2020

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS
DE RIBEIRÃO PRETO

**Participação da via HO-CO em áreas encefálicas do sistema
límbico na modulação da dor: recrutamento de receptores μ e δ
opioides, fatores de transcrição, neurotróficos e oxidativos**

RAFAEL ALVES CAZUZA

Tese

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE PSICOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOBIOLOGIA**

“Participação da via HO-CO em áreas encefálicas do sistema límbico na modulação da dor: recrutamento de receptores μ e δ opioides, fatores de transcrição, neurotróficos e oxidativos”.

Rafael Alves Cazuza

RIBEIRÃO PRETO -SP

2020

RAFAEL ALVES CAZUZA

“Participação da via HO-CO em áreas encefálicas do sistema límbico na modulação da dor: recrutamento de receptores μ e δ opioides, fatores de transcrição, neurotróficos e oxidativos”.

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área: Psicobiologia.

Orientador: Christie Ramos Andrade Leite-Panissi

Co-orientador: Olga Pol Rigau

RIBEIRÃO PRETO -SP

2020

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Cazuza, Rafael Alves

Participação da via HO-CO em áreas encefálicas do sistema límbico na modulação da dor: recrutamento de receptores μ e δ opióides, fatores de transcrição, neurotróficos e oxidativos. Ribeirão Preto, 2010.

70 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Psicobiologia.

Orientador: Christie Ramos Andrade Leite-Panissi.

1. Dor. 2. Nocicepção. 3. Monóxido de Carbono. 4. Opióides. 5. Fatores de Transcrição.

CAZUZA, R.A. Participação da via HO-CO em áreas encefálicas do sistema límbico na modulação da dor: recrutamento de receptores μ e δ opioides, fatores de transcrição, neurotróficos e oxidativos. 2020. 70 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2020.

Aprovado em 09/12/2020

Banca Examinadora

Profa. Dra. Christie Ramos Andrade Leite Panissi

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Wagner Luis Reis

Professor Adjunto da Universidade Federal de Santa Catarina/UFSC, Departamento de Ciências Fisiológicas.

Prof. Dr. Carlos Giovani de Oliveira Nascimento

Professor Adjunto da Universidade Federal de Alfenas, Laboratório de Fisiologia.

Profa. Dra. Joice Maria da Cunha

Professora Associada do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal do Paraná.

Dedico,
*A minha mãe, **Maria de Fátima**, que já não se encontra mais entre nós, mas que, como ela mesmo*
dizia, deixou-me “a maior herança que um pai pode deixar para o filho, a educação”.

AGRADECIMENTOS

À **minha família**, que me ensinou a importância do conhecimento e da educação, me incentivando sempre à buscar o progresso com humildade e respeito ao próximo.

À **Prof. Christie Ramos Andrade Leite-Panissi**, minha orientadora, mentora e amiga que ofereceu total suporte, parceria e companheirismo para a elaboração e realização deste trabalho, crescimento profissional e pessoal. Serei eternamente grato a tudo que fez por mim.

À **Dra. Olga Pol**, que co-orientou este trabalho, pela mentoria, parceria e ajuda que foram imprescindíveis na realização e aprimoramento deste trabalho, me recebendo de braços abertos em seu laboratório que colaborou para meu crescimento pessoal e profissional.

Ao **Prof. Norberto Cysne Coimbra**, pelo acompanhamento e assessoria que possibilitou a melhoria deste trabalho.

Aos **Professores da Banca**, pelo aceite e atenção na leitura deste trabalho.

À minha companheira, noiva e futura esposa, **Flávia**, pelo apoio total e incondicional, amor e carinho. Obrigado por iluminar minha vida.

À amiga **Ana Luísa**, que acompanhou e auxiliou na execução deste trabalho.

Aos meus companheiros e amigos de laboratório, **Bruna, Eduardo, Gleice, Sarai, Milene, Ana Carolina, Laís, Naila, Miguel, Henrique, Melissa, Patricia e Andreza** do LANEDOC pela amizade, colaboração e companheirismo.

Aos amigos da Universitat Autònoma de Barcelona, **Sergi, Aida e Xue** pela parceria e companheirismo no laboratório.

Ao amigo e irmão **Gerard Batallé** que além da amizade, contribuiu diretamente para a coleta e análise de parte dos dados deste trabalho.

A **Renata B. Vicentini**, secretária do Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia da FFCLRP-USP, pelo auxílio competente.

Ao **Prof. Dr. Guilherme Lucas** por ceder seu laboratório para coleta de parte dos dados deste trabalho.

À **Sonia Zanon**, pela atenção e auxílio técnico.

À **Prof. Dra. Maria José Alves da Rocha**, por ceder seu laboratório para parte da coleta dos dados deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Silvio Morato**, pela amizade e mentoria enquanto no período de estágio em docência.

Ao **Prof. Dr. William A. Prado**, pelos ensinamentos valiosos sobre dor e analgesia.

À **todos** aqueles que contribuíram com a minha formação profissional.

À **CAPES e ao CNPq** (401472/2014-0) pelo auxílio financeiro deste projeto e pelo estágio de Doutorado Sanduíche.

Sumário

Resumo	7
Abstract	8
Introdução.....	9
Objetivos	18
Material e Métodos.....	19
1. Animais e condições experimentais	19
2. Indução da inflamação persistente	20
3. Testes nociceptivos	20
4. Paradigma de fuga/esquiva ao local (PEAP).....	21
5. Grupos experimentais e tratamentos farmacológicos	22
6. Análise de Western Blotting	25
7. Delineamento experimental	26
8. Análise dos resultados	27
Resultados	29
<i>Protocolo 1: Avaliação do efeito da ativação da via HO-CO na modulação da dor e a participação de receptores opioides hipocampais.</i>	<i>29</i>
<i>Protocolo 2: Avaliação do efeito da ativação da via HO-CO nos marcadores inflamatórios em estruturas do sistema límbico em modelo de dor inflamatória persistente.</i>	<i>39</i>
Discussão.....	50
Conclusões	55
Referências Bibliográficas	57
ANEXO I.....	68

Título: Participação da via HO-CO em áreas encefálicas do sistema límbico na modulação da dor: recrutamento de receptores μ e δ opioides, fatores de transcrição, neurotróficos e oxidativos.

Cazuza, RA; Pol O.; Leite-Panissi, CRA.

Instituição sede: Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Resumo

O monóxido de carbono (CO) modula a dor inflamatória, atuando no sistema nervoso periférico e central, podendo interagir com o óxido nítrico (NO) e outras vias fisiológicas. Seus mecanismos podem modular o estresse oxidativo, fatores neurotróficos, mediadores neuroinflamatórios e receptores opioides. Apesar das evidências na modulação da nocicepção, pouco se sabe sobre os efeitos no componente aversivo-motivacional da dor. Este trabalho avaliou, em camundongos tratados com CORM-2 (liberador de CO) ou CoPP (indutor da enzima heme-oxigenase), a expressão de receptores opioides (μ e δ), mecanismos oxidativos, neurotróficos e fatores transcricionais em áreas hipocâmpais e outras áreas encefálicas associadas à modulação do componente emocional em modelo de inflamação persistente induzida por CFA. No protocolo 1 avaliou-se sensibilidade mecânica (von Frey), a aversividade à dor (teste fuga/esquiva), a expressão de receptores opioides e enzimas sintetizadoras de NO no hipocampo dorsal (HD) em camundongos C57/BL6 selvagem (WT) e nocautes para enzima óxido-nítrico sintase 2 (NOS2-KO). O protocolo 2 avaliou a expressão da enzima heme oxigenase 1 (HO-1), NOS2, fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K), proteína cinase B (AKT), proteína cinase ativada por mitógenos/MAPK (c-Jun N-terminal/JNK, ERK 1/2), NAD(P)H, quinona oxidoredutase-1 (NQO1), fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) e proteína apoptótica relacionada ao BCL-2 (BAX) na amígdala, substância cinzenta periaquedutal (SCP), hipocampo ventral (HPV) e área septal medial (SM) em camundongos WT. A inflamação persistente promoveu comportamentos pró-nociceptivos e aumentou a aversão à dor. O tratamento com CORM-2 ou CoPP promoveu efeito antinociceptivo, anti-aversivo, foi bloqueado pelo naloxone, e aumentou a expressão de receptores opioides no HD em camundongos WT, mas não em NOS2-KO, os quais por sua vez não apresentaram comportamento de aversão à dor. Além disso, a inflamação persistente foi capaz de alterar as vias de PI3k-AKT, p-ERK, BDNF e BAX nas áreas analisadas. O tratamento com CoPP e CORM-2 reverteu esses efeitos, sugerindo efeito dessa via na modulação da aversividade à dor, provavelmente por meio da modulação de fatores neuroprotetores, antioxidantes e da ativação de receptores opioides.

Palavras-chave: dor; nocicepção, monóxido de carbono, óxido nítrico, opioides, fatores de transcrição.

Title: Participation of the HO-CO pathway in the limbic system's brain areas in pain modulation: recruitment of μ and δ opioid receptors, transcription factors, neurotrophic and oxidative.

Cazuza, RA; Pol, O.; Leite-Panissi, CRA.

Principal institution: School of Philosophy, Science and Letters of Ribeirão Preto, University of São Paulo.

Abstract

Carbon monoxide (CO) modulates inflammatory pain, acting on the peripheral and central nervous system, interacting with nitric oxide (NO) and other physiological pathways. Its mechanisms act on oxidative stress, neurotrophic factors, neuroinflammatory mediators, and opioid receptors. Despite the evidence in modulating nociception, little is known about the effects on the aversive-motivational component of pain. This study evaluated, in mice treated with CORM-2 (CO release) or CoPP (heme oxygenase inducer), the expression of opioid receptors (μ and δ), oxidative, neurotrophic mechanisms and transcriptional factors in hippocampal and other areas brain areas associated with modulation of the emotional component in a model of persistent inflammation. In protocol 1, mechanical sensitivity (von Frey), aversiveness to pain (escape/avoidance test), the expression of opioid receptors and NO synthesizing enzymes in the dorsal hippocampus (HD) in wild C57 / BL6 (WT) mice and knockouts for nitric oxide synthase 2 (NOS2-KO) enzyme. Protocol 2 evaluated the expression of heme oxygenase 1 (HO-1), NOS2, phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K), protein kinase B (AKT), mitogen-activated protein kinase / MAPK (c-Jun N-terminal / JNK, ERK 1/2), NAD (P) H, quinone oxidoreductase-1 (NQO1), brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and apoptotic protein related to BCL-2 (BAX) in the amygdala, periaqueductal gray substance (SCP), ventral hippocampus (HPV) and medial septal (SM) area in WT mice. Persistent inflammation promoted pro-nociceptive behaviors and increased aversion to pain. Treatment with CORM-2 and CoPP promoted an antinociceptive, anti-aversive effect; it was blocked with naloxone treatment and increased the expression of opioid receptors in HD in WT mice, in NOS2-KO turn did not exhibit pain aversion behavior. Besides, persistent inflammation activated the PI3k-AKT pathway, reduced p-ERK, and BDNF and increased BAX in the analyzed areas. Treatment with CoPP and CORM-2 reversed these effects, suggesting an effect of this pathway on the modulation of pain aversiveness, probably through neuroprotective factors, antioxidants, and the activation of opioid receptors.

Keywords: pain; nociception, carbon monoxide, nitric oxide, opioids, transcriptional factors.

Introdução

As definições de dor e seu status atual

A primeira definição documental na área das ciências médicas modernas propõe a dor como uma abstração, designando sensação pessoal e íntima do mal, ocasionado por estímulo nocivo que sinaliza lesão tecidual atual ou iminente e que serve como reação para preservar o organismo desse mal (Sternbach, 1970).

Posteriormente o conceito de abstração ou de mal tornou-se de difícil entendimento e manejo, sendo substituído por um mais objetivo que define dor como uma experiência sensitiva provocada por um estímulo que lesa ou ameaça destruir um tecido, mas que só pode ser expressa introspectivamente (Mountcastle, 1980).

Entretanto tais definições chamavam muita atenção para fatores abstratos, estritamente sensitivos ou que sugeriam um fator introspectivo de difícil acesso, o que levou à prevalência do conceito definido pela Associação Internacional do Estudo da Dor (IASP) em 1970 que definia a dor como "experiência sensorial e emocional desagradável associada a uma lesão tecidual atual ou potencial, ou descrita em termos de tal lesão" (IASP, 1970). Dessa forma, ressaltou-se conceitos mais claros como experiência, processamento sensorial e a valência emocional de desagradabilidade da dor.

Especialistas no estudo da dor consideram alguns pontos sobre a definição de um conceito de dor. Ela deve ser simples e prática, a referência a lesão tecidual deve estar alinhada de acordo com as concepções atuais de dor, deve-se incluir os vários aspectos da dor e deve-se captar a experiência pessoal (Raja et al., 2020). Atualmente, a partir destes questionamentos, a IASP propôs um conceito revisado que define a dor como "uma experiência sensitiva e emocional desagradável, associada, ou semelhante àquela associada, a uma lesão tecidual real ou potencial" (Raja et al., 2020). Ainda, nesta mesma revisão de conceito, adicionam que a dor: sempre é uma experiência pessoal e que pode ser influenciada por fatores biopsicossociais; é distinta da nocicepção que se limita à ativação de neurônios sensitivos; deve ser respeitada quando relatada por um paciente; apesar do seu efeito adaptativo, pode provocar efeitos adversos no bem-estar social e psicológico; e que a descrição verbal é apenas um dos seus aspectos, sendo a incapacidade de comunicação um fator que não invalida a capacidade de um animal sentir dor.

Apesar de diversas definições ao longo do tempo e a recente discussão sobre o atual status do conceito de dor, é importante ressaltar que a dor apresenta aspectos sensoriais-discriminativos, emocionais-afetivos e cognitivos-avaliativos (Melzack, 2001). Sendo assim, é de total importância que se separe a nocicepção (aspecto sensorial) da dor em sua

complexidade, sendo possível que a nocicepção e a dor ocorram de formas separadas apesar de estarem relacionadas (Uhelski, Davis e Fuchs, 2012).

Além disso, a dor pode ser classificada em dor aguda e dor crônica. A dor aguda apresenta função protetiva importante, funcionando como um estímulo respondente que elicia fuga ou esquiva do estímulo aversivo doloroso, caracterizando a fase fásica, ou como estímulo discriminativo para engajamento em comportamentos de recuperação quando a dor se encontra em fase tônica, cessando após a cura da lesão ou pela fuga do estímulo doloroso (Brandão, 2005). Dessa forma, a dor aguda contribui para a continuidade da espécie na natureza, garantindo maior probabilidade de sobrevivência do organismo, permitindo que deixem descendentes.

Diferentemente da dor aguda, a dor crônica não apresenta valor evolutivo evidente e se refere ao estágio patológico da dor, que permanece após a cura do quadro agudo (Basbaum et al., 2009). Devido ao seu difícil tratamento, nível de incapacitância, apresentação de comorbidades e custos de tratamentos (Leite-Almeida et al., 2015) quadros de dores crônicas apresentam a maior parte dos estudos realizados em manejo da dor, sejam do tipo inflamatória ou neuropática. Especialmente para este trabalho, objetivou-se estudar quadros de dor crônica nociceptiva do tipo inflamatória.

Modelos nociceptivos e modelos operantes de dor

Grande parte dos estudos que desvendaram os mecanismos psicobiológicos da dor utilizaram-se de modelos nociceptivos; entretanto, a experiência dolorosa é muito mais complexa que seus componentes sensoriais mensurados através de comportamentos reflexos (Cobos e Portillo-Salido, 2013). Atualmente, alguns estudos têm se dedicado a desenvolver modelos animais que englobam os aspectos aversivos e emocionais da dor, através de estudos fundamentados em comportamentos operantes frente a apresentação de um estímulo doloroso (Vierck e Yeziarski, 2015). Esses modelos podem apresentar dados antagônicos aos testes clássicos nociceptivos, e possuem maior correlação com a dor em seres humanos, tendo em vista que incluem fatores complexos do comportamento, como a aprendizagem, motivação e emoção (Barrot, 2012; Gregory et al., 2013; Kangas e Bergman, 2014) sendo de grande importância para a compreensão e manejo da dor clínica.

Um modelo interessante para ser utilizado é o paradigma de fuga/esquiva ao local (PEAP) induzido por dor inflamatória ou neuropática (Labuda e Fuchs, 2000a; 2000b), o qual surge como uma alternativa para o estudo das dimensões afetivas e aversivas da dor, além de englobar seu aspecto sensorial. O modelo conta com uma estimulação dolorosa em ambiente

de livre circulação pelo animal, estando presente a dor induzida juntamente com a emissão de comportamentos de fuga e esquiva operante. Seguindo o modelo clássico de uma caixa claro-escuro para estudos de modelos animais de ansiedade, roedores têm maior tendência à preferência pelo ambiente escuro, naturalmente seguro em quanto exploram o ambiente claro em menor proporção (Bourin e Hascoet, 2003, Ramos et al., 2008). No modelo proposto por Labuda e Fuchs, a estimulação dolorosa ocorre justamente no ambiente naturalmente preferível do animal em quanto uma estimulação mecânica não dolorosa ocorre no ambiente claro, naturalmente aversivo. Desse modo, permite apresentar um paradigma de escolha entre um ambiente naturalmente aversivo sem estimulação dolorosa e um ambiente naturalmente seguro acompanhado de estimulação dolorosa.

Neuroanatomia e neurofisiologia da dor e nocicepção

A neuromatrix da dor dispõe de uma complexa rede de conexões do sistema nervoso (Melzack, 2001) que se iniciam pela ativação de nociceptores na periferia chegando até zonas supra-espinais onde a comunicação entre diversas áreas encefálicas, modulam a experiência dolorosa. Os nociceptores são terminações nervosas livres conectadas aos tecidos e que enviam os impulsos de informação dolorosa através de fibras nervosas do tipo A δ e C. As fibras A δ mielinizadas conduzem o impulso de maneira rápida e bem localizada, enquanto fibras do tipo C, não mielinizadas, transmitem a dor de forma lenta e difusa (Bourne et al., 2014).

