DAUDT, L. D., CAVAGNI, J., GAIO, E. J., **SOUZA, A.**, TORRES, I. L. S., FERREIRA, M. B. C., ROSING, C. K. Effect of inhaled corticosteroid on TNF- $\hat{\pm}$ production and alveolar bone loss in Wistar rats. *Archives of Oral Biology*. v.56, p.1398 - 1406, 2011.
9. **SOUZA, A.**, DETANICO, B.C., MEDEIROS, L. F., ROZISKY, J.R., CAUMO, W., HIDALGO, M.P., BATTASTINI, A. M., TORRES, I. L. S. Effects of restraint stress on the

daily rhythm of hydrolysis of adenine nucleotides in rat serum. *Journal of Circadian Rhythms*. , v.9, p.7 - , 2011.

10. MEDEIROS, L. F., ROZISKY, J.R., **SOUZA, A.**, HIDALGO, M.P., NETTO, C. A., CAUMO, W., BATTASTINI, A. M., TORRES, I. L. S. Lifetime behavioural changes after exposure to anaesthetics in infant rats. *Behavioural Brain Research*. v.218, p.51 - 56, 2011.
11. ROZISKY, J.R., MEDEIROS, L. F., ADACHI, L. S., TEIXEIRA, J. E., **SOUZA, A.**, NETO, A. S., BONAN, C., CAUMO, W., TORRES, I. L. S. Morphine exposure in early life increases nociceptive behavior in a rat formalin tonic pain model in adult life. *Brain Research*. v.1367, p.122 - 129, 2011.
12. DETANICO, B.C., **SOUZA, A.**, MEDEIROS, L. F., ROZISKY, J.R., CAUMO, W., HIDALGO, M.P., BATTASTINI, A. M., TORRES, I. L. S. 24-HOUR TEMPORAL PATTERN OF NTPDase AND 5 α -NUCLEOTIDASE ENZYMES IN RAT BLOOD SERUM. *Chronobiology International (Online)*. , v.27, p.1751 - 1761, 2010.

Resumos publicados em Anais de Congressos

1. **SOUZA, A.**, SOUZA, A. C., OLIVEIRA, C., SCARABELOT, V. L., ADACHI, L. S., MARSON, F., MEDEIROS, L. F., CAUMO, W., NETTO, C. A., TORRES, I. L. S. Avaliação da resposta nociceptiva de ratos após insulto hipóxico-isquêmico no período neonatal In: XXVII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental -

FeSBE, 2012, Águas de Lindóia - SP. **Anais da XXVII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE.** , 2012. p.4035 – 4035.

2. OLIVEIRA, C.M., OLIVEIRA, C., SCARABELOT, V. L., **SOUZA, A.**, SILVA, F.R., MARQUES, P., SOUZA, I. C. C., TORRES, I. L. S. Avaliação de parâmetros bioquímicos em ratos submetidos ao estresse crônico e dieta de cafeteria In: XLVII Congresso Anual da Sociedade Brasileira de Fisiologia (SBFis), 2012, Gramado-RS. **Anais do XLVII Congresso Anual da Sociedade Brasileira de Fisiologia (SBFis).** , 2012.

3. DIEFENTHALER, F., OLIVEIRA, C.M., OLIVEIRA, C., **SOUZA, A.**, SOUZA, A. C., MEDEIROS, L. F., SCARABELOT, V. L., ADACHI, L. S., TORRES, I. L. S. Avaliação de parâmetros ponderais em ratos submetidos ao modelo de obesidade associada a estresse crônico In: 32 Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2012, Porto Alegre-RS. **Anais da 32 Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.** , 2012.

4. OLIVEIRA, C.M., OLIVEIRA, C., SCARABELOT, V. L., **SOUZA, A.**, ADACHI, L. S., MEDEIROS, L. F., MACEDO, I. C., MARQUES, P., SILVA, F.R., SOUZA, I. C. C., CAUMO, W., WEIDLICH, L., TORRES, I. L. S. Avaliação do padrão temporal do perfil lipídico e da glicemia de ratos: efeito da obesidade associada a estresse crônico In: 32 Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2012, Porto Alegre-RS. **Anais da 32 Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.** , 2012.

5. SILVA, F.R., ADACHI, L. S., **SOUZA, A.**, MEDEIROS, L. F., SCARABELOT, V. L., OLIVEIRA, C., SOUZA, A. C., FREGNI, F., CAUMO, W., TORRES, I. L. S. Avaliação dos

níveis de corticosterona e interleucina 1-beta séricos e níveis de TNF-alfa hipocampal em ratos hiperalgésicos tratados com eletroestimulação transcraniana por corrente contínua (ETCC) In: XXVII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, 2012, Águas de Lindóia - SP. **Anais da XXVII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE.** , 2012. p.4039 – 4039.

