



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus de Araraquara

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas



Silvia Jimena Cardenas Otero

**O PAPEL DA NEUROTRANSMISSÃO ENDOCANABINOIDE NA ATIVIDADE
NEURONAL DA AMÍDALA SOBRE A MODULAÇÃO DO PROCESSO DE
CRONIFICAÇÃO DA DOR EM CAMUNDONGOS MACHOS E FÊMEAS**

Araraquara, SP

2024

Silvia Jimena Cardenas Otero

**O PAPEL DA NEUROTRANSMISSÃO ENDOCANABINOIDE NA ATIVIDADE
NEURONAL DA AMÍDALA SOBRE A MODULAÇÃO DO PROCESSO DE
CRONIFICAÇÃO DA DOR EM CAMUNDONGOS MACHOS E FÊMEAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza
Coorientadora: Dra. Daniela Baptista de Souza

Araraquara, SP

2024

087p

Otero, Silvia Jimena Cardenas.

O papel da neurotransmissão endocanabinoide na atividade neuronal da amígdala sobre a modulação do processo de cronificação da dor em camundongos machos e fêmeas / Silvia Jimena Cardenas Otero. – Araraquara, 2024.

75 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientador: Ricardo Luiz Nunes de Souza. Coorientadora: Daniela Baptista de Souza.

1. Dor. 2. Sistema endocanabinoide. 3. Ansiedade. 4. Depressão. 5. Dimorfismo sexual. 6. Complexo amigdalóide. I. Souza, Ricardo Luiz Nunes de, orient. II. Souza, Daniela Baptista de, coorient. III. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: O papel da neurotransmissão endocanabinoide na atividade neuronal da amígdala sobre a modulação do processo de cronoficação da dor em camundongos machos e fêmeas

AUTORA: SILVIA JIMENA CARDENAS OTERO

ORIENTADOR: RICARDO LUIZ NUNES DE SOUZA

COORIENTADORA: DANIELA BAPTISTA DE SOUZA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Ciências, área: Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. RICARDO LUIZ NUNES DE SOUZA (Participação Presencial)
Departamento de Farmacos e Medicamentos / Faculdade de Ciencias Farmaceuticas do Campus de Araraquara da Unesp

Prof. Dr. ANDRÉ GONZAGA DOS SANTOS (Participação Presencial)
Departamento de Farmacos e Medicamentos / Faculdade de Ciencias Farmaceuticas do Campus de Araraquara da Unesp

Prof. Dr. DIEGO CARDOZO MASCARENHAS (Participação Virtual)
Centro Universitário Braz Cubas (UBC)

Araraquara, 13 de dezembro de 2024

Aos meus pais, este trabalho é reflexo de todo o amor e dedicação que dedicaram. Para mim mesma, por me mostrar que posso superar todos os desafios que surgem no meu caminho na vida, esta é uma das muitas vitórias que virão.

AGRADECIMIENTOS

A Deus, por ser meu companheiro e guia ao longo deste caminho repleto de aprendizados.

A minha família, o apoio e a fé em mim foram a força motriz para poder ficar longe de vocês. Meu pai, Eliecer Cardenas, por cada ligação aos domingos que me fazia esquecer a distância, a minha mãe, Martha Otero, por todos os bons dias e boas noites nesses 2 anos longe dela, a minha irmã, Manuela, que sempre me informou das fofocas familiares e me fez sentir presente nelas.

Ao professor Javier Rico, sem o seu apoio e fé em mim eu não teria conseguido realizar este sonho.

A Araraquara, pelas novas experiências e pessoas que chegaram na minha vida.

A minhas amigas, “las reales” Natalia, Daniela e Valentina que mesmo estando longe sempre me fizeram sentir acompanhada, a minha “mor” Karen, obrigado por cada mensagem diária. Aos amigos que ficaram pelo caminho, obrigado por acreditarem em mim e fazerem parte do início deste projeto.