As fibras que conduzem o impulso doloroso integram neurônios pseudo unipolares do gânglio da raiz dorsal que transmitem a dor periférica e parte da dor visceral, do gânglio trigeminal que transmite a dor orofacial (Jessel e Basbaum, 2000), e do gânglio nodoso e jugular do nervo vago que detém corpos celulares de neurônios sensoriais que transmitem a dor visceral (Gebhart e Bielefeldt, 2016). Dessa forma, diferentes vias aferentes transmitem diferentes tipos de informação dolorosa.

Sendo assim, cinco principais vias transmitem o impulso doloroso: A via espino-talâmica envia projeções desde as lâminas I e V do corno dorsal da medula espinal até o tálamo e regiões corticais superiores via trato espino-talâmico lateral. A via espino-reticular envia aferências à formação reticular do tronco cerebral que consequentemente enviam projeções ao tálamo. A via espino-mesencefálica possui aferências também via trato espino-talâmico lateral até regiões do mesencéfalo como os núcleos da rafe e substância cinzenta periaquedutal. A via trigeminal parte das terminações sensitivas faciais e o gânglio trigeminal envia projeções ao segundo neurônio presente no núcleo espinal do trigêmeo que distribui

projeções ao tálamo e outras regiões que processam a dor. Por fim e a via vagal que parte das terminações sensoriais viscerais, passam pelo gânglio nodoso e fazem sinapse no núcleo do trato solitário, que emite informações da dor visceral aos núcleos que processam a dor no cérebro (Jessel e Basbaum, 2000; Brandão, 2005; Hanani, 2015; Gebhart e Bielefeldt, 2016).

As vias ascendentes da dor ativam vias descendentes inibitórias e facilitatórias que formam o importante controle da nocicepção (Millan, 2002). Evidências que sustentam a teoria da comporta de Melzack e Wall (1965), que propunha um controle tanto das fibras C sobre as fibras A δ como de um controle supra-espinal dos neurônios nociceptivos da medula espinal, sugerem que células *On* e *Off* do eixo substância cinzenta periaquedutal (SCP) – medula rostroventral (RVM) funcionam como uma porta de controle da entrada e intensidade do impulso doloroso (Basbaum e Fields, 1984; Morton et al., 2016).

Destaca-se que em quadros de dor persistente, alterações noradrenérgicas na via descendente facilitatória são capazes de promover sensibilização central e manutenção da dor crônica (Martins et al., 2015). Prado e Roberts (1985) mapearam 114 áreas encefálicas que podiam apresentar antinocicepção e buscaram as que apresentavam analgesia dissociada de respostas aversivas de medo a partir de estimulação elétrica, e dentre estas regiões que apresentavam analgesia sem explicitar respostas de medo, destacam-se a SCP, RVM e hipocampo dorsal. Em adição, estudo subsequente evidenciou que a injeção de lidocaína no giro denteado do hipocampo dorsal foi capaz de promover analgesia em modelo de dor induzida por formalina (McKenna e Melzak, 1992). Adicionalmente, mapeamento utilizando a expressão da proteína Fos (um marcador de atividade neuronal) em animais com aversão relacionada à dor, mostra que diversas regiões encefálicas são ativadas, tais como a ínsula, córtex cingulado anterior, hipocampo, área septal, amígdala e SCP dorsal (Lei et al., 2004).

Importante notar que o hipocampo, além da sua participação sobre a modulação da nocicepção, também integra o sistema de inibição comportamental (Gray e McNaughton, 1982), importante mecanismo no controle da ansiedade. O sistema de inibição comportamental que funciona para induzir alerta e esquiva em um animal durante situações ameaçadoras, tem como base a via septo-hipocampal (Brandão, 2005). De fato, a via septo-hipocampal está associada com a modulação da nocicepção, em particular com o aspecto aversivo-motivacional da dor (Ang et al., 2017), possivelmente por meio da modulação de mecanismos opioidérgicos, GABAérgicos e colinérgicos desse eixo (Favaroni-Mendes e Menescal-de-Oliveira, 2008).

As vias de modulação da dor são complexas e incluem diferentes estruturas encefálicas modulando aspectos discriminativos, emocionais e cognitivos. Neste circuito, a SCP tem sido

amplamente apontada como importante área de integração na modulação nociceptiva (De Felice & Ossipov, 2016), enviando e recebendo projeções de estruturas encefálicas, tais como a amígdala e áreas corticais (Helmstetter et al., 1998). A amígdala, por sua vez, também contribui para a modulação dos componentes sensorial-discriminativos quanto dos afetivos-motivacionais (Price, 2000; Bird et al., 2005; Veinante et al., 2013). De particular interesse, o hipocampo recebe aferências da amígdala para integrar informações nocivas (Derbyshire et al., 1997), e via conexões recíprocas com a área septal por meio da via septo-hipocampal, desempenha importante participação no componente aversivo da dor (Ang et al., 2017). Especificamente, a parte ventral do hipocampo (HPV), tem um papel importante no processamento de emoções e estados afetivos (Fanselow e Dong, 2010). A via do córtex pré-frontal do hipocampo ventral médio também pode ser importante no processamento da dor inflamatória (Ma et al., 2019).

Neurotransmissão gasosa

A dor possui complexo mecanismo de neurotransmissores na sua modulação. Dentre os inúmeros moduladores da sensibilidade dolorosa, o gás monóxido de carbono (CO) exerce ação antinociceptiva periférica e central (Steiner et al., 2001, Nascimento e Branco, 2007; Hervera et al., 2013, Carvalho et al., 2011). Este neuromodulador que é produzido pela ação da enzima heme oxigenase (HO), que apresenta as isoformas HO-1, induzível, HO-2 constitutiva e HO-3 também constitutiva, está presente em diferentes áreas do sistema nervoso, resultando em ativação da enzima guanilase ciclase solúvel (GCs) e aumentando os níveis intracelulares de guanosina-3'5'- monofosfato cíclico (GMPc) (Levitt e Levitt, 2015).

Estudos anteriores mostraram que o CO atua na antinocicepção aguda não inflamatória avaliada no teste de retirada de cauda em ratos (Carvalho et al., 2011), na dor inflamatória induzida por adjuvante completo de Freund (CFA) no teste de von Frey (Carcolé et al., 2014), na dor neuropática induzida por diabetes (Castany et al., 2016) e por constrição de nervo ciático (Jurga et al., 2016). Além disso, estudo recente evidenciou que o CO participa da modulação do comportamento emocional (Carvalho-Costa, et al., 2016) em ratos avaliados no labirinto em cruz elevado e no teste claro-escuro, promovendo efeito ansiolítico. Entretanto, o envolvimento do CO na modulação da dor para além dos aspectos sensoriais ainda necessita de mais esclarecimentos.

Dados prévios têm mostrado que o CO potencializa o efeito analgésico da morfina (Gou, et al., 2014) participando via modulação de receptores μ e δ opioides (MOR e DOR) (Carcolé et al., 2014; Castany et al., 2016; Jurga et al., 2016). De fato, este gás exerce esse

efeito sobre MOR e DOR, possivelmente pela interação com o óxido nítrico (NO) diminuindo a expressão da NO sintase (NOS) (Hervera et al., 2012; Negrete et al., 2014).

Considerando o NO, este neuromodulador gasoso é sintetizado a partir da L-arginina catabolizada pela enzima NO sintase (NOS), que possui três isoformas, uma Neuronal (NOS1), uma induzível (NOS2) e uma endotelial (NOS2). O gás NO aumenta os níveis plasmáticos de GCs, GMPc e ativação da proteína quinase dependente de GMPc (PKG), mecanismo similar ao do gás CO (Barañano e Snyder, 2001; Murad, 2006; Mancuso, et al., 2010).

Assim como o CO, o NO participa da modulação da nocicepção, porém com resultados considerados ainda antagônicos e inconclusivos (Pol, 2007; Cury et al., 2011). Galdino et al. (2010) mostraram que a via NO - GMPc - canais de potássio dependentes de ATP (K_{ATP}) estava envolvida na antinocicepção desencadeada por exercício físico. Negrete et al. (2011) demonstraram que esta mesma via está envolvida na antinocicepção periférica induzida por administração de agonista para receptor canabinóide tipo 2, sendo sua ação mediada por opioides endógenos. Estes autores sugerem que os neuromoduladores gasosos, CO e NO atuam por meio de interação com mecanismos opioides e canabinóides (Negrete et al., 2011). Entretanto, outro estudo mostrou que a mesma via está envolvida na manutenção da dor neuropática periférica, exercendo, portanto, efeito hiperalgésico (Kim, et al., 2011). Estudos posteriores sugerem efeito sinérgico destes dois gases no controle da nocicepção térmica aguda e crônica inflamatória (Negrete et al., 2014; Gou et al., 2014). Portanto, embora várias evidências sugerem o envolvimento destes gases na modulação da sensibilidade dolorosa, o mecanismo específico de ação ainda foi completamente esclarecido.

Considerando outras funções biológicas, o NO também está envolvido em processos de consolidação e recuperação de memórias aversivas (Ota et al., 2010; Lisboa et al., 2015) avaliado em teste de condicionamento de preferência ao local e interagindo com mecanismos opioidérgicos—(Shen et al., 2014). De fato, o aumento da expressão de NO pode estar associado com a ativação de receptores MOR/DOR, desde que a ativação dessa via é necessária para a consolidação da memória de recompensa induzida por morfina (Shen et al., 2012). Ainda, a ativação de sGC e PKG na área CA1 do hipocampo também está associada à consolidação de memórias de longo prazo, participando da plasticidade neuronal nesta área (Giese e Mizuno, 2013).

É amplamente conhecido que áreas hipocampais, e em particular, a área CA1, estão intimamente relacionadas ao controle da consolidação da aprendizagem aversiva. Desta forma, é possível que esta região esteja envolvida na modulação da aversividade do estímulo

doloroso, participando da avaliação de aspectos emocionais e cognitivos no processamento da dor (Goosens, 2011; Baldi e Bucherelli, 2015), utilizando modelos de condicionamento de medo ao contexto, e de preferência ao local (Segev e Akirav, 2011; Loureiro et.al. 2015).

Levando em consideração aspectos moleculares, o hipocampo expressa altos níveis de HO-2 (isoforma constitutiva da enzima heme-oxigenase) em células piramidais, na área CA1 e no giro denteado, com menor expressão de NOS (Maines, 1993; 1997), e flutuações da expressão de HO-1 (isoforma induzida da enzima heme-oxigenase) nos mesmos neurônios (Guan et al., 2011). Essas células também expressam amplamente receptores MOR e DOR (Drake e Milner, 2002; Stumm, et al., 2004; Rezai et al., 2012; Nagode et al., 2014; Harte-Hargrove et al., 2015). Ainda, esta região expressa NOS neuronal (nNOS) (Vincent e Hope, 1992; Vincent e Kimura, 1992; Vincent, 1994; Endoh et al., 1994), bem como GMPc/PKG-cGK I. Estudos têm sugerido que GMPc/PKG nestes neurônios hipocámpais da área CA1 podem estar envolvidos na potenciação a longo prazo e na consolidação de memórias aversivas (El-Husseini et al., 1999; De Vente et al., 2001; Feil et al., 2005).

Entretanto, o mecanismo de ação dos gases CO e NO nas funções emocionais e afetivas de áreas hipocámpais ainda carece de maiores estudos, desde que esta estrutura é uma possível região de integração entre as vias NOS-NO-GMPc-PKG, HO-CO-GMPc-PKG e receptores opioides MOR/DOR.

Interação da via HO-CO e fatores transcricionais, antioxidantes, neuroinflamatórios e neurotróficos

A enzima HO atua sobre o grupo Heme na presença de O^2 , NADPH e H^+ , liberando gás CO, biliverdina, NADP e íons Fe (Levitt e Levitt, 2015). O gás CO, como molécula de sinalização, exerce efeito anti-apoptótico, vasodilatador e anti-proliferativo ao atuar na via da GCs - cGMP, bem como apresenta efeitos antiinflamatórios por meio da ativação da via de proteína quinase dependente de mitógeno (MAPK), sendo a biliverdina, a bilirrubina e o íon Fe^{2+} importantes agentes antioxidantes (Pae et al., 2008).

É importante destacar que as espécies reativas de oxigênio (ROS) atuam na sensibilização central à dor por meio do processo oxidativo (Nishio et al., 2013). De fato, a ação dos antioxidantes apresenta envolvimento na redução da dor neuropática crônica (Kim et al., 2014), sendo que o sistema formado pelo fator nuclear tipo - 2 (Nrf2), a HO-1, a NAD(P)H, e pela quinona oxidoredutase derivada do eritróide-1 (NQO1) parece ser importante sistema de defesa antioxidante desempenhando papel citoprotetor (Zhang et al., 2013). De fato, a ação do Nrf2 no hipocampo, no córtex pré-frontal e na amígdala foi

recentemente identificado em modelo de dor neuropática utilizando como tratamento o CORM-2 (Riego et al., 2018). No entanto, poucas evidências demonstram este mecanismo em modelos de dor inflamatória persistente.

Alguns estudos também mostraram que a ativação de MAPK, uma família que inclui quinase regulada por sinal extracelular (ERK) e c-Jun NH2-terminal quinase (JNK) contribui para o desenvolvimento e manutenção da dor neuropática crônica (Pae et al., 2012, McDonell et al., 2017; Riego et al., 2018). ERK e JNK são ativados diferencialmente nas células gliais da medula espinhal, potencializando a síntese de mediadores pró-inflamatórios e pró-nociceptivos, sendo que a sua inibição reduz a dor inflamatória e neuropática (Ji et al., 2009). Além disso, a fosfoinositídeo 3-quinase (PI3K) também contribui para a manutenção da dor crônica e participa da proliferação e morte celular por meio da ativação da via proteína cinase B/alvo de rapamicina em mamíferos (AKT/mTOR), bem como de mecanismos envolvendo a ativação da MAPK e de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (Chen et al., 2017). Em particular, a via PI3k-AKT tem sua ação demonstrada na manutenção e no desenvolvimento da dor neuropática (Shi et al., 2009) e inflamatória (Pezet et al., 2008; Zhuang et al., 2004). Esses efeitos da via PI3K-AKT foram identificados na modulação periférica, entretanto, pouco se conhece dos efeitos específicos em áreas do sistema nervoso central.

O desenvolvimento e a manutenção da dor inflamatória crônica estão relacionados ao comprometimento da neuroplasticidade e neurogênese, bem como à morte celular (Corasanti et al., 2006). O fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) exerce um papel importante no processamento da dor crônica, sendo pró ou antinociceptivo dependendo de seus polimorfismos e localização no sistema nervoso (Cappoli et al., 2020). Curiosamente, os papéis do BDNF na neuroplasticidade podem depender da ativação da via TrKB / ERK (Alonso et al., 2004). Também foi relatado que a dor crônica regula positivamente as proteínas pró-apoptóticas no cérebro como a proteína X relacionada com BCL-2 (BAX) tanto na dor neuropática (Amin et al., 2014) quanto na inflamação (Jalalvand et al., 2008). Também há evidências de que a HO-1 pode ter papéis citoprotetores contra doenças inflamatórias de morte celular programada ao interagir com PI3K / Akt mitocondrial e BAX (Gozzelino et al., 2010), o que pode sugerir que pode ocorrer na modulação da dor inflamatória.

Hipótese e Justificativa

Os gases CO e NO e sua relação com receptores opioides na modulação da dor são potenciais recursos para o manejo clínico da dor, funcionando como adjuvantes ao uso de opioides (Jurga et al., 2016; Shen et al., 2012; 2014). Componentes adjuvantes são

importantes na redução do uso de opioides, tal como a morfina (Komatsu, 2015), desde que seu uso contínuo para o tratamento de dores crônicas e persistentes apresentam graves efeitos colaterais (Stein, 2013; Beltran-Campos et al., 2015).

Considerando que diversos trabalhos têm mostrado resultados importantes na compreensão do papel dos gases na modulação da nocicepção, utilizando testes nociceptivos de natureza reflexa, este estudo optou por utilizar o teste de PEAP para análise da dor inflamatória persistente induzida por CFA (Labuda e Fuchs, 2000), para avaliar estímulos nociceptivos e aprendizagem aversiva. É esperado que a ativação da via HO-CO, por meio do tratamento com CORM-2 (liberador de molécula de CO) ou CoPP (indutor de HO-1) reduzam o efeito aversivo produzido no teste de PEAP.

Objetivos

Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da ativação da via HO-CO, por meio da administração do CORM-2 e CoPP sobre o componente aversivo-motivacional da dor. Em uma segunda etapa, investigou-se mecanismos moleculares associados à ativação da via HO-CO em áreas encefálicas relacionadas à modulação da dor, considerando em particular, o componente emocional.

Desta forma, podem ser destacados os seguintes objetivos específicos:

Protocolo 1

- 1) Avaliar o efeito da administração sistêmica (i.p.) aguda de liberador de CO (CORM-2) ou do indutor da enzima HO-1 (CoPP) em camundongos selvagens (WT) e nocaute para a enzima NOS-2 (NOS2-KO) sobre a alodínia mecânica por meio do teste de von Frey.
- 2) Avaliar o efeito da administração sistêmica (i.p.) aguda de CORM-2 ou CoPP em camundongos selvagens (WT) e NOS2-KO sobre o comportamento de aversão à dor avaliada no teste PEAP.
- 3) Avaliar se a administração de naloxone, antagonista de receptores opioides, altera o efeito da ativação da via HO-CO pelo tratamento com CORM-2 ou CoPP nos testes nociceptivos em camundongos WT;
- 4) Quantificar a expressão proteica de HO-1, NOS-1, NOS-2, e dos receptores opioides MOR e DOR, no hipocampo dorsal de camundongos com inflamação persistente nas patas e tratados ou não com CORM-2 ou CoPP utilizando a técnica de Western Blot.

Protocolo 2

- 1) Avaliar o efeito da administração sistêmica (i.p.) repetida (2 vezes por dia/durante 7 dias) de liberador de CO (CORM-2) ou do indutor da enzima HO-1 (CoPP) em animais selvagens (WT) sobre a alodínia mecânica por meio do teste de von Frey, bem como sobre a hiperalgesia térmica utilizando o teste plantar.
- 2) Quantificar a expressão proteica de MAPK (ERK 1/2 e JNK), PI3K, AKT, HO-1, NOS-2, NQO1, BDNF e proteína apoptótica relacionada ao BCL-2 (BAX) na substância cinzenta periaquedutal, na amígdala, no hipocampo ventral e na área septal medial utilizando da técnica de Western Blot.