6. OLIVEIRA, C.M., OLIVEIRA, C., SCARABELOT, V. L., **SOUZA, A.**, MACEDO, I. C., MEDEIROS, L. F., SILVA, F.R., MARQUES, P., SOUZA, I. C. C., CAUMO, W.,TORRES, I. L. S. Avaliação Temporal do Padrão Temporal do perfil lipogênico e glicemia em ratos: efeito da obesidade associada ao estresse crônico In: XXVII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, 2012, Águas de Lindóia - SP. **Anais da XXVII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE.** , 2012. p.1006 – 1006.

7. DEITOS, A., MEDEIROS, L. F., TARRAGO, M. G., VIDOR, L. P., DALLAGNOL, L., BRIETZKE, A., ROZISKY, J.R., **SOUZA, A.**, CIOATO, S.G., FREGNI, F., TORRES, I. L. S., CAUMO, W. BDNF e excitabilidade cortical motora na dor músculo-esquelética crônica In: IV Simpósio Internacional em Neuromodulação, 2012, São Paulo-SP. **Anais do IV Simpósio Internacional em Neuromodulação.** , 2012.

8. OLIVEIRA, C., SCARABELOT, V. L., **SOUZA, A.**, MACEDO, I. C., MEDEIROS, L. F., ADACHI, L. S., SOUZA, A. C., SILVA, F.R., MARQUES, P., CIOATO, S.G., TORRES, I. L. S. Behavior effects of exposure to chronic stress and/or hypercaloric diet on open field test In: 32 Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2012, Porto Alegre-RS. **Anais da 32 Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.** , 2012.

9. MACEDO, I. C., MEDEIROS, L. F., OLIVEIRA, C., OLIVEIRA, C.M., ROZISKY, J.R., SCARABELOT, V. L., **SOUZA, A.**, SILVA, F.R., SANTOS, V. S., CAUMO, W., TORRES, I. L. S. Cafeteria diet plus chronic stress alter leptin serum level and specific adipose tissue weights in six weeks of treatment In: 32 Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2012, Porto Alegre-RS. **Anais da 32 Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.** , 2012.
10. SCARABELOT, V. L., OLIVEIRA, C.M., **SOUZA, A.**, MEDEIROS, L. F., ADACHI, L. S., SOUZA, A. C., CIOATO, S.G., MARQUES, P., CAUMO, W., TORRES, I. L. S. Chronic stress and/or hipercaloric diet: effects on 24-hour temporal pattern of leptin levels In: 32 Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2012, Porto Alegre-RS. **Anais da 32 Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.** , 2012.
11. SCARABELOT, V. L., OLIVEIRA, C., OLIVEIRA, C.M., **SOUZA, A.**, MACEDO, I. C., MEDEIROS, L. F., ADACHI, L. S., SILVA, F.R., MARQUES, P., SOUZA, I. C. C., TORRES, I. L. S., CAUMO, W. Chronic stress and/or hypercaloric diet: effects on behavior In: XXVII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, 2012, Águas de Lindóia - SP. **Anais da XXVII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE.** , 2012. p.1017 – 1017.
12. ADACHI, L. S., MEDEIROS, L. F., **SOUZA, A.**, ROZISKY, J.R., OLIVEIRA, C., SCARABELOT, V. L., SOUZA, A. C., CAUMO, W., TORRES, I. L. S. Diminuição dos níveis de BDNF em medula espinhal induzida por estresse crônico é revertida por eletroestimulação transcraniana por corrente contínua (ETCC) In: 32 Semana Científica

do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2012, Porto Alegre-RS. **Anais da 32 Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.** , 2012.

13. OLIVEIRA, C., OLIVEIRA, C.M., **SOUZA, A.**, MACEDO, I. C., SCARABELOT, V. L., MEDEIROS, L. F., SOUZA, A. C., SILVA, F.R., MARQUES, P., SOUZA, I. C. C., CAUMO, W., TORRES, I. L. S. Effect of obesity plus chronic stress on 24-hour pattern of circulating adiponectin and leptin in rats In: XXVII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, 2012, Águas de Lindóia - SP. **Anais da XXVII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE.** , 2012. p.1005 – 1005.