Para minha pequena família de tão, tão distante, os colombianos. Obrigado por cada momento, risada e conselho. Vocês me fizeram sentir em casa.

Aos membros do laboratório de Neuropsicofarmacologia, obrigado pelos momentos de café e fofoca.

Agradeço especialmente ao meu orientador Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza, a minha coorientadora Dra. Daniela Baptista de Souza e Dr. Lucas Cantos de Souza, o apoio de vocês dentro e fora do laboratório me deu forças para continuar sonhando. Também ao Prof. Dr. Carlos Crestani e Doutorando Vinícius Pelarin, obrigado pelo apoio e fazerem parte desta pesquisa.

Aos membros da UNESP, os bons dias e boas noites fizeram o caminho mais leve.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

A Sociedade Brasileira do Estudo da Dor (SBED) aponta que 30-50% das pessoas que buscam atendimento no SUS sofrem de dor crônica, frequentemente associada a transtornos afetivos como depressão e ansiedade. Com o objetivo de desenvolver analgésicos mais eficazes, diversas pesquisas têm se voltado para a investigação do papel do sistema endocanabinoide e seu potencial analgésico. Evidências apontam para a presença de dimorfismos sexuais na neurotransmissão endocanabinoide em diferentes regiões do sistema nervoso central, sendo o complexo amigdalóide uma área de especial interesse. Assim, considerando as possíveis diferenças sexuais na transmissão dolorosa relacionadas ao sexo biológico, este estudo teve como objetivo investigar as diferenças sexuais e comportamentais causadas pela acentuação da neurotransmissão endocanabinoide sobre as respostas sensoriais e afetivo-emocionais induzidas pelo processo de cronificação da dor em camundongos fêmeas e machos. Os objetivos específicos foram: (i) Avaliar o efeito da inibição das enzimas FAAH (PF3845) e MAGL (JZL184) sobre a hiperalgesia mecânica (teste de Von Frey), expressão facial de dor (Grimace Scale), ansiedade (labirinto em cruz elevado) e depressão (estado da pelagem e ganho de peso); (ii) Investigar o padrão de ativação dos núcleos basolateral, central e medial do complexo amigdalóide após a acentuação da neurotransmissão endocanabinoide através da análise de imunofluorescência para Δ FosB. Nossos resultados apontam que o tratamento i.p com PF3845 promoveu redução da expressão facial de dor e melhora da qualidade da pelagem apenas nas fêmeas, enquanto reduziu a hiperalgesia mecânica em ambos os sexos. O JZL184 foi capaz de atenuar a expressão facial de dor apenas nos machos e reduziu a hiperalgesia mecânica em machos e fêmeas. Nos dados da imunofluorescência foi demonstrado que apenas o JZL184 nas fêmeas induziu ativação da amígdala basolateral semelhante ao animal do grupo controle (Naïve). O estudo destaca o impacto das diferenças sexuais na neurotransmissão endocanabinoide e suas implicações nas respostas sensoriais e emocionais à dor crônica.

Palavras-chave: dor; sistema endocanabinoide; ansiedade; depressão; dimorfismo sexual; complexo amigdalóide.