Material e Métodos

1. Animais e condições experimentais

Para o Protocolo 1, foram utilizados camundongos machos C57BL/6, procedentes do Biotério Central da Prefeitura do Campus de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo (USP). Ainda, foram utilizados camundongos machos camundongos knock-out para NOS2 (NOS2-KO) cedidos pelo Biotério da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (CBTBio 030/97), linhagem Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, USA). Os camundongos tinham de 8 a 10 semanas de idade (20 - 25 g), no início dos experimentos, e foram mantidos em caixas coletivas (densidade populacional de 8 camundongos por área de piso de 1354 cm²), de polipropileno forradas com maravalha, em ambiente com temperatura controlada (24° C ± 1° C) e ciclo claro-escuro de 12 horas, com água e comida *ad libitum*. Todos os protocolos experimentais foram realizados de acordo com os regulamentos e cuidados na utilização de animais em laboratórios, conforme a Legislação Brasileira para Uso de Animais, e foram aprovados junto à Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP (Processo nº 2017.1.306.58.2, Anexo I).

No Protocolo 1, após o período de habituação por 7 dias no biotério, em um primeiro conjunto de experimentos camundongos WT e NOS2-KO foram submetidos ao teste de von Frey para avaliação da sensibilidade mecânica basal. Em seguida foram anestesiados por meio de anestesia inalatória com isoflurano (descrito no item 2 desta Seção), sendo realizada a administração de CFA ou SS na pata posterior direita para indução da inflamação. Durante 10 dias foi acompanhado o desenvolvimento da inflamação por meio do teste de von Frey. No 10º dia experimental foi realizado o teste de von Frey antes e após 3 h dos diferentes tratamentos farmacológicos. Após o teste de von Frey, os camundongos foram submetidos ao teste PEAP, para avaliação da aversividade à dor. Em um segundo experimento, além do tratamento com veículo, CORM-2 ou CoPP, os camundongos foram tratados 10 minutos antes do último teste de von Frey e do PEAP com NLX (10 mg/kg i.p) ou solução salina 0,9% (veículo). Ao término dos experimentos, os camundongos foram submetidos à eutanásia com sobredose anestésica, os encéfalos foram coletados e a região dorsal do hipocampo foi dissecada para quantificação da expressão proteica de HO-1, NOS1, NOS2, MOR e DOR para cada genótipo estudado através de ensaio de Western Blot.

Para o Protocolo 2, foram utilizados camundongos machos (C57BL/6J) fornecidos pela Envigo Laboratories (Barcelona, Espanha), pesando 21 - 25 g (no início dos experimentos) submetidos às mesmas condições dos animais do estudo 1. Os experimentos foram realizados

entre 9h00 e 17h00, executados de acordo com as diretrizes para animais do Conselho das Comunidades Europeias (86/609 / ECC, 90/679 / ECC; 98/81 / CEE, 2003/65 / EC, e a Recomendação da Comissão 2007/526 / CE), e aprovado pelo Comitè d'Ètica en Experimentació Animal da Universitat Autònoma de Barcelona (número: 1325R5,29 de novembro de 2013). Todos os esforços foram realizados para minimizar a quantidade de animais empregados e seu sofrimento. Tendo em vista a natureza dolorosa dos experimentos, foram tomados cuidados redobrados para não causar qualquer tipo de dor desnecessária para os animais além da dor inflamatória persistente e dos testes nociceptivos. Os testes de dor visam a elucidar importantes mecanismos da dor crônica que afetam uma grande parcela da população.

2. Indução da inflamação persistente induzida por CFA

A dor inflamatória persistente foi induzida com a injeção sub-plantar de CFA (30 µL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) na pata traseira direita sob anestesia induzida por isoflurano (3% para indução, 2% na manutenção). Animais controle receberam injeção de solução salina estéril (NaCl, 0,9%) também na pata traseira direita. Após 10 dias da injeção de CFA foi avaliada a sensibilidade mecânica (teste de von Frey), sensibilidade térmica (teste plantar) e o componente aversivo da dor (teste de paradigma de fuga e esquiva).

3. Testes nociceptivos

3.1. Sensibilidade Mecânica

Para o Protocolo 1 a sensibilidade mecânica foi verificada através do limiar de retirada da pata traseira utilizando o analgesímetro eletrônico modelo von Frey (Insight Ltda., Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil). Este aparato consiste de uma sonda manual conectada a uma ponta plástica em formato de cone (área da ponta = 0,7 mm²) e a um aparelho que regula a força aplicada em gramas (g). Para este teste, os camundongos foram posicionados em uma gaiola de metacrilato (12 cm x 10 cm x 17 cm) com um fundo em grade aramada para permitir a estimulação da pata. O aumento da pressão ascendente foi aplicado com a ponta de plástico contra a superfície da pata do animal. A força aplicada em gramas (g) foi registrada continuamente pela unidade principal conectada à sonda. O limiar foi registrado pela remoção

da pata. Como limiar, foi considerada a média de 3 medidas consecutivas, realizadas em intervalos aleatórios (1 a 5 minutos).

No Protocolo 2, a sensibilidade mecânica foi avaliada pelo teste de von Frey utilizando filamentos de von Frey conectado a um aparato eletrônico que mensura o peso em gramas aplicado sobre o filamento, aplicados de acordo com o método Up and Down (Chaplan, 1994). Para o teste, os camundongos foram mantidos em cilindros de metacrilato, 20 cm de altura x 9 cm de diâmetro, com um fundo em grade aramada para permitir a estimulação da pata. Neste protocolo, a sensibilidade mecânica foi determinada pela resposta de retirada da pata traseira à estimulação de filamentos de von Frey que proporcionaram força entre 0,4 g e 3,5 g. A força do próximo filamento foi reduzida ou aumentada, dependendo da resposta de retirada. Retirar, sacudir ou lambear a pata foram considerados reações do tipo nociceptivo.

Em ambos os protocolos, como limiar, foi considerada a média de 3 medidas consecutivas, realizadas em intervalos aleatórios (1 a 10 minutos). Foi realizado um período de habituação de 30 minutos para adaptação ao ambiente antes da realização dos testes.

3.2. Sensibilidade térmica

A sensibilidade térmica foi avaliada a partir da latência de retirada da pata em resposta a um calor radiante usando o dispositivo de teste plantar (UgoBasile, Itália). Para este teste, os camundongos foram colocados em cilindros de metacrilato, 20 cm de altura x 9 cm de diâmetro, apoiados em uma superfície de vidro. A fonte de calor estava localizada sob a superfície plantar da pata traseira e ativada com um feixe de luz. Foi utilizado tempo de corte de 12 s para evitar possíveis danos aos tecidos. A latência de retirada da pata foi calculada a partir da média de 2 a 3 medidas, realizadas em intervalos de 5 minutos para evitar a sensibilização térmica. Nos testes, os camundongos foram habituados ao ambiente por 1 hora antes do experimento.

4. Paradigma de fuga/esquiva ao local (PEAP)

Este protocolo experimental foi fundamentado em trabalhos anteriores de Labuda e Fuchs (2000a) que padronizaram metodologia para avaliar a qualidade aversiva da dor inflamatória ou neuropática.

Após 10 dias da indução da inflamação persistente por CFA, os camundongos foram submetidos a diferentes tratamentos farmacológicos, e expostos a uma caixa de acrílico composta de dois compartimentos. Um compartimento escuro e opaco e outro claro e iluminado, sendo estes separados por anteparo que permitia livre acesso aos dois compartimentos durante 20 minutos de teste. Durante este período, os camundongos foram submetidos à avaliação da sensibilidade mecânica (teste do von Frey, utilizando o analgesímetro eletrônico descrito no item 3.1 - Protocolo 1) na pata inflamada quando permaneciam no ambiente escuro, e na pata contralateral quando no ambiente claro com 15 segundos de intervalo entre as estimulações. O parâmetro avaliado foi o tempo de permanência no compartimento claro.

De acordo com estudos prévios (Labuda e Fuchs, 2000b) os animais têm tendência natural de permanecer mais tempo no compartimento escuro, entretanto, o animal submetido à inflamação tenderá a evitar o compartimento escuro de escolha natural, pois é neste compartimento que ocorre a estimulação aversiva dolorosa.

5. Grupos experimentais e tratamentos farmacológicos

Neste estudo foram realizados diferentes tratamentos de acordo com os Protocolos 1 e 2. Para o Protocolo 1, no 10º dia experimental, os camundongos foram submetidos a administração periférica i.p. de veículo (DMSO 1% + solução salina 0,9%, grupo Controle), ou administração do liberador de molécula de monóxido de carbono (CORM-2, tricarbonyldichlororuthrnum (II), Sigma Aldrich, 5 mg/kg, grupo CORM) ou administração do indutor da enzima HO-1 (CoPP, Protoporphyrin XI, Frontier Scientifics, 2,5 mg/kg), 3 horas antes da realização do teste PEAP tanto para animais WT quando NOS2-KO. Em grupos independentes, camundongos WT receberam tratamento com Naloxone (NLX) (10 mg/kg) ou veículo (solução salina estéril, NaCl 0,9%) i.p. 10 minutos antes dos testes nociceptivos. Foram realizados grupos independentes para avaliação da análise comportamental e da sensibilidade nociceptiva para evitarmos a interferência entre os mecanismos estudados.

Para o Protocolo 2, camundongos WT foram divididos em 4 grupos de 8 animais. Os animais tiveram a pata traseira inflamada com utilização de CFA ou não (administração de solução salina estéril, 0,9%, SS) e foram tratados com veículo (DMSO 1% + solução salina 0,9%), CORM-2, ou CoPP, no 10º dia experimental, 3 h antes da realização dos testes nociceptivos.

As doses e o tempo de administração utilizados neste estudo foram fundamentados em estudos prévios de Cazuza e cols. (2018), Coimbra e cols. (2001) e Negrete e cols. (2014).

As Tabelas 1 a 3 apresentam os grupos experimentais utilizados neste estudo.

Tabela 1: Grupos experimentais de camundongos WT utilizados no Protocolo 1.

Protocolo 1 camundongos WT			
Condição	Tratamento	von Frey	PEAP
Controle (SS)	Veículo+Veículo (n = 16)	n = 6	n = 10
	CoPP+Veículo (n = 12)	n = 6	n = 6
	CORM+Veículo (n = 12)	n = 6	n = 6
	Veículo+Naloxone (n = 12)	n = 6	n = 6
	CoPP+Naloxone (n = 11)	n = 6	n = 5
	CORM+Naloxone (n = 10)	n = 5	n = 5
Inflamação persistente (CFA)	Veículo+Veículo (n = 16)	n = 6	n = 10
	CoPP+Veículo (n = 12)	n = 6	n = 6
	CORM+Veículo (n = 12)	n = 6	n = 6
	Veículo+Naloxone (n = 12)	n = 6	n = 6
	CoPP+Naloxone (n = 13)	n = 6	n = 7
	CORM+Naloxone (n = 10)	n = 5	n = 5

Tabela 2: Grupos experimentais de camundongos KO-NOS2 utilizados no Protocolo 1.

Protocolo 1 Camundongos KO-NOS2			
Condição	Tratamento	von Frey	PEAP
Controle (SS)	Veículo (n = 12)	n = 5	n = 7
	CoPP (n = 9)	n = 5	n = 4
	CORM (n = 9)	n = 5	n = 4
Inflamação persistente (CFA)	Veículo (n = 13)	n = 5	n = 8
	CoPP (n = 11)	n = 5	n = 6
	CORM (n = 11)	n = 5	n = 6

Tabela 3: Grupos experimentais com camundongos WT utilizados no Protocolo 2.

Protocolo 2 Camundongos WT	
Condição	Tratamento
Controle (SS)	Veículo (n = 8)
Inflamação persistente (CFA)	Veículo (n = 8)
	CoPP (n = 8)
	CORM (n = 8)

6. Análise de Western Blotting

Após o término dos experimentos, os camundongos foram submetidos à eutanásia por meio de sobredose anestésica utilizando a associação de cloridrato de xilazina 4% (30 mg/kg) e cloridrato de cetamina 10% (225 mg/kg), sendo em seguida decapitados e realizada a dissecação das áreas encefálicas a serem analisadas. No protocolo 1 analisamos a região dorsal do hipocampo. Enquanto que no Protocolo 2 analisamos a substância cinzenta periaquedutal, a amígdala, a área septal medial e hipocampo ventral. Todas as áreas analisadas foram dissecadas seguindo as coordenadas de Paxinos e Franklin (2004).

Após a dissecação, o tecido da região analisada foi homogeneizado em buffer lys congelante (50mM Base-Tris, 150mM NaCl, 1% NP-40, 2 mM EDTA, 1 mM fluoreto de, 0.5 Triton X-100, 0.1% SDS, 1 mM Na₃VO₄, 25 mM NaF, 0.5% coquetel inibidor de protease, 1% coquetel inibidor de fosfatase).

Todos os reagentes foram comprados da Sigma (St. Louis, MO, USA) com exceção do NP-40 proveniente da Calbiochem (Darmstadt, Germany). A amostra homogeneizada foi dissolvida 1 hora a 4°C, sonificado por 10 segundos e centrifugado a 4°C por 15 minutos a 700 g. O sobrenadante (60 µg do total de proteína) misturado com tampão 4x e adicionado a 4% de tampão de homogeneização e separado em gel 10% de SDS- poliacrilamida.

Para o Protocolo 1, os níveis de proteínas foram então transferidos por eletroforese para membrana de nitrocelulose por 90 minutos e bloqueada com tampão fosfato salina + 5% de leite desnatado e incubada overnight 4°C com os anticorpos policlonais de HO-1 (Abcam, ab13248 1:500), NOS1 (Abcam, ab3511 1:500), NOS2 (Abcam, ab3523 1:500), MOR (Abcam, ab10275 1:2000) ou DOR (Abcam, ab10272 1:1000) e bloqueio com PBST+5% de leite desnatado. As proteínas foram detectadas por anticorpo secundário peroxidase-conjugada horseradish anti-coelho (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) e visualizado por reagentes de quimioluminescência (ECL kit, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA) e exposição em Sistema de Imagem XR Gel Doc (Bio-Rad, BR). A intensidade do blot foi quantificada por densitometria utilizando ImageJ (NIH, USA). As membranas foram abertas e reveladas com anticorpo monoclonal de coelho anti- β -actina (1:10.000, Sigma, St. Louis, MO, USA).

Para o Protocolo 2, os níveis de proteínas foram transferidos por eletroforese para membrana de PVDF por 90 minutos e bloqueado com tampão fosfato salina + 5% de leite desnatado ou 5% BSA e incubado overnight a 4°C com os anticorpos policlonais anti PI3K, NQO1, JNK/p-JNK, ERK1-2/p-ERK1-2, BDNF, BAX, NOS2, HO-1 e p-AKT/AKT (todos na diluição de 1:250, Sigma, St. Louis, MO, USA) e bloqueio com leite desnatado 5% em

PBST. As proteínas foram detectadas por anticorpo secundário conjugado com horseradish peroxidase anti-coelho (1:10.000, GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) e visualizado por reagentes de quimioluminescência (ECL kit, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA) e exposição em fotodocumenador. A intensidade do blot foi quantificada por densitometria também utilizando ImageJ (NIH, USA). As membranas foram abertas e reveladas com anticorpo monoclonal de coelho anti-GAPDH como controle interno (1:5.000, Sigma, St. Louis, MO, USA).

7. Delineamento experimental

No Protocolo 1, após o período de habituação por 7 dias no biotério, em um primeiro conjunto de experimentos camundongos WT e NOS2-KO foram submetidos ao teste de von Frey para avaliação da sensibilidade mecânica basal. Em seguida foram anestesiados por meio de anestesia inalatória com isoflurano (descrito no item 2 desta Seção), sendo realizada a administração de CFA ou SS na pata posterior direita para indução da inflamação. Durante 10 dias foi acompanhado o desenvolvimento da inflamação por meio do teste de von Frey. No 10º dia experimental foi realizado o teste de von Frey antes e após 3 h dos diferentes tratamentos farmacológicos. Após o teste de von Frey, os camundongos foram submetidos ao teste PEAP, para avaliação da aversividade à dor. Em um segundo experimento, além do tratamento com veículo, CORM-2 ou CoPP, os camundongos foram tratados 10 minutos antes do último teste de von Frey e do PEAP com NLX (10 mg/kg i.p) ou solução salina 0,9% (veículo). Ao término dos experimentos, os camundongos foram submetidos à eutanásia com sobredose anestésica, os encéfalos foram coletados e a região dorsal do hipocampo foi dissecada para quantificação da expressão proteica de HO-1, NOS1, NOS2, MOR e DOR para cada genótipo estudado (WT e KO-NOS2) através de ensaio de Western Blot.

No Protocolo 2, foi analisada inicialmente a linha de base para sensibilidade mecânica e térmica. Após esta análise, foi realizada a administração de CFA ou solução salina estéril (NaCl, 0,9%) intra-plantar. Todos os camundongos foram testados nos dias 3, 4, 7 e 10 após a injeção de CFA. Como tratamento, os animais foram submetidos a injeções i.p. com veículo, CoPP ou CORM-2, duas vezes ao dia durante 7 dias, do 3º ao dia 10º após a injeção de CFA. Ao término dos experimentos, os camundongos foram submetidos à eutanásia, os encéfalos foram coletados, e as regiões da substância cinzenta periaquedutal, amígdala, área septal medial e hipocampo ventral foram dissecadas para análise por Western Blot. Neste conjunto

de regiões encefálicas foram analisadas as seguintes expressões proteicas: HO-1, NOS2, NQO1, p-ERK 1/2, ERK 1/2, p-JNK, JNK, PI3K, p-AKT, AKT, BDNF e BAX.

Em ambos os protocolos os experimentadores eram cegos quanto ao tratamento dos diferentes grupos experimentais. A Figura 1 apresenta o delineamento experimental utilizado em cada um dos nossos protocolos.