14. SCARABELOT, V. L., ADACHI, L. S., MEDEIROS, L. F., OLIVEIRA, C., **SOUZA, A.**, ROZISKY, J.R., SOUZA, A. C., FREGNI, F., CAUMO, W., TORRES, I. L. S. Eletroestimulação por corrente contínua (ETCC) reverte o efeito do estresse crônico sobre os níveis de BDNF em medula espinhal In: IV Simpósio Internacional em Neuromodulação, 2012, São Paulo-SP. **Anais do IV Simpósio Internacional em Neuromodulação.** , 2012.

15. **SOUZA, A.**, ADACHI, L. S., SANCHES, P. R. S., SILVA JUNIOR, D. P., SOUZA, A. C., OLIVEIRA, C., SCARABELOT, V. L., MARQUES, P., CAUMO, W., TORRES, I. L. S. Estimulador transcraniano por corrente contínua reverte hiperalgesia induzida pelo estresse crônico em animais In: 32 Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2012, Porto Alegre-RS. **Anais da 32 Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.** , 2012.

16. SILVA, F.R., SOUZA, A. C., **SOUZA, A.**, OLIVEIRA, C., ADACHI, L. S., MEDEIROS, L. F., SCARABELOT, V. L., CAUMO, W., SILVA, R. S., TORRES, I. L. S. Estudo preliminar: exposição materna a diferentes dosagens de cafeína pode resultar em deformidades na prole In: 32 Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2012, Porto Alegre-RS. **Anais da 32 Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.** , 2012.

17. SOUZA, A. C., **SOUZA, A.**, OLIVEIRA, C., ADACHI, L. S., MEDEIROS, L. F., SCARABELOT, V. L., SILVA, F.R., CAUMO, W., TORRES, I. L. S. Exposição crônica à cafeína em período gestacional de ratas altera a evolução da atividade motora da prole In: 32 Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2012, Porto Alegre-RS. **Anais da 32 Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.** , 2012.

18. MARQUES, P., ADACHI, L. S., MEDEIROS, L. F., **SOUZA, A.**, OLIVEIRA, C., SCARABELOT, V. L., SOUZA, A. C., CAUMO, W., TORRES, I. L. S. Impacto da eletroestimulação transcraniana por corrente contínua (ETCC) em modelo animal de alodinia induzida pelo estresse crônico In: 32 Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2012, Porto Alegre-RS. **Anais da 32 Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.** , 2012.

19. SOUZA, A. C., **SOUZA, A.**, OLIVEIRA, C., ADACHI, L. S., SILVA, F.R., CAUMO, W., SILVA, R. S., TORRES, I. L. S. Impacto da exposição materna a cafeína sobre a evolução da atividade motora da prole em ratos Wistar In: XXVII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, 2012, Águas de Lindóia - SP.

Anais da XXVII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE. , 2012. p.4043 – 4043.

20. MARSON, F., **SOUZA, A.**, SOUZA, A. C., OLIVEIRA, C., MEDEIROS, L. F., SCARABELOT, V. L., ADACHI, L. S., CAUMO, W., TORRES, I. L. S. Insulto hipóxico-isquêmico no período neonatal: avaliações nociceptivas In: 32 Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2012, Porto Alegre-RS. **Anais da 32 Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.** , 2012.

21. OLIVEIRA, C., ADACHI, L. S., MEDEIROS, L. F., **SOUZA, A.**, ROZISKY, J.R., SCARABELOT, V. L., SOUZA, A. C., FREGNI, F., CAUMO, W., TORRES, I. L. S. Modelo de estimulação transcraniana por corrente contínua em ratos Wistar In: IV Simpósio Internacional em Neuromodulação, 2012, São Paulo-SP. **Anais do IV Simpósio Internacional em Neuromodulação.** , 2012.

22. SILVA, F.R., SOUZA, A. C., **SOUZA, A.**, OLIVEIRA, C., ADACHI, L. S., MEDEIROS, L. F., SCARABELOT, V. L., TORRES, I. L. S. O impacto da exposição materna a diferentes dosagens de cafeína e o aparecimento de deformidades na prole em ratos Wistar: estudo preliminar In: XLVII Congresso Anual da Sociedade Brasileira de Fisiologia (SBFis), 2012, Gramado-RS. **Anais do XLVII Congresso Anual da Sociedade Brasileira de Fisiologia (SBFis).** , 2012.

23. DIEFENTHALER, F., OLIVEIRA, C.M., OLIVEIRA, C., **SOUZA, A.**, MEDEIROS, L. F., SOUZA, A. C., SCARABELOT, V. L., ADACHI, L. S., MACEDO, I. C., TORRES, I. L. S. Obesidade associada a estresse crônico: avaliação de parâmetros ponderais In: XXVII

Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, 2012, Águas de Lindóia - SP. **Anais da XXVII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE.** , 2012. p.3050 – 3050.