Figura 1: Delineamento experimental utilizado neste estudo. Foram realizados 2 Protocolos (1 e 2). No protocolo 1, os experimentos foram divididos em 3 conjuntos independentes, conforme a figura. No estudo A foi realizado o teste de von Frey (vF), no estudo B a avaliação da aversividade à dor (teste PEAP) e no estudo C avaliou-se o efeito do tratamento com naloxone (NLX) sobre a administração aguda de CoPP e CORM-2. O protocolo 2 foi realizado utilizando o tratamento crônico, 2 vezes ao dia com CoPP ou CORM-2.

8. Análise dos resultados

Para o Protocolo 1 foi realizada ANOVA de duas vias para os fatores inflamação e tratamentos farmacológicos tanto para análises comportamentais quanto moleculares.

Foi realizado pós-teste de Tukey sendo consideradas diferenças significativas quando $P < 0,05$.

Para o Protocolo 2 foi realizada ANOVA de uma via para onde os fatores analisados foram os tratamentos (tanto somente com CFA quanto com CFA + tratamento farmacológico) em comparação com seu respectivo controle tanto para as análises comportamentais quanto moleculares. Foi realizado pós-teste Newman-Keuls sendo considerada diferença estatisticamente significativa quando $P < 0,05$.

Tanto para o protocolo 1 e protocolo 2 as análises de Western Blot seguiram a expressão proteica relativa à sua proteína de controle interno (β - Actina ou GABDH). Dessa forma, a expressão de cada proteína foi dividida pela expressão total de controle para cada banda.

Para todas as análises estatísticas foi realizado um teste de normalidade de Kolmogorov – Smirnov para verificar se os dados seguiam uma distribuição normal. Todos os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). As análises estatísticas e os gráficos foram realizados com o auxílio do Programa GraphPad Prism versão 8.4.3.

Resultados

Protocolo 1: Avaliação do efeito da ativação da via HO-CO na modulação da dor e a participação de receptores opioides hipocampais.

Este protocolo foi realizado para avaliar se a ativação da via HO-CO em camundongos WT e KO-NOS2 modula a dor induzida pela inflamação persistente (CFA) e se há envolvimento de receptores opioides hipocampais. Foi realizado o teste nociceptivo para avaliar a sensibilidade mecânica (von Frey) e o teste de paradigma de fuga-esquiva (PEAP), para análise do componente aversivo-motivacional da dor, em camundongos Wild Type (WT) e iNOS-KO com inflamação persistente nas patas induzida por injeção intraplantar de adjuvante completo de Freund (CFA, 30 μ l). Além disso, avaliou-se por meio de ensaio de Western Blot a expressão proteica de HO-1, NOS1, NOS2, MOR e DOR no hipocampo dorsal. Todos os dados seguiram distribuição normal segundo teste de Kolmogorov – Smirnov.

Avaliação da sensibilidade mecânica em camundongos WT e NOS2-KO com inflamação persistente da pata traseira

Os resultados mostraram que a administração de CFA na pata traseira reduziu o limiar mecânico do reflexo de retirada em camundongos WT e NOS2-KO (Figura 2), em todos os tempos experimentais. A ANOVA de duas vias para medidas repetidas nos grupos WT evidenciou diferença significativa no fator tempo ($F_{4,88} = 10,86$, $P < 0,0001$), na inflamação ($F_{3,22} = 97,62$, $P < 0,0001$) e interação entre o tempo e inflamação ($F_{12,88} = 11,01$; $P < 0,0001$, Figura 2A). O teste post hoc de Tukey revelou que o limiar mecânico da pata ipsilateral no grupo WT-CFA foi diferente ($P < 0,001$) quando comparado com os grupos WT-SS 1, 3, 7 e 10 dias após a injeção, bem como com seus respectivos valores basais ($P < 0,001$, teste de Tukey) (Figura 2A). A análise estatística (ANOVA de dois fatores de medidas repetidas) dos grupos NOS2-KO revelou diferença significativa no fator tempo ($F_{4,80} = 8,850$, $P < 0,0001$), na inflamação ($F_{3,20} = 418,1$, $P < 0,0001$), e interação entre tempo e inflamação ($F_{12,80} = 14,94$, $P < 0,0001$, Figura 2A). O teste de Tukey mostrou diferenças significativas durante todos os tempos experimentais ao comparar o grupo NOS2-KO-CFA com o NOS2-KO-SS (Figura 2A, $P < 0,001$).

Embora o limiar mecânico do reflexo de retirada no grupo NOS2-KO-CFA tenha sido diferente durante todo o tempo experimental quando comparado com seus respectivos valores

basais (teste de Tukey $P < 0,001$), o 10º dia foi diferente quando comparado ao 1º e 3º dia no mesmo grupo (teste de Tukey $P < 0,01$, Figura 2A). Como dados complementares, a Tabela 4 apresenta a porcentagem de recuperação do limiar mecânico de retirada da pata em camundongos WT e NOS2-KO.

Além disso, nossos resultados demonstraram que o tratamento agudo com CORM-2 ou CoPP (i.p.) reduziu a alodinia mecânica induzida pela injeção de CFA em ambas as cepas WT e NOS2-KO (Figura 2B). A ANOVA de duas vias para medidas repetidas aplicadas nos grupos WT evidenciou efeito do tratamento ($F_{5,30} = 65,29$, $P < 0,0001$), efeito da inflamação ($F_{2,60} = 53,98$, $P < 0,0001$) e interação inflamação-tratamento ($F_{10, 60} = 17,35$, $P < 0,0001$). O teste post hoc de Tukey revelou que os grupos WT-CFA + VEHI, WT-CFA + CORM-2 e WT-CFA + CoPP foram diferentes no pré-tratamento ($P < 0,01$) quando comparados com os grupos que receberam injeção de SS (WT-SS + VEHI, WT-SS + CORM-2 e WT-SS + CoPP, Figura 2B). Além disso, 3 h após a injeção i.p. com CORM-2 ou CoPP, ocorre recuperação parcial, sendo observado efeito anti-alodínico, vez que os grupos WT-CFA + CORM-2 e WT-CFA + CoPP foram diferentes (teste de Tukey, $P < 0,0001$) em relação ao grupo WT-CFA + VEHI, bem como com seus respectivos limiares mecânicos na linha de base e aqueles obtidos no momento pós-tratamento nos grupos WT-SS + VEHI, WT-SS + CORM-2 e WT-SS + CoPP (Figura 2B) (teste de Tukey, $P < 0,01$). O limiar de retirada mecânica nos grupos WT-SS + VEHI, WT-SS + CORM-2 e WT-SS + CoPP não se alterou durante todo o tempo experimental (Figura 2B). Considerando os grupos NOS2-KO, o tratamento com CORM-2 ou CoPP bloqueou a redução do limiar de retirada mecânica induzida pela administração de CFA (Figura 2B). A aplicação da ANOVA de duas vias para medidas repetidas evidenciou efeito de tratamento ($F_{5,24} = 41,33$, $P < 0,0001$), efeito da inflamação ($F_{2,48} = 44,17$, $P < 0,0001$) e interação inflamação-tratamento ($F_{10,48} = 14,77$, $P < 0,0001$). O teste post hoc de Tukey revelou que os grupos NOS2-KO-CFA + VEHI, NOS2-KO CFA + CORM-2 e NOS2-KO-CFA + CoPP foram diferentes no pré-tratamento ($P < 0,01$) quando comparados aos grupos que receberam injeção de SS (NOS2-KO-SS + VEHI, NOS2-KO-SS + CORM-2 e NOS2-KO-SS + CoPP, Figura 2B). No entanto, 3 h após a injeção i.p. tratamento com VEHI, CORM-2 ou CoPP, o limiar mecânico somente foi diferente no grupo NOS2-KO-CFA + VEHI quando comparado com seu respectivo grupo controle (NOS2-KO-SS + VEHI, teste de Tukey $P < 0,01$) e com os outros grupos CFA (NOS2-KO CFA + CORM-2 e NOS2-KO-CFA + CoPP, teste de Tukey $P < 0,001$, Figura 1B). As Tabelas 5 e 6 mostraram a recuperação percentual do limiar de retirada mecânica em relação às respectivas linhas de base.

Figura 2: Avaliação do limiar mecânico em camundongos WT. (A) Teste de von Frey realizado no período basal, nos dias 1º, 3º, 7º e no 10º dia experimental (período pré-tratamento) após indução da inflamação persistente por administração de adjuvante completo de Freund (CFA) nas patas ou não (administração de solução salina 0,9%, SS) e (B) 3h após (pós-tratamento) o tratamento sistêmico (i.p.) com DMSO (1%), CORM-2 (5 mg/kg) ou CoPP (2,5 mg/kg). * $P < 0,05$ quando comparado com os grupos SS+DMSO, SS+CORM e SS+CoPP, e # $P < 0,05$ quando comparado com grupo CFA+DMSO. $n = 6$ para cada grupo experimental. Dados expressos em média $\pm$ EPM.

Tabela 4. Média $\pm$ EPM do limiar de retirada de pata (a 1, 3, 7 e 10 dias) e a porcentagem em relação ao basal (no dia 10) no teste de von Frey em camundongos WT e NOS2-KO com dor inflamatória persistente induzida por CFA (CFA, 30 μ l) ou administração de salina 0.9% (SS) (n = 6 para cada grupo)

		WT		NOS2-KO	
		SS	CFA	SS	CFA
Limiar de retirada de pata (g)	Basal	9.2 $\pm$ 0.4	8.7 $\pm$ 0.4	9.6 $\pm$ 0.3	8.9 $\pm$ 0.1
	Dia 1	8.9 $\pm$ 0.5	3.2 $\pm$ 0.2	9.4 $\pm$ 0.2	3.3 $\pm$ 0.3
	Dia 3	8.7 $\pm$ 0.4	4.2 $\pm$ 0.4	9.2 $\pm$ 0.2	3.7 $\pm$ 0.5
	Dia 7	9.7 $\pm$ 0.6	3.5 $\pm$ 0.4	9.0 $\pm$ 0.1	4.2 $\pm$ 0.5
	Dia 10	8.6 $\pm$ 0.5	3.2 $\pm$ 0.3	9.2 $\pm$ 0.2	5.2 $\pm$ 0.4
% em Relação ao Basal		93.2 $\pm$ 1.1	37.0 $\pm$ 0.7	96.0 $\pm$ 0.7	58.0 $\pm$ 2.4

Tabela 5. Média $\pm$ EPM do limiar de retirada da pata ipsilateral e a porcentagem em relação ao basal no pós tratamento no teste de von Frey em camundongos WT com inflamação persistente induzida por CFA (CFA, 30 μ l) ou administração de salina 0.9% (SS) (n = 6 para cada grupo)

		Groups			
		SS+Veículo	CFA+Veículo	CFA+CORM-2	CFA+CoPP
Limiar de retirada de pata (g)	Basal	9.8 $\pm$ 0.5	8.8 $\pm$ 0.5	10.1 $\pm$ 0.7	10.0 $\pm$ 0.3
	Pré-tratamento	10.0 $\pm$ 0.4	3.6 $\pm$ 0.1	3.3 $\pm$ 0.4	3.0 $\pm$ 0.3
	Pós-tratamento	9.7 $\pm$ 0.4	2.8 $\pm$ 0.3	6.2 $\pm$ 0.4	7.0 $\pm$ 0.5
% em Relação ao Basal		99.5 $\pm$ 0.7	32.2 $\pm$ 0.5	61.7 $\pm$ 0.5	69.8 $\pm$ 1.5

Tabela 6. Média $\pm$ EPM do limiar de retirada da pata ipsilateral e a porcentagem em relação ao basal no pós tratamento no teste de von Frey em camundongos NOS2-KO com inflamação persistente induzida por CFA (CFA, 30 μ l) ou administração de salina 0.9% (SS) (n = 6 para cada grupo)

		Groups			
		SS+Veículo	CFA+Veículo	CFA+CORM-2	CFA+CoPP
Limiar de retirada de pata (g)	Basal	9.6 $\pm$ 0.4	8.9 $\pm$ 0.2	9.0 $\pm$ 0.2	9.3 $\pm$ 0.4
	Pré-tratamento	9.2 $\pm$ 0.2	5.2 $\pm$ 0.1	4.3 $\pm$ 0.6	4.6 $\pm$ 0.1
	Pós-tratamento	9.5 $\pm$ 0.3	5.5 $\pm$ 0.2	8.9 $\pm$ 0.7	9.2 $\pm$ 0.2
% em Relação ao Basal		98.9 $\pm$ 0.3	61.7 $\pm$ 0.2	98.8 $\pm$ 0.5	98.9 $\pm$ 0.3

Avaliação da aversividade à dor (teste PEAP) em camundongos WT e NOS2-KO com inflamação persistente da pata traseira.

Os resultados mostraram que a injeção de CFA promoveu aumento na porcentagem de tempo no compartimento claro no grupo WT-CFA + VEHI, e esse efeito foi bloqueado pelo tratamento agudo com CORM-2 ou CoPP na linhagem WT (Figura 3A). Porém, nos grupos NOS2-KO não se observou alteração nos parâmetros avaliados no PEAP quando comparados aos grupos que receberam injeção de SS (Figura 3B).

A análise estatística (ANOVA de dois fatores) do tempo de permanência no compartimento claro para os grupos WT revelou diferença no fator inflamação ($F_{1,40} = 4,35$, $P < 0,0001$), no tratamento ($F_{2,40} = 14,82$, $P < 0,0001$) e interação entre inflamação e tratamento ($F_{2,40} = 20,95$, $P < 0,0001$). O teste post-hoc de Tukey mostrou diferença significativa ($P < 0,0001$) entre o grupo WT-CFA + VEHI quando comparado ao WT-SS + VEHI (Figura 3A). Além disso, nenhuma diferença foi observada entre WT-SS + CORM-2 e WT-CFA + CORM-2, nem entre WT-SS + CoPP e WT-CFA + CoPP (Figura 3A).

Por outro lado, nos grupos NOS2-KO, a análise estatística (ANOVA de duas vias) da porcentagem de tempo de permanência no compartimento claro da câmara de teste não evidenciou qualquer alteração nesta medida de resultado considerando fatores de tratamento e inflamação (Figura 3B).

Figura 3: Avaliação da aversividade à dor. Teste do PEAP foi realizado no 10º dia experimental após indução da inflamação persistente por administração de adjuvante completo de Freund (CFA) na pata posterior ou não (administração de solução salina 0,9%, SS), 3h após o tratamento sistêmico (i.p.) com DMSO (1%), CORM-2 (5 mg/kg) ou CoPP (2,5 mg/kg), em camundongos selvagens (WT, A) ou iNOS-KO (B). * $P < 0,05$ quando comparado com o grupo SS+DMSO. $n = 6$ para cada grupo experimental. Dados expressos em média $\pm$ EPM.

Efeito do bloqueio do receptor opioide em testes de PEAP e von Frey de camundongos WT com inflamação persistente e tratados com CORM-2 e CoPP.

Para verificar o papel dos receptores opioides na analgesia induzida por HO-1 no modelo de dor inflamatória, avaliamos os efeitos do NLX nos testes de von Frey e PEAP de camundongos WT tratados com CORM-2 e CoPP. Os resultados mostraram que o NLX foi capaz de reverter os efeitos de CORM-2 e CoPP na alodinia mecânica e na aversividade à dor induzida por CFA (Figuras 4A e 4B). Uma ANOVA de duas vias para medidas repetidas mostrou diferença significativa do teste de von Frey no fator de tratamento ($F_{11,54} = 57.12$, $P < 0.0001$), fator tempo ($F_{2,108} = 196.20$, $P < 0.0001$) e interação de tratamento e tempo ($F_{22,108} = 24.30$, $P < 0.0001$). O pós-teste de Tukey ($P < 0.0001$) mostrou uma diferença significativa entre os grupos CFA (CFA VEÍCULO + VEÍCULO, CFA CORM-2 + VEÍCULO, CFA CoPP + VEÍCULO, CFA VEÍCULO + NLX, CFA CORM-2 + NLX e CFA CoPP + NLX) grupos quando comparados com seus respectivos grupos de controle (SS VEÍCULO + VEÍCULO, SS CORM-2 + VEÍCULO, SS CoPP + VEÍCULO, SS VEÍCULO + NLX, SS CORM-2 + NLX e SS CoPP + NLX) no período de pré-tratamento (Figura 4A). No período pós-tratamento, o limiar de retirada de pata dos grupos CFA CORM-2 + VEÍCULO e CFA CoPP + VEÍCULO foram diferentes quando comparados com CFA VEÍCULO + VEÍCULO, CFA VEÍCULO + NLX e CFA CoPP + NLX ao mesmo tempo (Teste de Tukey $P < 0.0001$). Além disso, CFA CoPP + VEÍCULO foi diferente quando comparado a CFA CORM + NLX ($P = 0.0042$), mas CFA CORM-2 + VEÍCULO não diferiu de CFA CORM-2 + NLX ($P = 0.052$). Em todos os grupos de CFA, o limiar mecânico difere quando comparado com seus respectivos grupos controle (grupos SS) no pós-tratamento (Figura 4A, $P < 0.0001$).

No teste PEAP uma ANOVA de duas vias mostrou diferenças significativas no fator de tratamento ($F_{5,54} = 9.341$, $P < 0.0001$), fator inflamação ($F_{1,54} = 67.49$, $P < 0.0001$) e interação inflamação-tratamento ($F_{5,54} = 13.64$, $P < 0.0001$). O pós-teste de Tukey mostrou uma diferença significativa entre o CFA VEÍCULO + VEÍCULO ($P < 0.0001$), CFA VEÍCULO + NLX ($P < 0.0001$), CFA CORM + NLX ($P = 0.0033$) e CFA CoPP + NLX ($P = 0.0084$) quando comparados aos seus respectivos grupos de controle (SS VEÍCULO + VEÍCULO, SS VEÍCULO + NLX, SS CORM + NLX e SS CoPP + NLX, Figura 4B). Em contraste, os grupos CFA CORM-2 + VEÍCULO e CFA CoPP + VEÍCULO não diferiram de seu grupo controle (SS CORM-2 + VEÍCULO, SS CoPP + VEÍCULO, Figura 4B).

Figura 4. Sensibilidade mecânica da pata ipsilateral (A) e aversividade à dor (B) em camundongos WT avaliados no teste de von Frey e PEAP, respectivamente. Sensibilidade mecânica (von Frey) e teste de PEAP foram realizados no 10º dia experimental após a indução da inflamação persistente pela administração de adjuvante de Freund completo (CFA, 30 µl) na pata traseira direita ou não (administração de solução salina 0,9%, SS), 3 h após o tratamento sistêmico (ip) com veículo (Veículo, DMSO 1%), CORM-2 (5 mg/kg) ou CoPP (2,5 mg/kg) e 10 minutos após o tratamento ip com NLX (10 mg/kg) ou seu respectivo veículo (Veículo, 0,9 % solução salina). * $P < 0,01$, teste de Tukey quando comparado ao seu respectivo grupo controle. @ $P < 0,0001$, teste de Tukey quando comparado ao grupo CFA CoPP + Veículo no pós-tratamento. $n = 5-7$ animais para cada grupo experimental. Dados expressos como média $\pm$ EPM.

Efeito de CORM-2 e CoPP nos níveis de proteína HO-1, NOS-1 e NOS-2 no hipocampo de camundongos WT e NOS2-KO com e sem inflamação persistente.

Para melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na ativação da via HO-CO na modulação da dor, foi realizado ensaio de Western Blot para avaliação dos níveis das proteínas HO-1, NOS1, NOS2 na região dorsal do hipocampo. Nossos resultados mostraram que a inflamação persistente induzida por CFA per se não alterou a expressão de HO-1, NOS-1 ou NOS-2 no hipocampo de animais WT (Figura 5). No entanto, o tratamento agudo com CORM-2 ou CoPP promoveu aumento nos níveis da proteína HO-1 em camundongos WT (Figura 5A), mas não das enzimas NOS-1 ou NOS-2 (Figura 5B e C).

A ANOVA de duas vias mostrou diferença significativa na expressão de HO-1 na linhagem WT considerando o fator tratamento ($F_{2,30} = 26,24$, $P < 0,0001$) e inflamação ($F_{1,30} = 4,42$, $P = 0,04$), mas não há interação inflamação - tratamento. O pós-teste de Tukey ($P < 0,01$) mostrou aumento significativo na expressão de HO-1 nos grupos WT-CFA + CORM-2, WT-SS + CoPP e WT-CFA + CoPP quando comparados aos seus respectivos grupos controle (WT-CFA + Veículo, WT-SS + Veículo, Figura 5A).

Nos grupos NOS2-KO, embora a análise estatística (ANOVA de duas vias) dos resultados obtidos com a expressão da proteína HO-1 tenha revelado efeito significativo do fator tratamento ($F_{2,30} = 4,15$, $P = 0,02$, Figura 5D), não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos (pós-teste de Tukey). Em relação à expressão da proteína NOS1 não foi observada alteração nos distintos grupos (Figura 5E).

Efeito de CORM-2 e CoPP nos níveis de proteína MOR e DOR no hipocampo de camundongos WT e NOS2-KO com e sem inflamação persistente.

Os resultados mostraram que os tratamentos agudos CORM-2 e CoPP aumentam a expressão de MOR e DOR na área do hipocampo dorsal de camundongos WT (Figura 6A e B). Além disso, a injeção de CFA não alterou a expressão das proteínas MOR e DOR na área do hipocampo per se em nenhuma das linhagens avaliadas (Figura 6). A aplicação da ANOVA de duas vias mostrou diferença significativa na expressão de MOR no hipocampo dorsal de camundongos WT, considerando o fator tratamento ($F_{2,28} = 17,67$, $P < 0,0001$), mas nenhuma diferença no fator inflamação nem interação tratamento e inflamação. O pós-teste de Tukey ($P < 0,05$) mostrou aumento significativo na expressão de MOR no WT-CFA + CORM-2 em comparação com WT-CFA + Veículo e no WT-SS + CoPP e WT-CFA + CoPP em comparação com WT-SS + Veículo e WT-CFA + Veículo, respectivamente (Figura

6A). Na linhagem NOS2-KO, a aplicação da ANOVA de duas vias nos resultados da expressão de MOR não mostrou nenhuma alteração significativa (Figura 6C).

Em relação ao DOR, a análise estatística (ANOVA de dois fatores) na linhagem WT mostrou diferenças considerando o tratamento ($F_{2,30} = 20,42$, $P < 0,0001$) e o fator inflamação ($F_{1, 30} = 9,05$, $P < 0,0053$), mas não há interação entre inflamação e tratamento. O pós-teste de Tukey mostrou aumento significativo na expressão de DOR no hipocampo dorsal dos grupos WT-CFA-CORM-2, WT-SS-CoPP e WT-CFA-CoPP, quando comparados aos respectivos controles (WT-SS + Veículo e WT-CFA + Veículo, Figura 6B). Em contraste, em camundongos NOS2-KO, não foi evidenciada qualquer alteração na expressão da proteína DOR em nenhum dos grupos experimentais (Figura 6D).

Figura 5: Expressão das enzimas HO-1, iNOS e nNOS em hipocampo dorsal de camundongos WT. Quantificação relativa da expressão das enzimas HO-1 (A e D), NOS1 (B e E) e NOS2 (C) por técnica de Western Blot no 10º dia experimental após indução da inflamação persistente por administração de adjuvante completo de Freund (CFA) na pata posterior ou não (administração de solução salina 0,9%, SS), 3h após o tratamento sistêmico (i.p.) com DMSO (1%), CORM-2 (5 mg/kg) ou CoPP (2,5 mg/kg). a $P < 0,05$, teste de Tukey quando comparado com o grupo SS+DMSO. b $P < 0,05$, teste de Tukey quando comparado com o grupo CFA+DMSO. $n = 4-6$ para cada grupo experimental. Dados expressos em média $\pm$ EPM.

Figura 6: Expressão dos receptores MOR e DOR no hipocampo dorsal de camundongos WT. Quantificação relativa da expressão dos receptores MOR (A) e DOR (B) por técnica de Western Blot no 10º dia experimental após indução da inflamação persistente por administração de adjuvante completo de Freund (CFA, 30µL) na pata posterior ou não (administração de solução salina 0,9%, SS), 3h após o tratamento sistêmico (i.p.) com DMSO (1%), CORM-2 (5 mg/kg) ou CoPP (2,5 mg/kg). a $P < 0,05$, teste de Tukey quando comparado com o grupo SS+DMSO. b $P < 0,05$, teste de Tukey quando comparado com o grupo CFA+DMSO. n = 4-6 para cada grupo experimental. Dados expressos em média $\pm$ EPM.

Protocolo 2: Avaliação do efeito da ativação da via HO-CO nos marcadores inflamatórios em estruturas do sistema límbico em modelo de dor inflamatória persistente.

Este conjunto de experimentos avaliou o efeito do tratamento repetido com CoPP ou CORM-2 na expressão proteica de diferentes marcadores inflamatórios em estruturas do sistema límbico. Foram realizados testes de sensibilidade mecânica e térmica para avaliar a

resposta inflamatória e ao término dos experimentos, foram realizados ensaios de Western Blot para verificação da expressão de fatores de transcrição, marcadores antioxidantes e neurotróficos em áreas encefálicas relacionadas à aversão à dor e nocicepção (SCP, AMG, HPV e SM). Todos os dados seguiram distribuição normal segundo teste de Kolmogorov – Smirnov.

Avaliação do efeito da ativação da via HO-CO na sensibilidade mecânica e térmica em modelo de dor inflamatória persistente.

As sensibilidades mecânica e térmica foram avaliadas usando von Frey e o teste plantar, respectivamente, durante o desenvolvimento da resposta inflamatória e no 10º dia da injeção de CFA, tendo sido realizado o tratamento repetido por 7 dias com CORM-2, CoPP ou Veículo duas vezes ao dia (Figura 7).

No teste de von Frey, a aplicação da ANOVA de uma via mostrou diferença significativa entre os grupos ($F_{3, 20} = 39,12$, $P < 0,0001$), e a análise post-hoc de Newman Keuls apontou que o grupo CFA promoveu redução do limiar de força para a emissão do reflexo de retirada da pata ($P < 0,0001$) quando comparado com grupo controle (Salina). Os tratamentos com CORM-2 ou CoPP em camundongos com inflamação persistente induzida por administração de CFA recuperou o limiar de retirada da pata aos níveis basais ($P > 0,05$, Newman-Keuls) quando comparado com SS-VEHI, indicando redução da alodinia mecânica (Figura 7A).

Considerando a sensibilidade térmica, a análise estatística (ANOVA de uma via) mostrou diferença significativa entre os grupos no teste plantar ($F_{3, 20} = 24,94$, $P < 0,0001$). O pós-teste de Newman Keuls apontou redução na latência de retirada da pata em camundongos com inflamação persistente induzida pelo CFA ($P < 0,0001$) comparado com o grupo controle, indicando hiperalgesia com recuperação após os tratamentos i.p. com CORM-2 e CoPP ($P > 0,05$, Figura 7B).

Figura 7: Efeitos antialodínicos e anti-hiperalgésicos do dímero tricarbonildiclororutênio (II) (CORM-2) e protoporfirina IX de cobalto (CoPP) em camundongos machos do tipo selvagem (WT) com inflamação periférica. Sensibilidade mecânica (A) e sensibilidade térmica (B) na pata ipsilateral de camundongos tratados por 7 dias, duas vezes ao dia com veículo, CORM- 2 ou CoPP no 10º dia experimental após a administração de adjuvante completo de Freund (CFA) ou solução salina (SS). * $P < 0,05$, teste de Newman-Keuls comparado com SS-Veículo, + $P < 0,05$, teste de Newman-Keuls comparado com o CFA-Veículo. Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM; $n = 8$ animais por grupo.

Expressão de p-ERK 1-2, JNK, PI3K, p-AKT, HO-1, NQO1, NOS2, BDNF e BAX na substância cinzenta periaquedutal de camundongos WT com inflamação periférica

A aplicação da ANOVA de uma via nos resultados de Western Blot mostrou diferença significativa na expressão de p-ERK 1/2 ($F_{3,18} = 9,481$ $P = 0,0006$), e o teste post-hoc de Newman-Keuls apontou redução da expressão no grupo CFA ($P < 0,001$). Este efeito foi prevenido pela administração de CORM-2 ou CoPP (Figura 8A). Não foram observadas alterações nos níveis de p-JNK ($F_{3,18} = 0,4931$ $P > 0,05$, ANOVA de uma via, Figura 8B).

A análise dos resultados da expressão de PI3K evidenciou diferença significativa ($F_{3,18} = 3,239$, $P = 0,0466$, ANOVA de uma via). O pós-teste de Newman Keuls mostrou que o grupo CFA+Veículo apresentou redução nos níveis de PI3K ($P < 0,05$) comparado com os demais grupos. Os tratamentos com CORM-2 ou COPP preveniram esta redução (Figura 8C).

Com relação à expressão de p-AKT a ANOVA uma via mostrou diferença significativa ($F_{3,14} = 5,879$, $P = 0,0082$). Entretanto, em contraste com a expressão de PI3K, o grupo CFA apresentou aumento nos níveis de p-AKT ($P < 0,01$) quando comparado com grupo controle, com recuperação dos níveis basais no grupo que recebeu tratamento com CORM-2 ($P < 0,05$ Newman Keuls), mas não com CoPP ($P > 0,05$, Newman Keuls, Figura 8D).

Em relação aos níveis de proteínas oxidativas, a ANOVA de uma via apontou diferença significativa entre os grupos em relação à expressão de HO-1 ($F_{3,13} = 4,992$ $P = 0,016$). O pós-teste de Newman Keuls evidenciou que a inflamação na pata induzida por CFA reduziu a expressão de HO-1 ($P < 0,05$) e os tratamentos com CORM-2 ou CoPP normalizaram os níveis em relação ao grupo SS-Veículo (Figura 8E). A ANOVA também evidenciou diferença significativa na expressão de NQO1 ($F_{3,17} = 8,665$, $P = 0,0010$). O teste post-hoc de Newman Keuls apontou que a expressão de NQO1 foi elevada pelo tratamento com CORM-2 ou CoPP em relação ao grupo controle (SS-Veículo, $P < 0,005$, Figura 8F). Considerando a expressão de NOS-2, a aplicação da ANOVA de uma via não evidenciou alteração nesta região ($F_{3,14} = 0,3744$, $P = 0,7728$, Figura 8G).

A ANOVA de uma via mostrou diferença significativa entre os grupos em relação à expressão de BDNF ($F_{3,13} = 4,418$, $P = 0,0238$). Os tratamentos com CORM-2 e CoPP aumentaram os níveis relativos da proteína BDNF em relação ao controle ($P < 0,05$ Newman Keuls) (Figura 8H). Entretanto nenhuma alteração foi mostrada na expressão relativa de BAX na SCP ($F_{3, 14} = 0,8998$, $P = 0,4658$, Figura 8I).

Figura 8: Efeitos da ativação da via HO-CO pelo tratamento com CoPP ou CORM-2 na expressão proteica de p-ERK 1/2 (A), p-JNK (B), PI3K (C), p-AKT (D), HO-1 (E), NQO1 (F), NOS2 (G), BDNF (H), e BAX (I) na substância cinzenta periaquedutal de camundongos WT no 10º dia de inflamação persistente induzida pela administração de CFA ou veículo (Solução Salina, SS). * $P < 0,05$ teste de Newman-Keuls comparado com grupo SS-VEHI; + $P < 0,05$ teste de Newman-Keuls comparado com grupo CFA-VEHI, # $P < 0,05$ teste de Newman-Keuls comparado com grupo CFA+CORM-2. Os níveis de proteínas fosforiladas são indicados em relação aos níveis de proteínas totais correspondentes, enquanto os níveis das proteínas restantes são relativos aos níveis de GAPDH. Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM; $n = 4$ por grupo.

Expressão de p-ERK 1-2, JNK, PI3K, p-AKT, HO-1, NQO1, NOS2, BDNF e BAX na amígdala de camundongos WT com inflamação periférica

A análise dos resultados do ensaio de Western Blot quanto à expressão de p-ERK ½ evidenciou diferença significativa ($F_{3,17} = 8,333$, $P = 0,0013$, ANOVA de uma via) entre os grupos. O pós-teste de Newman Keuls apontou que o grupo CFA+Veículo apresentou redução na expressão proteica quando comparado com controle ($P < 0,005$), e o tratamento com CORM-2 ou CoPP preveniu este efeito (Figura 9A). Com relação aos níveis de p-JNK a análise estatística não mostrou diferença significativa entre os grupos ($F_{3,16} = 0,1056$, $P = 0,9556$, ANOVA de uma via, Figura 9B).

Considerando a expressão de PI3K, a aplicação da ANOVA de uma via apontou diferença significativa ($F_{3,16} = 3,725$, $P = 0,0332$), sendo que o pós-teste de Newman-Keuls evidenciou redução da expressão no grupo CFA+Veículo ($P < 0,05$) quando comparado com demais grupos (Figura 9C). O tratamento com CORM-2 ou CoPP preveniu este efeito (Figura 9C). A análise estatística apontou diferença significativa na expressão de p-AKT ($F_{3,14} = 6,864$, $P = 0,0045$, ANOVA de uma via), e o pós teste de Newman Keuls mostrou que o grupo CFA+Veículo diferiu dos demais ($P < 0,05$), enquanto que o tratamento com CORM-2 ou CoPP preveniu este efeito (Figura 9D).

Para análise do estresse oxidativo foi realizada análise da expressão proteica da HO-1, NQO1 e NOS-2. A aplicação da ANOVA de uma via evidenciou diferença significativa na expressão de HO-1 ($F_{3,14} = 4,19$, $P = 0,0260$), mas não em NQO1 ($F_{3,17} = 0,1838$, $P = 0,9060$) (Figura 8F) ou NOS-2 ($F_{3,17} = 0,2394$, $P = 0,8676$, Figura 9G). O pós teste de Newman Keuls mostrou que no grupo CFA+Veículo ocorreu redução da expressão de HO-1 comparado com os demais grupos ($P < 0,05$), enquanto que os tratamentos com CORM-2 ou CoPP preveniram este efeito (Figura 9E).

A aplicação da ANOVA de uma via nos resultados da expressão de BDNF apontou diferença significativa ($F_{3,12} = 4,178$, $P = 0,0306$), e o pós teste de Newman Keuls revelou que o grupo CFA+Veículo apresentou redução da expressão de BDNF ($P < 0,05$) quando comparado com os demais grupos, enquanto o tratamento com CORM-2 ou CoPP normalizaram a expressão da proteína BDNF (Figura 9H). Em contrapartida não foram observadas alterações nos níveis de BAX na AMG ($F_{3,14} = 0,4799$, $P = 0,7014$, ANOVA de uma via, Figura 9I).

Figura 9: Efeitos da ativação da via HO-CO pelo tratamento com CoPP ou CORM-2 na expressão proteica de p-ERK 1/2 (A), p-JNK (B), PI3K (C), p-AKT (D), HO-1 (E), NQO1 (F), NOS2 (G), BDNF (H), e BAX (I) na amígdala de camundongos WT no 10º dia de inflamação persistente induzida pela administração de CFA ou veículo (Solução Salina, SS). * $P < 0,05$ teste de Newman-Keuls comparado com grupo SS-VEHI; + $P < 0,05$ teste de Newman-Keuls comparado com grupo CFA-VEHI. Os níveis de proteínas fosforiladas são indicados em relação aos níveis de proteínas totais correspondentes, enquanto os níveis das proteínas restantes são relativos aos níveis de GAPDH. Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM; $n = 4$ por grupo.

Expressão de p-ERK 1-2, JNK, PI3K, p-AKT, HO-1, NQO1, NOS2, BDNF e BAX no hipocampo ventral de camundongos WT com inflamação periférica

A análise estatística da expressão de p-ERK ½ e de p-JNK não apontou diferença significativa em nenhum dos grupos analisados ($F_{3,20} = 0,5132$, $P = 0,6778$ para p-ERK ½; $F_{3,14} = 0,258$, $P = 0,8544$, para p-JNK, ANOVA de uma via, Figuras 10A e B, respectivamente).