24. DIEFENTHALER, F., **SOUZA, A.** Ritmo circadiano de adiponectina e leptina em modelo de obesidade associada com estresse crônico In: XXIV Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2012, Porto Alegre-RS. **Anais da XXIV Salão de Iniciação Científica da UFRGS.** , 2012.

25. ADACHI, L. S., **SOUZA, A.**, ROZISKY, J.R., MEDEIROS, L. F., OLIVEIRA, C., SCARABELOT, V. L., SOUZA, A. C., FREGNI, F., CAUMO, W., TORRES, I. L. S. Transcranial Direct Current Stimulation (tDCS) reverses the hyperalgesia and decreased levels of BDNF in spinal cord of rats induced by chronic stress In: XXVII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, 2012, Águas de Lindóia - SP. **Anais da XXVII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE.** , 2012. p.1094 – 1094.

26. CIOATO, S.G., SOUZA, A. C., MEDEIROS, L. F., **SOUZA, A.**, SCARABELOT, V. L., CAUMO, W., TORRES, I. L. S. Administração de fentanil em ratos jovens diminui comportamento do tipo ansioso ao longo da vida In: 31 Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2011, Porto Alegre-RS. **Anais da 31 Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.** Porto Alegre: HCPA, 2011. v.31. p.18 - 18

27. SCARABELOT, V. L., MEDEIROS, L. F., ROZISKY, J.R., DETANICO, B.C., CAVAGNI, J., MACEDO, I. C., **SOUZA, A.**, ROSING, C. K., BATTASTINI, A.

M., TORRES, I. L. S. Aplicação de um modelo de doença periodontal em ratos Wistar altera a hidrólise de nucleotídeos da Adenina em soro In: II Encontro do Clube Brasileiro de Purinas, 2011, Rio de Janeiro-RS. **Anais do II Encontro do Clube Brasileiro de Purinas**. Rio de Janeiro: 2011. v.II.

28. **SOUZA, A.**, DEITOS, A., LASTE, G., DRESH, F., SILVEIRA, J., SOUZA, A. C., KAUFFMANN, C., FERNANDES, L. C., SOUZA, I. C. C., HIDALGO, M.P., TORRES, I. L. S., CAUMO, W. Associação entre cefaléia crônica tensional e o uso de psicoestimulantes na população do Vale do Taquari In: 31 Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2011, Porto Alegre-RS. **Anais da 31 Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre**. Porto Alegre: HCPA, 2011. v.31. p.169 – 169.

29. **SOUZA, A.**, DEITOS, A., LASTE, G., DRESH, F., SILVEIRA, J., SOUZA, A. C., KAUFFMANN, C., FERNANDES, L. C., SOUZA, I. C. C., HIDALGO, M.P., TORRES, I. L. S., CAUMO, W. Associação entre cefaléia crônica tensional e o uso de psicoestimulantes na população do Vale do Taquari. In: 31° Semana Científica do HCPA, 2011, Porto Alegre. **Anais da 31° Semana Científica do HCPA**. Porto Alegre: Andressa de Souza, 2011.

30. MEDEIROS, L. F., DEITOS, A., **SOUZA, A.**, LASTE, G., DRESH, F., SILVEIRA, J., SOUZA, A. C., KAUFFMANN, C., FERNANDES, L. C., SOUZA, I. C. C., HIDALGO, M.P., TORRES, I. L. S., CAUMO, W. BDNF and TNF as markers of severity of chronic tension headache In: XXVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE), 2011, Rio de Janeiro-RS. **Anais da XXVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE)**. , 2011. v.26.