Com relação a expressão de PI3K a aplicação da ANOVA de uma via apontou diferença significativa entre os grupos ($F_{3,13} = 7,784$, $P = 0,0032$). Um pós-teste de Newman Keuls revelou aumento da expressão de PI3K no grupo CFA+Veículo comparado com o grupo controle (SS+Veículo, $P < 0,005$). Os tratamentos com CORM-2 ou CoPP não bloquearam o efeito da administração de CFA, sendo diferentes quando comparados com o grupo SS+Veículo ($P < 0,05$, Figura 10C).

A análise estatística (ANOVA de uma via) da expressão de p-AKT apontou diferença significativa ($F_{3,14} = 8,891$, $P = 0,0015$), sendo que o grupo CFA+Veículo diferiu dos demais grupos ($P < 0,05$ Newman Keuls). O tratamento com CORM-2 ou CoPP preveniu este efeito (Figura 10D).

Em relação aos níveis de proteínas oxidativas, a aplicação da ANOVA de uma via evidenciou diferença significativa entre os grupos em relação à expressão de HO-1 ($F_{3,15} = 4,321$, $P = 0,0220$). O tratamento com CFA reduziu a expressão de HO-1 nesta região ($P < 0,05$ Newman-Keuls) quando comparado com os demais grupos. Os tratamentos com CORM-2 ou CoPP normalizaram nos níveis de expressão da HO-1, e estes grupos não diferem entre si nem do grupo controle (SS-Veículo, Figura 10E). Com relação à expressão de NQO1, a ANOVA de uma via não apontou diferença significativa entre os grupos ($F_{3,17} = 1,467$, $P = 0,2588$, Figura 10F). Ao contrário, a análise da expressão de NOS-2 revelou diferença significativa entre os grupos ($F_{3,13} = 7,367$, $P = 0,0039$, ANOVA de uma via). O pós-teste de Newman-Keuls apontou aumento de sua expressão nos grupos CFA+Veículo, CFA+CORM-2 e CFA+CoPP quando comparados com grupos controle (SS+Veículo, $P < 0,05$, Figura 10G).

Com relação à expressão de BDNF no HPV não foram observadas diferenças significativas entre os diferentes grupos experimentais ($F_{3,16} = 0,5817$, $P = 0,6355$, Figura 10H). Entretanto, com relação à expressão de BAX a aplicação da ANOVA de uma via apontou diferença significativa ($F_{3,18} = 3,669$, $P = 0,0319$), sendo que no grupo CFA+Veículo observou redução ($P < 0,05$, teste de Newman-Keuls) quando comparado com os demais grupos que não diferiram entre si. O tratamento com CORM-2 ou CoPP preveniu este aumento (Figura 10I).

Figura 10: Efeitos da ativação da via HO-CO pelo tratamento com CoPP ou CORM-2 na expressão proteica de p-ERK 1/2 (A), p-JNK (B), PI3K (C), p-AKT (D), HO-1 (E), NQO1 (F), NOS2 (G), BDNF (H), e BAX (I) no hipocampo ventral (HPV) de camundongos WT no 10º dia de inflamação persistente induzida pela administração de CFA ou veículo (Solução Salina, SS). * $P < 0,05$ teste de Newman-Keuls comparado com grupo SS-VEHI; + $P < 0,05$ teste de Newman-Keuls comparado com grupo CFA-VEHI. Os níveis de proteínas fosforiladas são indicados em relação aos níveis de proteínas totais correspondentes, enquanto os níveis das proteínas restantes são relativos aos níveis de GAPDH. Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM; $n = 4$ por grupo.

Expressão de p-ERK 1-2, JNK, PI3K, p-AKT, HO-1, NQO1, NOS2, BDNF e BAX na área septal medial de camundongos WT com inflamação periférica

A análise estatística do ensaio de Western Blot dos resultados obtidos com a expressão de p-ERK ½ na SM aponta diferença significativa entre os grupos ($F_{3,15} = 3,293$, $P = 0,0498$). O pós-teste de Newman Keuls revelou redução na expressão de p-ERK ½ no grupo CFA+Veículo quando comparado com os demais grupos ($P < 0,05$, Newman Keuls, Figura 11A). Não há diferença significativa entre os grupos CFA+CORM-2, CFA+CoPP e SS+Veículo (Figura 11A). Com relação à expressão de p-JNK não foi apontada diferença estatística significativa ($F_{3,18} = 0,5055$, $P = 0,6833$, Figura 11B).

A aplicação da ANOVA de uma via para expressão de PI3K mostrou diferença significativa entre os grupos ($F_{3, 13} = 6,246$, $P = 0,0074$). Uma análise post-hoc evidenciou que no grupo CFA+Veículo há aumento na expressão de PI3K ($P < 0,05$ Newman-Keuls) quando comparado com os demais grupos. O tratamento com CORM-2 ou COPP preveniu este efeito, sendo que estes grupos não diferem entre si, nem do grupo controle (SS+Veículo, Figura 11C). Com relação a expressão de p-AKT a análise estatística apontou diferença ($F_{3, 16} = 3,515$, $P = 0,0395$, ANOVA de uma via), sendo o grupo CFA+Veículo diferente quando comparado com os demais grupos ($P < 0,05$, teste de Newman-Keuls, Figura 11D). Ainda o tratamento com CORM-2 ou CoPP reverteu este efeito sendo que estes grupos não diferem entre si, nem do grupo controle (SS+Veículo, Figura 11D).

Em relação aos níveis de proteínas oxidativas, a ANOVA de uma via não evidenciou diferença significativa tanto na expressão de HO-1 ($F_{3,16} = 0,3723$, $P = 0,7741$), NQO1 ($F_{3, 17} = 0,2975$, $P = 0,8267$), quanto de NOS-2 ($F_{3,12} = 0,4849$, $P = 0,6990$, Figuras 11E-11G) na SM.

Considerando a expressão de BDNF a análise estatística não apontou diferença ($F_{3,11} = 2,235$, $P = 0,1413$, Figura 11H). Entretanto, a aplicação da ANOVA de uma via evidenciou alteração significativa na expressão de BAX ($F_{3,14} = 6,237$, $P = 0,0065$). O grupo CFA+Veículo reduziu a expressão de BAX no 10º dia experimental quando comparado com os demais grupos ($P < 0,05$, Newman-Keuls), O tratamento com CORM-2 ou CoPP preveniu este efeito sendo que estes grupos não diferem entre si nem do grupo controle (SS+Veículo, Figura 11I).

Figura 11: Efeitos da ativação da via HO-CO pelo tratamento com CoPP ou CORM-2 na expressão proteica de p-ERK 1/2 (A), p-JNK (B), PI3K (C), p-AKT (D), HO-1 (E), NQO1 (F), NOS2 (G), BDNF (H), e BAX (I) na área septal medial de camundongos WT no 10º dia de inflamação persistente induzida pela administração de CFA ou veículo (Solução Salina, SS). * $P < 0,05$ teste de Newman-Keuls comparado com grupo SS-VEHI; + $P < 0,05$ teste de Newman-Keuls comparado com grupo CFA-VEHI. Os níveis de proteínas fosforiladas são indicados em relação aos níveis de proteínas totais correspondentes, enquanto os níveis das proteínas restantes são relativos aos níveis de GAPDH. Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM; $n = 4$ por grupo.

Discussão

Os presentes resultados mostraram que a administração de CORM-2 (doador de CO) ou CoPP (indutor de HO-1) promoveu efeitos antinociceptivos evidenciados pela redução da alodinia mecânica e da aversividade à dor (componente emocional) induzidas pela administração de CFA em animais WT. Os resultados corroboram achados anteriores que mostram efeitos antialodínicos e anti-hipernociceptivos de CORM-2 e CoPP em modelos de dor inflamatória persistente (Hervera et al; 2011; Carcolé et al., 2014). A dor inflamatória persistente induzida por CFA promoveu alterações em fatores transcricionais, inflamatórios e neurotróficos em distintas regiões encefálicas associadas ao processamento da dor e da nocicepção. Os tratamentos com CORM-2 e CoPP foram capazes de reverter a maioria desses efeitos, além de aumentar a expressão de MOR e DOR no hipocampo dorsal.

Nossos achados mostraram que o tratamento agudo (dose única) com CORM-2 (5 mg/kg) ou CoPP (2,5 mg/kg) administrado 3 horas antes dos testes nociceptivos foi reverteu a aversividade à dor inflamatória no teste PEAP. Curiosamente, enquanto na avaliação da sensibilidade mecânica (von Frey) os camundongos WT tratados com CORM-2 ou CoPP apresentaram apenas 60-70% da recuperação do efeito total no limiar de retirada da pata basal, ambos os tratamentos reverteram completamente a aversividade. Assim, os efeitos antialodínicos podem ter contribuído para o efeito quase totalmente reversível no teste PEAP, sugerindo que o efeito dessa magnitude no componente discriminativo pode ser suficiente para bloquear a aversão à dor inflamatória persistente.

Considerando os camundongos NOS2-KO, os resultados demonstram que não há alteração do componente emocional da dor, no 10o dia experimental. É possível sugerir que esse efeito pode ter ocorrido devido à resposta inflamatória atenuada que foi observada em camundongos NOS2-KO. Estes resultados estão de acordo com achados anteriores que apontam que o NO está envolvido no processo de consolidação e recuperação da memória aversiva (Lisboa et al., 2015; Ota et al., 2010). Desta forma, a redução da atividade do NO, observada nos camundongos KO-NOS2, pode ter contribuído para a ausência de alteração no comportamento emocional da dor. Além disso, no genótipo NOS2-KO observou-se maior recuperação da alodinia mecânica (58%) em comparação com a cepa WT (37%) no 10o dia experimental, o que pode ter contribuído para a redução das alterações do componente aversivo-motivacional da dor. De fato, estudo prévio também observou maior recuperação da alodinia mecânica 14 dias após a injeção de CFA em camundongos nocaute para NOS-2 comparado com camundongos selvagens (Negrete et al., 2014), sem que ocorra alteração nas fases iniciais do processo inflamatório (16 horas) (Boettger et al., 2007), o que pode confirmar a participação da NOS-2 na manutenção da dor inflamatória crônica.

Considerando o envolvimento do hipocampo dorsal na modulação da dor, nossos resultados mostraram que há modulação de receptores MOR e DOR nesta região, bem como dos níveis de expressão de HO-1 na dor inflamatória persistente em camundongos WT tratados ou não com CORM-2 ou CoPP. Estudo neurofuncional mostrou que esta região encefálica envia e recebe projeções para a área do septo medial através do fórnice dorsal, das fímbrias supracalosas, bem como por meio de uma via ventral para a amígdala, e sua relação neuroanatômica e funcional está associada à nocicepção e modulação de aversão à dor (Ang et al., 2017). É interessante notar que a nocicepção induzida pela administração de formalina na pata posterior de ratos, na fase tardia, pode inibir neurônios excitatórios na região CA1 do hipocampo dorsal. Ainda, a lesão eletrolítica na região septal poderia prevenir esse efeito, evidenciando envolvimento hierárquico do hipocampo no processamento da aversividade à dor (Khanna, 1997). Além disso, o tratamento com morfina também pode reduzir essa supressão de células piramidais CA1 induzidas pela fase tardia da formalina, atuando na via septo-hipocampal (Khanna e Zheng, 1999). É importante destacar que hipocampo tem participação fundamental no processamento da dor persistente, uma vez que situações de dor prolongada podem induzir neurodegeneração, redução da expressão e fosforilação da quinase regulada por sinal extracelular e redução da plasticidade neuronal de curto prazo das células do hipocampo (Mutso et al., 2012). Dessa forma, é possível sugerir que os efeitos observados neste estudo também possam estar relacionados à modulação da dor pela via septo-hipocampal.

O CO periféricamente exerce efeitos modulatórios sobre a expressão de receptores opioides (Carcolé et al., 2014) e interage com a via NOS-NO-cGMP (Negrete et al., 2014). Entretanto, a interação entre este neuromodulador gasoso e receptores opioides em regiões do sistema nervoso central ainda é pouco investigada. Considerando o ensaio de Western Blot, nossos dados mostraram aumento significativo na expressão da enzima HO-1 no hipocampo dorsal contralateral 3 h após a administração sistêmica de CORM-2 e CoPP, bem como aumento da expressão de MOR e DOR. No entanto, não ocorreram alterações significativas na expressão das enzimas NOS-1 ou NOS-2 na mesma região. Alguns estudos utilizando o modelo de inflamação periférica persistente (administração de CFA intra-plantar) mostraram aumento na expressão periférica (gânglio da raiz dorsal) da enzima NOS-1 (Negrete et al., 2011; Negrete et al., 2014), enquanto outros demonstraram falta de alterações na expressão de NOS-2 na medula espinhal (Polo et al., 2019), bem como em camundongos com dor neuropática e tratados ou não com CoPP ou CORM-2 (Godai e Kanmura, 2018). Nossos achados corroboram estes estudos sugerindo que a modulação de receptores opioides através

da ação da ativação da via HO-CO independe da alteração da expressão das enzimas NOS-1 ou NOS-2. Ainda, é possível sugerir que a inibição da aversão à dor observada em camundongos NOS2-KO possa estar relacionada à inibição nociceptiva periférica, melhor do que a alteração nos mecanismos centrais envolvidos na aversão. Da mesma forma, a análise de Western Blot para a cepa NOS2-KO não mostrou alterações na expressão de HO-1, NOS1, MOR e DOR no hipocampo. Assim, a inibição do componente aversivo da dor observada em camundongos WT pode estar relacionada com as alterações na expressão de MOR e DOR no hipocampo, e não com a ativação da via de NOS-NO, uma vez que não foram observadas alterações na expressão de NOS-1 e NOS-2 na cepa WT ou na expressão hipocampal de MOR e DOR em camundongos NOS2-KO. Esses resultados corroboram achados prévios que mostraram expressão periférica aumentada de MOR e DOR induzida por CoPP durante a inflamação periférica (Carcolé et al., 2014), e acrescenta que a indução de HO-1 e a liberação de CO também podem elevar a expressão destes receptores opioides no hipocampo dorsal.

Embora o hipocampo tenha apenas expressão moderada de receptores opioides em comparação com outras regiões encefálicas (Mansour et al., 1995), a formação hipocampal tem intensa expressão de MOR e DOR em interneurônios GABAérgicos (Stumm et al., 2004), sugerindo que esses receptores controlam a excitabilidade de neurônios principais inibindo interneurônios. Desse modo, o fentanil, um agonista opioide, pode diminuir a transmissão sináptica mediada por GABA de interneurônios da região CA1 (Kouvaras et al., 2008); enquanto que a encefalina e a β -endorfina, assim como a morfina, promovem diminuição nos níveis de acetilcolina (ACh) no hipocampo quando microinjetados na região septal, mas não alteram a analgesia no modelo analgésico fásico de movimento da cauda (Moroni et al., 1977). No entanto, quando os agonistas opioides são aplicados diretamente no hipocampo, os níveis de ACh permanecem inalterados (Botticelli e Wurtman, 1981). Esses resultados sugerem que os agonistas opioides podem atuar no nível dos corpos celulares colinérgicos na região septal, modulando a atividade colinérgica septal que se projeta para o hipocampo, o que pode não ser observado efeito modulatório na dor fásica, mas pode estar envolvido no processamento de aversividade à dor. Ainda, pode ser possível que a expressão de receptores opioides induzida pela HO-1 ou pelo CO promova modulação da aversividade à dor, indiretamente, via inibição do componente colinérgico na região septal, ou diretamente pela neurotransmissão GABAérgica no hipocampo. Essa hipótese é fundamentada em estudo anterior, o qual evidenciou que a administração de morfina, agonista opioide, assim como do antagonista GABAérgico, bicuculina, promoveram efeitos antinociceptivos no hipocampo dorsal de cobaias (Favaroni Mendes e Menescal-de-Oliveira, 2008).

Com relação ao protocolo 2, onde se realizou o tratamento crônico por 7 dias com CORM-2 e CoPP, além do efeito anti-alodínico e anti-hiperalgésico, ocorreu bloqueio das alterações na expressão de HO-1 na SCP e na amígdala induzida pela administração de CFA. Ainda, o CoPP promoveu elevação da expressão de HO-1 no hipocampo ventral, mas nenhuma alteração na expressão de HO-1 foi observada na área septal. Em apoio a estes resultados, estudo prévio mostrou que a ativação de HO-1 no locus coeruleus pode estar envolvido na modulação da dor inflamatória (Moreno et al., 2019). Embora, os efeitos de ausência de CORM-2 e CoPP sobre a expressão de HO-1 na área septal e da expressão de NQO1 na maioria das áreas avaliadas, com exceção da amígdala, é possível sugerir que a HO-1, pelo menos em seu papel antioxidante, pode estar ocorrendo na SCP e na amígdala assim como no locus coeruleus (Moreno et al., 2019). Além disso, a inflamação periférica induzida por CFA aumentou a expressão de NOS-2 apenas no hipocampo ventral, enquanto que os tratamentos com CORM-2 ou CoPP não alteraram este efeito.

Considerando a expressão de p-ERK $\frac{1}{2}$, nossos resultados mostraram que os tratamentos com CORM-2 ou CoPP preveniram a redução induzida pelo CFA na SCP, na amígdala e na área septal, mas não no hipocampo ventral. De fato, em modelo de dor crônica, há alterações hipocampais associadas à regulação negativa de MAPK e ERK $\frac{1}{2}$ no hipocampo dorsal e ventral (Mutso et al., 2017), as quais podem estar relacionadas a redução na potencialização de curto prazo, ao comprometimento sináptico e alterações comportamentais (Giachello et al., 2010). Os dados obtidos neste trabalho mostraram um aumento da expressão de BAX na região do HPV e SM, enquanto na região da amígdala houve uma redução de BDNF sugerindo um possível comprometimento sináptico e no processamento de aversividade à dor regiões nestas regiões (McCarberg e Peppin, 2019). CORM-2 e CoPP foram capazes de reduzir esses efeitos em todas as quatro áreas, sugerindo um potencial neuroprotetor de ativação da via HO.

Nossos resultados mostraram que nenhuma alteração foi observada na fosforilação de JNK em qualquer uma das regiões encefálicas analisadas. Apesar de evidências anteriores mostrarem efeito anti-alodínico da inibição de p-JNK em dor neuropática (Zhuang et al., 2006) e inflamatória (Polo et al., 2019), a ausência de aumento da regulação de p-JNK em regiões encefálicas de animais tratados com CFA pode sugerir que essa proteína não está envolvida na modulação da dor inflamatória pelo menos nas áreas encefálicas avaliadas. Por outro lado, considerando a fosforilação de PI3K e AKT, nossos resultados mostraram alterações em todas as regiões encefálicas neste estudo. Curiosamente, os camundongos tratados com CFA apresentaram redução da expressão de PI3K na SCP e na amígdala, porém

aumento na expressão na região do hipocampo ventral e da área septal. Neste caso, o tratamento com CORM-2 e CoPP apenas reverteu os efeitos de CFA sobre a expressão de PI3K na SCP e na amígdala, mas não no hipocampo ventral ou na área septal. Destaca-se que a redução na expressão de PI3K na SCP e na amígdala está em desacordo com a expressão elevada de p-AKT e níveis reduzidos de p-ERK, uma vez que PI3K conhecidamente pode ativar ambas as proteínas transcricionais (Chen et al., 2017). Este resultado, pode sugerir que pelo menos na SCP e na amígdala, e PI3K pode ter outras funções na modulação da dor inflamatória. Além disso, CORM-2 e CoPP foram capazes de reduzir os efeitos de CFA em expressões de p-ERK 1/2 e p-AKT, mas não PI3K, sugerindo envolvimento da via HO-CO em ambos os mecanismos p-ERK e p-AKT. Ainda, o aumento de p-AKT no hipocampo ventral e na área septal foi acompanhado por expressões elevadas de PI3K, corroborando com estudos anteriores que apontaram aumento de ambas (PI3K/p-AKT) no modelo de osteoartrite de dor inflamatória (Batallé et al., 2019).

É importante destacar que a redução da expressão de BDNF foi documentada previamente em condições de dor inflamatória crônica (Duric e McCarson, 2005; Duric e McCarson 2007), sendo que este efeito possa estar relacionado com a diminuição da expressão de p-ERK (Mutso et al., 2012), efeito este semelhante no presente estudo observado na SCP. Ressalta-se que o tratamento com CORM-2 ou CoPP foram capazes de normalizar os níveis de BDNF na amígdala, bem como de aumentar a expressão de BDNF na SCP. Em adição, a expressão elevada de BAX também está relacionada à dor crônica (Fan et al., 2018) e associada à morte celular. Em nosso trabalho, nas regiões do hipocampo ventral e da área septal observou-se aumento da expressão de BAX. Os tratamentos com CORM-2 e CoPP reduziram o efeito do CFA tanto na regulação negativa de BDNF em PAG quanto na regulação positiva de BAX em HYPV e SM. Este resultado sugere um possível efeito neuroprotetor de CORM-2 e CoPP em quadro de dor inflamatória persistente.

Em resumo, os presentes resultados demonstraram que a ativação da via HO-1-CO promove efeitos anti-alodínicos e anti-hiperalgésicos, além de reduzir a aversão à dor inflamatória. Esses efeitos são mediados, pelo menos em parte, pelo aumento da expressão de MOR e DOR no hipocampo dorsal e sua ativação, conforme demonstrado pelo aumento da expressão da enzima HO-1, bem como MOR e DOR nas áreas hipocâmpais contralaterais de animais WT, e pela reversão dos efeitos anti-alodínicos e anti-aversivos de HO-1 induzidos por naloxone. Outros mecanismos possíveis estão relacionados à ativação de fatores de transcrição como p-AKT e redução de p-ERK em regiões relacionadas à aversividade à dor e que podem estar relacionados ao aumento da expressão de receptores opioides e proliferação celular nessas

regiões. Além disso, parece que a via da NOS não está envolvida diretamente na modulação dos efeitos de CORM-2 e CoPP sobre a aversividade dolorosa em regiões associadas ao seu processamento, estando sua interação com o gás CO mais restrita à regiões espinais e periféricas. Uma figura ilustrativa mostra as possíveis interações entre essas vias, além de propor um possível papel da via GCs-GMPc-PKG sobre as alterações promovidas pela via do CO (Figura 12).

Conclusões

Sumarizando os resultados encontrados podem ser destacadas as seguintes conclusões:

- A ativação da via HO-CO por meio da administração aguda de CORM-2 ou CoPP reduziu a nocicepção e a aversividade à dor inflamatória persistente em camundongos WT.

- Em camundongos NOS2-KO a ativação da via HO-CO promoveu efeito anti-alodínico, avaliado pelo teste de von Frey. Entretanto, em camundongos NOS2-KO não se observou a aversão à dor inflamatória persistente, avaliado pelo teste PEAP.

- O bloqueio inespecífico de receptores opioides pela administração de naloxone preveniu os efeitos tanto de CORM-2 quanto de CoPP em camundongos WT, sugerindo que há envolvimento de receptores opioides para o desencadeamento dos efeitos da ativação da via HO-CO.

- A análise por ensaio de Western Blot mostrou aumento da expressão de HO-1, MOR e DOR no hipocampo dorsal em animais WT com inflamação persistente, mas não em animais NOS2-KO. Esses dados permitiram sugerir que CORM-2 e CoPP podem reduzir a aversividade à dor, além da alodinia mecânica, em modelo de dor inflamatória e que esse efeito pode estar atrelado, ao menos em parte, à ativação de receptores opioides do tipo μ e δ .

- O tratamento crônico (7 dias) com CORM-2 ou CoPP em camundongos WT promoveu efeitos anti-alodínico (teste de von Frey) e anti-hiperalgésico ao calor (teste plantar), bem como foram observadas alterações em fatores de transcrição, antioxidantes e neurotróficos em regiões encefálicas associadas à modulação da aversividade à dor. Estas alterações podem ser responsáveis pela modulação da dor induzida pela ativação da via HO-CO, sugerindo efeito anti-inflamatório e anti-oxidativo da ativação desta via.

Figura 12. Figura ilustrativa das possíveis interações entre as vias estudadas com a neurotransmissão opioide e o papel neuroprotetor e antioxidante do sistema do HO-1-CO em regiões encefálicas associadas à modulação da aversividade dolorosa em modelo de dor inflamatória persistente. Apesar de animais NOS2-KO não apresentarem aversividade dolorosa, não houve qualquer alteração nas expressões de NOS1 ou NOS2 a partir dos tratamentos com CORM-2 ou CoPP. O gás monóxido de carbono possui interações com as MAPK, Nrf2, ativação de receptores opioides além da sua já conhecida ativação das vias da cicloxigenase e GCs-GMPcPKG (linhas cheias). A dor inflamatória persistente alterou expressões de BDNF na amígdala e SCP, BAX no HPV e SM, ERK na amígdala, SCP e SM e da via PI3K-Akt em todas as áreas estudadas. Os tratamentos com CORM-2 e CoPP foi capaz de reduzir parte desses efeitos, além da redução da aversividade dolorosa, alodínia mecânica e hiperalgesia térmica, através de seus efeitos antioxidantes, neuroprotetores e analgésicos (opioide) possivelmente pela ativação das vias GMPc-PKG (linhas tracejadas). Abreviações: NOS – Óxido nítrico sintase; NO – óxido nítrico; HO-1 – Heme oxigenase 1; MOR – receptor Mu opioide. DOR – receptor delta opioide; MAPK – Proteína cinase ativada por mitógeno; Nrf2 – O fator nuclear 2 relacionado ao eritróide 2; COX – Cicloxigenase; GCs – Guanilase ciclase solúvel; GMPc – Monofosfato cíclico de guanosina; PKG – Proteína cinase dependente de GMPc; BDNF – Fator neurotrófico derivado do cérebro; BAX – Proteína X associada a Bcl-2; ERK – Cinase regulada por sinal extracelular; Akt – Proteína cinase B ; PI3K - Fosfoinosítídeo 3-quinase; SCP – Substância cinzenta periaquedutal; HPV – Hipocampo ventral; SM – Área septal medial. Imagem adaptada de Mancuso et al., 2010.

Referências Bibliográficas

Alonso, M., Medina, J. H., & Pozzo-Miller, L. (2004). ERK1/2 activation is necessary for BDNF to increase dendritic spine density in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Learning & memory*, 11(2), 172-178.

Amin, B., Abnous, K., Motamedshariaty, V., & Hosseinzadeh, H. (2014). Attenuation of oxidative stress, inflammation and apoptosis by ethanolic and aqueous extracts of *Crocus sativus* L. stigma after chronic constriction injury of rats. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 86(4), 1821-1832.

Ang, S.T., Ariffin, M.Z., Khanna, S., 2017. The forebrain medial septal region and nociception. *Neurobiol Learn Mem.* 138, 238-251.

Baldi, E., & Bucherelli, C. (2015). Brain sites involved in fear memory reconsolidation and extinction of rodents. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 53, 160-190.

Barañano, D.E., Snyder, S.H., 2001. Neural roles for heme oxygenase: contrasts to nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98, 10996-1002.

Barrot, M. (2012). Tests and models of nociception and pain in rodents. *Neuroscience*, 211, 39-50.

Basbaum, A. I., & Fields, H. L. (1984). Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. *Annual review of neuroscience*, 7(1), 309-338.

Basbaum, A. I., Bautista, D. M., Scherrer, G., & Julius, D. (2009). Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*, 139(2), 267-284.

Batallé, G., Cabarga, L., & Pol, O. (2020). The inhibitory effects of slow-releasing hydrogen sulfide donors in the mechanical allodynia, grip strength deficits, and depressive-like behaviors associated with chronic osteoarthritis pain. *Antioxidants*, 9(1), 31.

Beltran-Campos, V., Silva-Vera, M., Garcia-Campos, M. L., & Diaz-Cintra, S. (2015). Effects of morphine on brain plasticity. *Neurología (English Edition)*, 30(3), 176-180.

Bird, G. C., Lash, L. L., Han, J. S., Zou, X., Willis, W. D., & Neugebauer, V. (2005). Protein kinase A-dependent enhanced NMDA receptor function in pain-related synaptic plasticity in rat amygdala neurones. *The Journal of physiology*, 564(3), 907-921.

Boettger, M.K., Uceyler, N., Zelenka, M., Schmitt, A., Reif, A., Chen, Y., Sommer, C., 2007. Differences in inflammatory pain in nNOS-, iNOS- and eNOS-deficient mice. *Eur J Pain*. 11, 810-8.

Botticelli, L.J., Wurtman, R.J., 1981. Corticotropin regulates transsynaptically the activity of septo-hippocampal cholinergic neurones. *Nature*. 289, 75-6.

Bourin, M., & Hascoët, M. (2003). The mouse light/dark box test. *European journal of pharmacology*, 463(1), 55-65.

Bourne, S., Machado, A. G., & Nagel, S. J. (2014). Basic anatomy and physiology of pain pathways. *Neurosurgery Clinics*, 25(4), 629-638.

Brandão, M. L. (2005). As bases biológicas do comportamento: introdução à neurociência.

Cappoli, N., Tabolacci, E., Aceto, P., & Russo, C. D. (2020). The emerging role of the BDNF-TrkB signaling pathway in the modulation of pain perception. *Journal of neuroimmunology*, 577406.

Carcolé, M., Castany, S., Leánez, S., Pol, O., 2014. Treatment with a heme oxygenase 1 inducer enhances the antinociceptive effects of μ -opioid, δ -opioid, and cannabinoid 2 receptors during inflammatory pain. *J Pharmacol Exp Ther*. 351, 224-32.

Carvalho, P.G., Branco, L.G.S., Leite-Panissi, C.R.A., 2011. Involvement of the heme oxygenase-carbon monoxide-cGMP pathway in the nociception induced by acute painful stimulus in rats. *Brain Research*. 1385, 107-113.

Carvalho-Costa, P.G., Branco, L.G.S., Leite-Panissi, C.R.A., 2016. Activation of locus coeruleus heme oxygenase-carbon monoxide pathway promoted an anxiolytic-like effect in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 49.

Castany, S., Carcolé, M., Leánez, S., Pol, O., 2016. The induction of heme oxygenase 1 decreases painful diabetic neuropathy and enhances the antinociceptive effects of morphine in diabetic mice. *PLoS One*. 11, e0146427.

Cazuza, R.A., Pol, O., Leite-Panissi, C.R.A., 2018. Enhanced expression of heme oxygenase-1 in the locus coeruleus can be associated with anxiolytic-like effects. *Behavioural Brain Research*. 336, 204-210.

Chen, S. P., Zhou, Y. Q., Liu, D. Q., Zhang, W., Manyande, A., Guan, X. H., ... & Mohamed Omar, D. (2017). PI3K/Akt pathway: a potential therapeutic target for chronic pain. *Current pharmaceutical design*, 23(12), 1860-1868.

Cobos, E., & Portillo-Salido, E. (2013). "Bedside-to-Bench" Behavioral Outcomes in Animal Models of Pain: Beyond the Evaluation of Reflexes. *Current neuropharmacology*, 11(6), 560-591.

Corasaniti MT, Amantea D, Russo R, Bagetta G (2006) The crucial role of neuronal plasticity in pain and cell death. *Cell Death Differ*, 13:534–536.

Cury, Y., Picolo, G., Gutierrez, V. P., & Ferreira, S. H. (2011). Pain and analgesia: the dual effect of nitric oxide in the nociceptive system. *Nitric oxide*, 25(3), 243-254.

De Felice, M., & Ossipov, M. H. (2016). Cortical and subcortical modulation of pain. *Pain management*, 6(2), 111-120.

De Vente, J., Asan, E., Gambaryan, S., Markerink-van Ittersum, M., Axer, H., Gallatz, K., ... & Palkovits, M. (2001). Localization of cGMP-dependent protein kinase type II in rat brain. *Neuroscience*, 108(1), 27-49.

Drake, C.T., Milner, T.A., 2002. Mu opioid receptors are in discrete hippocampal interneuron subpopulations. *Hippocampus*. 12, 119-36.

Duric, V., & McCarson, K. E. (2005). Hippocampal neurokinin-1 receptor and brain-derived neurotrophic factor gene expression is decreased in rat models of pain and stress. *Neuroscience*, 133(4), 999-1006.

Duric, V., & McCarson, K. E. (2007). Neurokinin-1 (NK-1) receptor and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene expression is differentially modulated in the rat spinal dorsal horn and hippocampus during inflammatory pain. *Molecular pain*, 3, 1744-8069.

El-Husseini, A. D., Williams, J., Reiner, P. B., Pelech, S., & Vincent, S. R. (1999). Localization of the cGMP-dependent protein kinases in relation to nitric oxide synthase in the brain. *Journal of chemical neuroanatomy*, 17(1), 45-55.

Endoh, M., Maiese, K., & Wagner, J. (1994). Expression of the inducible form of nitric oxide synthase by reactive astrocytes after transient global ischemia. *Brain research*, 651(1-2), 92-100.

Fan, Y. F., Guan, S. Y., Luo, L., Li, Y. J., Yang, L., Zhou, X. X., ... & Liu, G. (2018). Tetrahydroxystilbene glucoside relieves the chronic inflammatory pain by inhibiting

- neuronal apoptosis, microglia activation, and GluN2B overexpression in anterior cingulate cortex. *Molecular pain*, 14, 1744806918814367.
- Fanselow, M. S., & Dong, H. W. (2010). Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures?. *Neuron*, 65(1), 7-19.
- Favaroni Mendes, L.A., Menescal-de-Oliveira, L., 2008. Role of cholinergic, opioidergic and GABAergic neurotransmission of the dorsal hippocampus in the modulation of nociception in guinea pigs. *Life Sci*. 83, 644-50.
- Feil, S., Zimmermann, P., Knorn, A., Brummer, S., Schlossmann, J., Hofmann, F., & Feil, R. (2005). Distribution of cGMP-dependent protein kinase type I and its isoforms in the mouse brain and retina. *Neuroscience*, 135(3), 863-868.
- Gebhart, G. F., & Bielefeldt, K. (2011). Physiology of visceral pain. *Comprehensive Physiology*, 6(4), 1609-1633.
- Giachello, C. N. G., Fiumara, F., Giacomini, C., Corradi, A., Milanese, C., Ghirardi, M., ... & Montarolo, P. G. (2010). MAPK/Erk-dependent phosphorylation of synapsin mediates formation of functional synapses and short-term homosynaptic plasticity. *Journal of cell science*, 123(6), 881-893.
- Giese, K. P., & Mizuno, K. (2013). The roles of protein kinases in learning and memory. *Learning & memory*, 20(10), 540-552.
- Godai, K., Kanmura, Y., 2018. Heme oxygenase-1 inducer and carbon monoxide-releasing molecule enhance the effects of gabapentinoids by modulating glial activation during neuropathic pain in mice. *Pain Rep*. 3, e677.
- Goosens, K.A., 2011. Hippocampal regulation of aversive memories. *Curr Opin Neurobiol*. 21, 460-6.
- Gou, G., Leanez, S., Pol, O., 2014. The role of gaseous neurotransmitters in the antinociceptive effects of morphine during acute thermal pain. *Eur J Pharmacol*. 737, 41-6.
- Gozzelino, R., Jeney, V., & Soares, M. P. (2010). Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 50, 323-354.
- Gray, J. A., & McNaughton, N. (1982). The neurophysiology of anxiety.

Gregory, N. S., Harris, A. L., Robinson, C. R., Dougherty, P. M., Fuchs, P. N., & Sluka, K. A. (2013). An overview of animal models of pain: disease models and outcome measures. *The Journal of Pain*, 14(11), 1255-1269.

Hanani, M. (2015). Role of satellite glial cells in gastrointestinal pain. *Frontiers in cellular neuroscience*, 9, 412.

Harte-Hargrove, L. C., Varga-Wesson, A., Duffy, A. M., Milner, T. A., & Scharfman, H. E. (2015). Opioid receptor-dependent sex differences in synaptic plasticity in the hippocampal mossy fiber pathway of the adult rat. *The Journal of Neuroscience*, 35(4), 1723-1738.

Helmstetter, F. J., Tershner, S. A., Poore, L. H., & Bellgowan, P. S. (1998). Antinociception following opioid stimulation of the basolateral amygdala is expressed through the periaqueductal gray and rostral ventromedial medulla. *Brain research*, 779(1-2), 104-118.