31. DEITOS, A., **SOUZA, A.**, MEDEIROS, L. F., LASTE, G., DRESH, F., SILVEIRA, J., SOUZA, A. C., KAUFFMANN, C., FERNANDES, L. C., SOUZA, I. C. C., HIDALGO, M.P., TORRES, I. L. S., CAUMO, W. BDNF e TNF como marcadores da severidade da cefaléia tensional crônica In: 31 Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2011, Porto Alegre-RS. **Anais da 31 Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre**. Porto Alegre: HCPA, 2011. v.31. p.134 – 134.
32. SCARABELOT, V. L., **SOUZA, A.**, OLIVEIRA, M. G., CHAVES, A. C. M., MUNERATO, M. C., HIDALGO, M.P., CAUMO, W., TORRES, I. L. S. Características e fatores associados à queixa de xerostomia In: 31 Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2011, Porto Alegre-RS. **Anais da 31 Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre**. Porto Alegre: HCPA, 2011. v.31. p.196 – 196.
33. **SOUZA, A.**, ROZISKY, J.R., ADACHI, L. S., MEDEIROS, L. F., SANTOS, V. S., LASTE, G., MACEDO, I. C., CAUMO, W., TORRES, I. L. S. D2 receptor is involved in motor stimulant effects after morphine exposure in neonate rat. In: XXVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE), 2011, Rio de Janeiro-RS. **Anais da XXVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE)**. , 2011. v.26.
34. SANTOS, V. S., ROZISKY, J.R., LASTE, G., ADACHI, L. S., MEDEIROS, L. F., MACEDO, I. C., **SOUZA, A.**, CAUMO, W., TORRES, I. L. S. Effect of antipsychotic in hiperactivity induced by morphine exposure in neonate rats In: 31 Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2011, Porto Alegre-RS. **Anais da 31 Semana**

Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Porto Alegre: HCPA, 2011. v.31. p.136
– 136.

35. JACOVAS, V. C., MACEDO, I. C., **SOUZA, A.**, OLIVEIRA, C., OLIVEIRA, C.M., MARQUES, P., NONOSE, Y., LASTE, G., TORRES, I. L. S. Estresse Crônico associado à dieta hipercalórica sobre níveis de leptina e corticosterona In: 31 Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2011, Porto Alegre-RS. **Anais da 31 Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.** Porto Alegre: HCPA, 2011. v.31. p.23
– 23.

36. MACEDO, I. C., ROZISKY, J.R., MEDEIROS, L. F., SCARABELOT, V. L., **SOUZA, A.**, OLIVEIRA, C., OLIVEIRA, C.M., SILVA, F.R., TORRES, I. L. S. Hipercaloric diet plus chronic stress: synergic effects In: XXVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE), 2011, Rio de Janeiro-RS. **Anais da XXVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE).** , 2011. v.26.

37. CIOATO, S.G., SOUZA, A. C., MEDEIROS, L. F., **SOUZA, A.**, SCARABELOT, V. L., FERNANDES, L. C., CAUMO, W., TORRES, I. L. S. Impact of administration of S(+)-ketamine or fentanyl in young animals on nociceptive reponse in the short, medium and long term In: XXVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE), 2011, Rio de Janeiro-RS. **Anais da XXVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE).** , 2011. v.26.

38. SOUZA, A. C., MEDEIROS, L. F., **SOUZA, A.**, CIOATO, S.G., SCARABELOT, V. L., CAUMO, W., TORRES, I. L. S. Impacto da administração de S(+)-cetamina ou fentanil

em animais jovens sobre as respostas nociceptivas a curto, médio e longo prazo In: 31 Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2011, Porto Alegre-RS. **Anais da 31 Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre**. Porto Alegre: HCPA, 2011. v.31. p.74 – 74.

39. OLIVEIRA, C.M., OLIVEIRA, C., ROZISKY, J.R., **SOUZA, A.**, MARQUES, P., NONOSE, Y., MACEDO, I. C., JACOVAS, V. C., TORRES, I. L. S. Níveis de leptina e perfil lipídico em animais submetidos a estresse crônico e dieta obesogênica In: 31 Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2011, Porto Alegre-RS. **Anais da 31 Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre**. Porto Alegre: HCPA, 2011. v.31. p.19 – 19.

40. MEDEIROS, L. F., **SOUZA, A.**, ROZISKY, J.R., SANTOS, V. S., NETTO, C. A., BATTASTINI, A. M., TORRES, I. L. S. A associação de cetamina/fentanil em ratos infantis induz ansiólise de longa duração In: XXV Reunião Anual da Fesbe, 2010, Águas de Lindóia. **Anais XXV Reunião Anual da Fesbe.** , 2010.

41. NONOSE, Y., MEDEIROS, L. F., **SOUZA, A.**, ROZISKY, J.R., SANTOS, V. S., NETTO, C. A., BATTASTINI, A. M., TORRES, I. L. S. A associação de cetamina/fentanil em ratos infantis induz ansiólise de longa duração In: 30ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2010, Porto Alegre-RS. **Anais 30ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre**. Porto Alegre-RS: HCPA, 2010. v.30.

42. MEDEIROS, L. F., **SOUZA, A.**, ROZISKY, J.R., SANTOS, V. S., NETTO, C. A., BATTASTINI, A. M., TORRES, I. L. S. A combinação de cetamina/fentanil em ratos infantis promove aumento da hidrólise de nucleotídeos e analgesia In: XXV Reunião Anual da Fesbe, 2010, Águas de Lindóia-SP. **Anais XXV Reunião Anual da Fesbe.** , 2010.