Hervera, A., Leáñez, S., Negrete, R., Pol, O., 2009. The peripheral administration of a nitric oxide donor potentiates the local antinociceptive effects of a DOR agonist during chronic inflammatory pain in mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 380, 345-52.

Hervera, A., Gou, G., Leáñez, S., Pol, O., 2013. Effects of treatment with a carbon monoxide-releasing molecule and a heme oxygenase 1 inducer in the antinociceptive effects of morphine in different models of acute and chronic pain in mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 228, 463-77.

Jalalvand, E., Javan, M., Haeri-Rohani, A., & Ahmadiani, A. (2008). Stress-and non-stress-mediated mechanisms are involved in pain-induced apoptosis in hippocampus and dorsal lumbar spinal cord in rats. *Neuroscience*, 157(2), 446-452.

Jessel, T. M., & Basbaum, A. I. (2000). *The Bodily Senses. Principles of Neural Science* Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, eds. McGraw-Hill, New York, 430-450.

Ji, R.R., Gereau, R.W. 4th, Malcangio, M., Strichartz, G.R. (2009). MAP kinase and pain, *Brain Res. Rev.* 60 135–148

Jurga, A.M., Piotrowska, A., Starnowska, J., Rojewska, E., Makuch, W., Mika, J., 2016. Treatment with a carbon monoxide-releasing molecule (CORM-2) inhibits neuropathic pain and enhances opioid effectiveness in rats. *Pharmacol Rep.* 68, 206-13.

Kangas, B. D., & Bergman, J. (2014). Operant nociception in nonhuman primates. *PAIN®*, 155(9), 1821-1828.

Khanna, S., 1997. Dorsal hippocampus field CA1 pyramidal cell responses to a persistent versus an acute nociceptive stimulus and their septal modulation. *Neuroscience*. 77, 713-21.

Khanna, S., Zheng, F., 1999. Morphine reversed formalin-induced CA1 pyramidal cell suppression via an effect on septohippocampal neural processing. *Neuroscience*. 89, 61-71.

Kim, K. H., Kim, J. I., Han, J. A., Choe, M. A., & Ahn, J. H. (2011). Upregulation of neuronal nitric oxide synthase in the periphery promotes pain hypersensitivity after peripheral nerve injury. *Neuroscience*, 190, 367-378.

Kim, H.K. , Park, S.K., Zhou, J.L., Taglialatela, G., Chung, K. Coggeshall, R.E., (2004) Reactive oxygen species (ROS) play an important role in a rat model of neuropathic pain. *Pain* (111) 116–124.

Komatsu, T. (2015). Study of Supplementary Analgesics Capable of Reducing the Dosage of Morphine. *Yakugaku zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, 136(2), 329-335.

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

LaBuda, C.J., Fuchs, P.N., 2000a. A behavioral test paradigm to measure the aversive quality of inflammatory and neuropathic pain in rats. *Exp Neurol*. 163, 490-4.

LaBuda, C.J., Fuchs, P.N., 2000b. Morphine and gabapentin decrease mechanical hyperalgesia and escape/avoidance behavior in a rat model of neuropathic pain. *Neurosci Lett*. 290, 137-40.

Leite-Almeida, H., Pinto-Ribeiro, F., & Almeida, A. (2015). Animal models for the study of comorbid pain and psychiatric disorders. In *Pain in Psychiatric Disorders* (Vol. 30, pp. 1-21). Karger Publishers.

Levitt, D.G., Levitt, M.D., 2015. Carbon monoxide: a critical quantitative analysis and review of the extent and limitations of its second messenger function. *Clin Pharmacol*. 7, 37-56.

Leáñez, S., Hervera, A., Pol, O., 2009. Peripheral antinociceptive effects of mu- and delta-opioid receptor agonists in NOS2 and NOS1 knockout mice during chronic inflammatory pain. *Eur J Pharmacol.* 602, 41-9.

Lisboa, S.F., Gomes, F.V., Silva, A.L., Uliana, D.L., Camargo, L.H., Guimarães, F.S., Cunha, F.Q., Joca, S.R., Resstel, L.B., 2015. Increased contextual fear conditioning in iNOS knockout mice: additional evidence for the involvement of nitric oxide in stress-related disorders and contribution of the endocannabinoid system. *Int J Neuropsychopharmacol.* 18.

Loureiro, M., Renard, J., Zunder, J., & Laviolette, S. R. (2015). Hippocampal cannabinoid transmission modulates dopamine neuron activity: impact on rewarding memory formation and social interaction. *Neuropsychopharmacology*, 40(6), 1436-1447.

Ma, L., Yue, L., Zhang, Y., Wang, Y., Han, B., Cui, S., ... & Yi, M. (2019). Spontaneous pain disrupts ventral hippocampal CA1-infralimbic cortex connectivity and modulates pain progression in rats with peripheral inflammation. *Cell reports*, 29(6), 1579-1593.

Maines, M. D., 1993. Carbon monoxide: an emerging regulator of cGMP in the brain. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 4(5), 389-397.

Maines, M.D., 1997. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 37, 517-54.

Mancuso, C., Navarra, P., Preziosi, P., 2010. Roles of nitric oxide, carbon monoxide, and hydrogen sulfide in the regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *J Neurochem.* 113, 563-75.

Mansour, A., Fox, C.A., Akil, H., Watson, S.J., 1995. Opioid-receptor mRNA expression in the rat CNS: anatomical and functional implications. *Trends Neurosci.* 18, 22-9.

Martins, I., Carvalho, P., de Vries, M. G., Teixeira-Pinto, A., Wilson, S. P., Westerink, B. H., & Tavares, I. (2015). Increased noradrenergic neurotransmission to a pain facilitatory area of the brain is implicated in facilitation of chronic pain. *Anesthesiology: The Journal of the American Society of Anesthesiologists*, 123(3), 642-653.

McCarberg, B., & Peppin, J. (2019). Pain Pathways and nervous system plasticity: learning and memory in pain. *Pain Medicine*, 20(12), 2421-2437.

McDonnell, C., Leáñez, S., & Pol, O. (2017). The induction of the transcription factor Nrf2 enhances the antinociceptive effects of delta-opioid receptors in diabetic mice. *PLoS One*, 12(7), e0180998.

McKenna, J.E., Melzack, R., 1992. Analgesia produced by lidocaine microinjection into the dentate gyrus. *Pain*. 49, 105-12.

McKenna, J.E., Melzack, R., 2001. Blocking NMDA receptors in the hippocampal dentate gyrus with AP5 produces analgesia in the formalin pain test. *Exp Neurol*. 172, 92-9.

Melzack, R. (2001). Pain and the neuromatrix in the brain. *Journal of dental education*, 65(12), 1378-1382.

Melzack, R., & Wall, P. D. (1965). Pain mechanisms: a new theory. *Science*, 150(3699), 971-979.

Millan, M. J. (2002). Descending control of pain. *Progress in neurobiology*, 66(6), 355-474.

Moroni, F., Cheney, D.L., Costa, E., 1977. Inhibition of acetylcholine turnover in rat hippocampus by intraseptal injections of beta-endorphin and morphine. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 299, 149-53.

Morton, D. L., Sandhu, J. S., & Jones, A. K. (2016). Brain imaging of pain: state of the art. *Journal of pain research*, 9, 613.

Mountcastle, V. B. (1980). *Medical physiology*, Vol. 1, 718/741, The CV Mosby Company, St.

Murad, F. (2006). Nitric oxide and cyclic GMP in cell signaling and drug development. *New England Journal of Medicine*, 355(19), 2003-2011.

Mutso, A.A., Radzicki, D., Baliki, M.N., Huang, L., Banisadr, G., Centeno, M.V., Radulovic, J., Martina, M., Miller, R.J., Apkarian, A.V., 2012. Abnormalities in hippocampal functioning with persistent pain. *J Neurosci*. 32, 5747-56.

Nagode, D. A., Tang, A. H., Yang, K., & Alger, B. E. (2014). Optogenetic identification of an intrinsic cholinergically driven inhibitory oscillator sensitive to cannabinoids and opioids in hippocampal CA1. *The Journal of physiology*, 592(1), 103-123.

Nascimento, C.G., Branco, L.G., 2007. Role of the peripheral heme oxygenase-carbon monoxide pathway on the nociceptive response of rats to the formalin test: evidence for a cGMP signaling pathway. *Eur J Pharmacol.* 556, 55-61.

Negrete, R., Hervera, A., Leáñez, S., Martín-Campos, J.M., Pol, O., 2011. The antinociceptive effects of JWH-015 in chronic inflammatory pain are produced by nitric oxide-cGMP-PKG-KATP pathway activation mediated by opioids. *PLoS One.* 6, e26688.

Negrete, R., Hervera, A., Leanez, S., Pol, O., 2014. Treatment with a carbon monoxide-releasing molecule inhibits chronic inflammatory pain in mice: nitric oxide contribution. *Psychopharmacology (Berl).* 231, 853-61.

Nishio, N., Taniguchi, W., Sugimura, Y.K., Takiguchi, N., Yamanaka, M., Kiyoyuki, Y. (2013). Reactive oxygen species enhance excitatory synaptic transmission in rat spinal dorsal horn neurons by activating TRPA1 and TRPV1 channels, *Neuroscience* (247) 201–212.

Ota, K.T., Monsey, M.S., Wu, M.S., Schafe, G.E., 2010. Synaptic plasticity and NO-cGMP-PKG signaling regulate pre- and postsynaptic alterations at rat lateral amygdala synapses following fear conditioning. *PLoS One.* 5, e11236.

Pae, H.O., Kim, E.C., Chung, H.T. (2008). Integrative survival response evoked by heme oxygenase-1 and heme metabolites, *J. Clin. Biochem. Nutr.* (42) 197–203.

Paxinos, G., & Franklin, K. B. (2004). *The mouse brain in stereotaxic coordinates.* Gulf Professional Publishing.

Pezet, S., Marchand, F., D'Mello, R., Grist, J., Clark, A. K., Malcangio, M., ... & McMahon, S. B. (2008). Phosphatidylinositol 3-kinase is a key mediator of central sensitization in painful inflammatory conditions. *Journal of Neuroscience*, 28(16), 4261-4270.

Ploghaus, A., Narain, C., Beckmann, C.F., Clare, S., Bantick, S., Wise, R., Matthews, P.M., Rawlins, J.N., Tracey, I., 2001. Exacerbation of pain by anxiety is associated with activity in a hippocampal network. *J Neurosci.* 21, 9896-903.

Pol, O. (2007). The involvement of the nitric oxide in the effects and expression of opioid receptors during peripheral inflammation. *Current medicinal chemistry*, 14(18), 1945-1955.

Polo, S., Díaz, A.F., Gallardo, N., Leáñez, S., Balboni, G., Pol, O., 2019. Treatment with the delta opioid agonist UFP-512 alleviates chronic inflammatory and neuropathic pain: mechanisms implicated. *Front Pharmacol.* 10, 283.

Prado, W.A., Roberts, M.H., 1985. An assessment of the antinociceptive and aversive effects of stimulating identified sites in the rat brain. *Brain Res.* 340, 219-28.

Price, D. D. (2000). Psychological and neural mechanisms of the affective dimension of pain. *Science*, 288(5472), 1769-1772.

Raja, S. N., Carr, D. B., Cohen, M., Finnerup, N. B., Flor, H., Gibson, S., ... & Song, X. J. (2020). The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. *Pain*, 161(9), 1976-1982.

Ramos, A., Pereira, E., Martins, G. C., Wehrmeister, T. D., & Izídio, G. S. (2008). Integrating the open field, elevated plus maze and light/dark box to assess different types of emotional behaviors in one single trial. *Behavioural brain research*, 193(2), 277-288.

Rezaï, X., Faget, L., Bednarek, E., Schwab, Y., Kieffer, B. L., & Massotte, D. (2012). Mouse delta opioid receptors are located on presynaptic afferents to hippocampal pyramidal cells. *Cellular and molecular neurobiology*, 32(4), 509-516.

Riego, G., Redondo, A., Leáñez, S., & Pol, O. (2018). Mechanism implicated in the anti-allodynic and anti-hyperalgesic effects induced by the activation of heme oxygenase 1/carbon monoxide signaling pathway in the central nervous system of mice with neuropathic pain. *Biochemical Pharmacology*, 148, 52-63.

Segev, A., & Akirav, I. (2011). Differential effects of cannabinoid receptor agonist on social discrimination and contextual fear in amygdala and hippocampus. *Learning & Memory*, 18(4), 254-259.

Shen, F., Li, Y. J., Shou, X. J., & Cui, C. L. (2012). Role of the NO/sGC/PKG signaling pathway of hippocampal CA1 in morphine-induced reward memory. *Neurobiology of learning and memory*, 98(2), 130-138.

Shen, F., Wang, N., Qi, C., Li, Y. J., & Cui, C. L. (2014). The NO/sGC/PKG signaling pathway in the NAc shell is necessary for the acquisition of morphine-induced place preference. *Behavioral Neuroscience*, 128(4), 446.

Steiner, A.A., Branco, L.G., Cunha, F.Q., Ferreira, S.H., 2001. Role of the haeme oxygenase/carbon monoxide pathway in mechanical nociceptor hypersensitivity. *Br J Pharmacol.* 132, 1673-82.

Sternbach, R. A. (1970). Strategies and tactics in the treatment of patients with pain. In *Pain and Suffering: Selected Aspects* (pp. 176-185). Thomas Springfield, Ill.

Stumm, R.K., Zhou, C., Schulz, S., Höllt, V., 2004. Neuronal types expressing mu- and delta-opioid receptor mRNA in the rat hippocampal formation. *J Comp Neurol.* 469, 107-18.

Suzuki, T., Miyata, M., Zaima, C., Furuishi, T., Fukami, T., Kugawa, F., & Tomono, K. (2010). Blood–brain barrier transport of naloxone does not involve P-glycoprotein-mediated efflux. *Journal of pharmaceutical sciences*, 99(1), 413-421.

Uhelski, M. L., Davis, M. A., & Fuchs, P. N. (2012). Pain affect in the absence of pain sensation: evidence of asomaesthesia after somatosensory cortex lesions in the rat. *PAIN®*, 153(4), 885-892.

Veinante, P., Yalcin, I., & Barrot, M. (2013). The amygdala between sensation and affect: a role in pain. *Journal of molecular psychiatry*, 1(1), 9.

Vierck, C. J., & Yezierski, R. P. (2015). Comparison of operant escape and reflex tests of nociceptive sensitivity. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 51, 223-242.

Vincent, S.R., Hope, B.T., 1992. Neurons that say NO. *Trends Neurosci.* 15, 108-13.

Vincent, S.R., Kimura, H., 1992. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience.* 46, 755-84.

Zhang, C. An, Y. Gao, R.K. Leak, J. Chen, F. Zhang, (2013). Emerging roles of Nrf2 and phase II antioxidant enzymes in neuroprotection. *Prog. Neurobiol.* (100) 30–47.

ANEXO I

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

Comissão de Ética no Uso de Animais

Of. CEUA 074/2017

Ribeirão Preto, 23 de maio de 2017.

Ref. processo nº 2017.1.306.58.2

Senhora Pesquisadora,

Informamos que a Comissão de Ética no Uso de Animais da FORP, em sua 48ª Sessão Ordinária, realizada em 23 de maio de 2017, **aprovou** os procedimentos éticos apresentados no Protocolo sobre a Pesquisa intitulada: **"Papel da interação CO-NO no hipocampo na modulação da aversividade a dor por modulação de receptores μ e δ opióides"**, emitindo o certificado anexo.

Informamos, também, que deverá ser entregue na Secretaria da CEUA, até **22/07/2021**, o **Relatório Final** contendo os resultados e/ou resumo do trabalho publicado.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Andíara De Rossi Daldegan

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais

Ilma. Sra.

Profa. Dra. Christie Ramos Andrade Leite-Panissi
Departamento de Morfologia, Fisiologia e Patologia Básica
desta Faculdade

./aafm

AVENIDA DO CAFÉ S/Nº - TEL: (16) 3602-0251/4123- FAX: (16) 3602-4102
14040-904 - RIBEIRÃO PRETO - SP- BRASIL

CERTIFICADO CEUA – FORP/USP

Certificamos que o projeto intitulado “Papel da interação CO-NO no hipocampo na modulação da aversividade a dor por modulação de receptores μ e δ opióides”, Protocolo nº 2017.1.306.58.2, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Christie Ramos Andrade Leite-Panissi – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADO pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (CEUA/FORP) em 23/05/2017.

Vigência do Projeto	23/05/2017 a 22/06/2021	
Espécie/Linhagem	Camundongo heterogênico / C57 BL/6	Camundongo Knockout NOSI-KO
Nº de animais	172	172
Peso/Idade	20-25 g / 8 semanas	
Sexo	Macho	
Origem	Biotério Central do Campus USP – Ribeirão Preto / Biotério da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP	

Ribeirão Preto, 23 de maio de 2017.

Profa. Dra. Andriara De Rossi Daldegan
Coordenadora da CEUA – FORP/USP

CEUA - FORP/USP

CERTIFICATE CEUA – FORP/USP

We hereby certify that the project entitled “Role of interaction CO-NO in hippocampal pyramidal neurons on pain aversiveness modulation by μ and δ opioid receptors” Protocol 2017.1.306.58.2, under the responsibility of Profa. Dra. Christie Ramos Andrade Leite-Panissi – involving the production, maintenance and/or use of animals from the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for purposes of scientific research (or teaching) – is in accordance with the provisions of Law No. 11.794, of October 8th, 2008, Decree No. 6899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Board of Animal Experimentation Control (CONCEA), with the Ethical principles in animal research adopted by the Animal Research Ethics Committee of the School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil, and was approved in 23/05/2017.

Duration of the Project	23/05/2017 - 22/06/2021	
Species/Lineage	Heterogenic Mouse / C57	Knockout Mouse Knockout
	BL/6	NOSI-KO
Nº of animals	172	172
Weight / age	20-25 g / 8 weeks-old	
Gender	Male	
Origin	Central Animal Research Facilities of Campus Ribeirão Preto – University of São Paulo / Animal Research Facilities of Ribeirão Preto Medical School – University of São Paulo	

Ribeirão Preto, May 23th, 2017.

Profa. Dra. Andriara De Rossi Daldegan
Coordenadora da CEUA – FORP/USP

CEUA - FORP/USP