43. NONOSE, Y., MEDEIROS, L. F., **SOUZA, A.**, ROZISKY, J.R., SANTOS, V. S., NETTO, C. A., BATTASTINI, A. M., TORRES, I. L. S. A combinação de cetamina/fentanil em ratos infantis promove aumento da hidrólise de nucleotídeos e analgesia In: 30° Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2010, Porto Alegre-RS. **Anais 30° Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.** Porto Alegre-RS: HCPA, 2010. v.30.

44. MEDEIROS, L. F., **SOUZA, A.**, ROZISKY, J.R., SANTOS, V. S., CAUMO, W., NETTO, C. A., BATTASTINI, A. M., TORRES, I. L. S. Alteração na hidrólise de nucleotídeos em medula espinhal de ratos submetidos a intervenção farmacológica e cirúrgica In: I Meeting of the brasilian Purine Club, 2010, Águas de Lindóia. **Anais I Meeting of the brasilian Purine Club.** , 2010.

45. MEDEIROS, L. F., **SOUZA, A.**, ROZISKY, J.R., NONOSE, Y., SANTOS, V. S., BATTASTINI, A. M., TORRES, I. L. S. Alterações nas respostas nociceptiva e bioquímica após intervenção farmacológica com isoflurano associado ou não a cirurgia In: 30° Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2010, Porto Alegre-RS. **Anais 30° Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.** Porto Alegre-RS: HCPA, 2010. v.30.

46. NONOSE, Y., MEDEIROS, L. F., **SOUZA, A.**, ROZISKY, J.R., SANTOS, V. S., BATTASTINI, A. M., TORRES, I. L. S. Aumento da atividade locomotora após administração de isoflurano em ratos infantiles In: XXV Reunião Anual da Fesbe, 2010, Águas de Lindóia-SP. **Anais XXV Reunião Anual da Fesbe.** , 2010.
47. NONOSE, Y., MEDEIROS, L. F., **SOUZA, A.**, ROZISKY, J.R., SANTOS, V. S., BATTASTINI, A. M., TORRES, I. L. S. Avaliação da resposta nociceptiva e bioquímica após intervenção farmacológica, associada ou não com procedimento cirúrgico In: XXV Reunião Anual da Fesbe, 2010, Águas de Lindóia-SP. **Anais XXV Reunião Anual da Fesbe.** , 2010.
48. CIOATO, S.G., **SOUZA, A.**, MEDEIROS, L. F., SANTOS, V. S., DETANICO, B.C., CAUMO, W., TORRES, I. L. S. Avaliação do padrão temporal sobre parâmetros comportamentais em ratos submetidos a estresse por restrição In: XXV Reunião Anual da Fesbe, 2010, Águas de Lindóia-SP. **Anais XXV Reunião Anual da Fesbe.** , 2010.
49. **SOUZA, A.**, DETANICO, B.C., MEDEIROS, L. F., ROZISKY, J.R., BATTASTINI, A. M., TORRES, I. L. S. Change of the temporal pattern of nucleotide hydrolysis in the blood serum of rats subjected to restraint stress In: 30° Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2010, Porto Alegre-RS. **Anais da 30° Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.** Porto Alegre-RS: Rev HCPA, 2010. v.30.
50. SANTOS, V. S., **SOUZA, A.**, TORRES, I. L. S., MACEDO, I. C., ROZISKY, J.R., MEDEIROS, L. F., CAUMO, W. Efeito da exposição repetida à morfina no período neonatal sobre o comportamento em teste de Labirinto em Cruz Elevado (LCE) In: 30° Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2010, Porto Alegre-RS. **Anais da 30°**

Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Porto Alegre-RS: Rev HCPA, 2010. v.30.

51. CIOATO, S.G., **SOUZA, A.**, MEDEIROS, L. F., ROZISKY, J.R., SCARABELOT, V. L., DETANICO, B.C., CAUMO, W., TORRES, I. L. S. Efeito do estresse por restrição no padrão temporal da resposta comportamental In: XXV Reunião Anual da Fesbe, 2010, Águas Lindóia-SP. **Anais XXV Reunião Anual da Fesbe.** , 2010.

52. **SOUZA, A.**, DETANICO, B.C., MEDEIROS, L. F., ROZISKY, J.R., BATTASTINI, A. M., TORRES, I. L. S. Efeito do estresse por restrição sobre o padrão temporal de biomarcadores e das enzimas NTPDase e 5'nucleotidase em soro de ratos In: I Salão de Pesquisa em Pós Graduação da UFRGS, 2010, Porto Alegre. **I Salão de Pesquisa em Pós Graduação da UFRGS.** Porto Alegre: UFRGS, 2010. v.1.

53. SCARABELOT, V. L., ROZISKY, J.R., DETANICO, B.C., MEDEIROS, L. F., CAVAGNI, J., MACEDO, I. C., **SOUZA, A.**, BATTASTINI, A. M., TORRES, I. L. S. Efeito do Uso de corticóide inalatório na hidrólise de nucleotídeos em soro de ratos com doença periodontal induzida In: I Meeting of the brasilian Purine Club, 2010, Águas de Lindóia-SP. **Anais I Meeting of the brasilian Purine Club.** , 2010.

54. **SOUZA, A.**, DETANICO, B.C., MEDEIROS, L. F., ROZISKY, J.R., HIDALGO, M.P., CAUMO, W., BATTASTINI, A. M., TORRES, I. L. S. Effects of restraint stress upon temporal patterns of adenine nucleotides hydrolisis in rats blood serum In: XXV Reunião Anual da Fesbe, 2010, Águas de Lindóia-SP. **Anais XXV Reunião Anual da Fesbe.** , 2010.

55. **SOUZA, A.**, DETANICO, B.C., MEDEIROS, L. F., ROZISKY, J.R., CAUMO, W., BATTASTINI, A. M., TORRES, I. L. S. Effects of restraint stress upon temporal patterns of adenine nucleotides hydrolysis in rat blood serum In: I Meeting of the Brazilian Purine Club, 2010, Águas de Lindóia-SP. **Anais I Meeting of the Brazilian Purine Club.** , 2010.
56. JACOVAS, V. C., MACEDO, I. C., SILVA, F.R., MEDEIROS, L. F., SANTOS, V. S., **SOUZA, A.**, OLIVEIRA, C., OLIVEIRA, C.M., TORRES, I. L. S. Estresse crônico associado a uma dieta de cafeteria e seus efeitos sobre níveis glicêmicos e parâmetros ponderais In: VI Oficina de Neurociências, 2010, Garibaldi-RS. **VI Oficina de Neurociências.** , 2010.
57. CIOATO, S.G., **SOUZA, A.**, MEDEIROS, L. F., ROZISKY, J.R., SCARABELOT, V. L., SANTOS, V. S., HIDALGO, M.P., CAUMO, W., TORRES, I. L. S. Estresse por restrição em ratos altera o padrão temporal de comportamento tipo ansioso In: 30° Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2010, Porto Alegre-RS. **Anais 30° Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.** Porto Alegre-RS: HCPA, 2010.
58. ROZISKY, J.R., ADACHI, L. S., SANTOS, V. S., MEDEIROS, L. F., **SOUZA, A.**, CAUMO, W., TORRES, I. L. S. Ketamine reverses the hyperalgesia induced by repeated morphine exposure in early life In: 30° Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2010, Porto Alegre-RS. **Anais da 30° Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.** Porto Alegre-RS: Rev HCPA, 2010. v.30.
59. MEDEIROS, L. F., **SOUZA, A.**, ROZISKY, J.R., SANTOS, V. S., NETTO, C. A., BATTASTINI, A. M., TORRES, I. L. S. Ketamine/Fentanyl administration in infant rats

induced anxiolysis until adult life In: 42° Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapeutica Experimental, 2010, Ribeirão Preto-SP. **42° Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapeutica Experimental.** , 2010.

60. MEDEIROS, L. F., **SOUZA, A.**, ROZISKY, J.R., SANTOS, V. S., NETTO, C. A., BATTASTINI, A. M., TORRES, I. L. S. Ketamine/Fentanyl administration in infant rats promotes analgesia associated with increased hydrolysis of nucleotides In: 42° Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapeutica Experimental, 2010, Ribeirão Preto-SP. **42° Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapeutica Experimental.** , 2010.

61. SANTOS, V. S., BATTASTINI, A. M., **SOUZA, A.**, DETANICO, B.C., TORRES, I. L. S., MACEDO, I. C., ROZISKY, J.R., MEDEIROS, L. F. Morphine exposure alters 5'nucleotidase activity in blood serum of rats In: 30° Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2010, Porto Alegre-RS. **Anais da 30° Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.** Porto Alegre-RS: Rev HCPA, 2010. v.30.

62. SANTOS, V. S., ROZISKY, J.R., MEDEIROS, L. F., **SOUZA, A.**, SCARABELOT, V. L., CAUMO, W., TORRES, I. L. S. Morphine exposure in rat pups induces anxiolytic effect on elevated plus-maze In: XXV Reunião Anual da Fesbe, 2010, Águas de Lindóia-SP. **Anais XXV Reunião Anual da Fesbe.** , 2010.

63. SILVA, F.R., MACEDO, I. C., MEDEIROS, L. F., ROZISKY, J.R., CIOATO, S.G., **SOUZA, A.**, OLIVEIRA, C., OLIVEIRA, C.M., TORRES, I. L. S. Níveis de leptina em um modelo de síndrome metabólica em ratos submetidos a um modelo de estresse crônico In:

VI Oficina de Neurociências, 2010, Garibaldi-RS. **Anais da VI Oficina de Neurociências.**
Porto Alegre-RS: UFRGS, 2010.

64. ROZISKY, J.R., ADACHI, L. S., SANTOS, V. S., MEDEIROS, L. F., **SOUZA, A.**, CAUMO, W., TORRES, I. L. S. NMDA Antagonist receptor reverses the hyperalgesia induced by repeated morphine exposure in early life. In: XXV Reunião Anual da Fesbe, 2010, Águas de Lindóia-SP. **Anais XXV Reunião Anual da Fesbe.** , 2010.

65. **SOUZA, A.**, DETANICO, B.C., MEDEIROS, L. F., ROZISKY, J.R., SCARABELOT, V. L., SIQUEIRA, I. R., CAUMO, W., TORRES, I. L. S. O estresse como dessincronizador do padrão rítmico de biomarcadores sistêmicos em ratos In: XXV Reunião Anual da Fesbe, 2010, Águas de Lindóia-SP. **Anais XXV Reunião Anual da Fesbe.** , 2010.

66. SILVA, F.R., MACEDO, I. C., **SOUZA, A.**, ROZISKY, J.R., MEDEIROS, L. F., SCARABELOT, V. L., SANTOS, V. S., TORRES, I. L. S. Parâmetros ponderais e níveis glicêmia avaliados em modelos de síndrome metabólica e de estresse crônico In: XXV Reunião Anual da Fesbe, 2010, Águas Lindóia-SP. **XXV Reunião Anual da Fesbe.** , 2010.

67. MACEDO, I. C., MEDEIROS, L. F., **SOUZA, A.**, ROZISKY, J.R., SCARABELOT, V. L., SANTOS, V. S., SILVA, F.R., TORRES, I. L. S. Relação entre leptina e síndrome metabólica associada a estresse crônico In: XXV Reunião Anual da Fesbe, 2010, Águas de Lindóia-SP. **XXV Reunião Anual da Fesbe.** , 2010.

68. NONOSE, Y., ROZISKY, J.R., SANTOS, V. S., MEDEIROS, L. F., **SOUZA, A.**, CAUMO, W., TORRES, I. L. S. Repeated morphine administration in early life promotes

anxiolytic effect on elevated plus maze In: 42° Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapeutica Experimental, 2010, Ribeirão Preto-RS. **42° Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapeutica Experimental.** , 2010.

69. SANTOS, V. S., ROZISKY, J.R., DETANICO, B.C., MEDEIROS, L. F., **SOUZA, A.**, CIOATO, S.G., NONOSE, Y., BATTASTINI, A. M., TORRES, I. L. S. Sustained morphine exposure alters the nucleotide hydrolysis in blood serum in rats In: XXV Reunião Anual da Fesbe, 2010, Águas de Lindóia-SP. **Anais XXV Reunião Anual da Fesbe.** XXV Reunião Anual da Fesbe: , 2010.

70. SCARABELOT, V. L., ROZISKY, J.R., DETANICO, B.C., MEDEIROS, L. F., CAVAGNI, J., MACEDO, I. C., **SOUZA, A.**, ROSING, C.K., BATTASTINI, A. M., TORRES, I. L. S. Uso de corticóide inalatório promove alteração na hidrólise de nucleotídeos em soro de ratos com doença periodontal induzida In: 30° Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2010, Porto Alegre-RS. **Anais da 30° Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.** Porto Alegre-RS: Rev HCPA, 2010. v.30.

71. ROZISKY, J.R., DETANICO, B.C., **SOUZA, A.**, MEDEIROS, L. F., CAUMO, W., HIDALGO, M.P., BATTASTINI, A. M., TORRES, I. L. S. 24-Hour Temporal Pattern of NTPDase and 5'-nucleotidase enzymes in rat blood serum In: XXV Reunião Anual da Fesbe, 2010, Águas de Lindóia-SP. **Anais da XXV Reunião Anual da Fesbe.** , 2010.