ABSTRACT

The Brazilian Society for the Study of Pain (SBED) reports that 30–50% of individuals seeking care in Brazil's Unified Health System (SUS) suffer from chronic pain, which is often associated with affective disorders such as depression and anxiety. In the pursuit of more effective analgesics, numerous studies have focused on investigating the role of the endocannabinoid system and its analgesic potential. Evidence suggests the presence of sexual dimorphisms in endocannabinoid neurotransmission across various regions of the central nervous system, with the amygdaloid complex being a particularly relevant area of interest. Considering the potential sex-based differences in pain transmission linked to biological sex, this study aimed at investigating sex-related and behavioral differences driven by enhanced endocannabinoid neurotransmission on sensory and affective-emotional responses during chronic pain in male and female mice. The specific objectives were: (i) Evaluate the effects of FAAH (PF3845) and MAGL (JZL184) inhibition on mechanical hyperalgesia (Von Frey test), facial expression of pain (Grimace Scale), anxiety (elevated plus maze), and depression (fur condition and weight gain); and (ii) Analyze the activation patterns of the basolateral, central, and medial nuclei of the amygdaloid complex following increased endocannabinoid neurotransmission using immunofluorescence for Δ FosB. Our results showed that i.p treatment with PF3845 reduced facial pain expression and improved fur condition exclusively in females, while it decreased mechanical hyperalgesia in both sexes. Conversely, JZL184 attenuated facial pain expression only in males and reduced mechanical hyperalgesia in both sexes. Notably, only JZL184-treated females exhibited basolateral amygdala (BLA) activation patterns like the Naïve group. This study underscores the influence of sexual dimorphisms in endocannabinoid neurotransmission and their implications for sensory and affective-emotional responses to chronic pain.

Keywords: pain; endocannabinoid system; anxiety; depression; sexual dimorphism; amygdaloid complex.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Protocolo experimental	27
Figura 2 - Avaliação da expressão facial de dor machos e fêmeas - Experimento 1a.	29
Figura 3 - Avaliação da hiperalgesia mecânica avaliada no Von Frey machos e fêmeas - Experimento 1a.	30
Figura 4 - Avaliação do ganho de peso machos e fêmeas - Experimento 1a.	31
Figura 5 - Avaliação condição da pelagem machos e fêmeas - Experimento 1a.....	32
Figura 6 – Labirinto em cruz Elevado machos e fêmeas - Experimento 1a.	33
Figura 7 - Avaliação da expressão facial machos e fêmeas - Experimento 1b.....	34
Figura 8 - Avaliação da hiperalgesia mecânica avaliada no Von Frey machos e fêmeas - Experimento 1b.	35
Figura 9 - Avaliação do ganho de peso machos e fêmeas – Experimento 1b.....	36
Figura 10 - Avaliação condição da pelagem machos e fêmeas – Experimento 1b.	37
Figura 11 - Labirinto em cruz Elevado machos e fêmeas – Experimento 1b.....	38
Figura 12 - Fotomicrografias que ilustram de maneira representativa a marcação Δ FosB no complexo amigdalóide.....	39
Figura 13 - Efeito do processo de cronificação da dor e os tratamentos farmacológicos do experimento 1a sobre o padrão de ativação dos núcleos amigdalóides	40
Figura 14 - Efeito do processo de cronificação da dor e os tratamentos farmacológicos do experimento 1b sobre o padrão de ativação dos núcleos amigdalóides	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tratamento farmacológico Experimento 1a.	24
Tabela 2 - Tratamento farmacológico Experimento 1b	24
Tabela 3 - Síntese dos Resultados Obtidos	54
Tabela 4 - ANOVA para medidas repetidas Escala facial de dor para camundongos e Von Frey.	69
Tabela 5 - Fatores individuais ANOVA dois fatores para medidas repetidas Escala facial de dor para camundongos e Von Frey.....	70
Tabela 6 - Interação entre os fatores ANOVA de dois fatores para medidas repetidas Escala facial de dor para camundongos e Von Frey.....	71
Tabela 7 - ANOVA de dois fatores para medidas repetidas -Teste Post Hoc de Duncan Escala facial de dor para camundongos e Von Frey.....	72
Tabela 8 - ANOVA de uma via Ganho de peso e Labirinto em Cruz Elevado.....	73
Tabela 9 - ANOVA de uma via -Teste Post Hoc de Duncan Ganho de peso e Labirinto em Cruz Elevado.....	74
Tabela 10 - ANOVA de uma via Padrão de ativação neuronal (Δ FosB) no complexo amidalóide.....	75
Tabela 11 - ANOVA de uma via -Teste Post Hoc de Duncan Padrão de ativação neuronal (Δ FosB) no complexo amidalóide.....	75

SUMARIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Dor, Ansiedade e Depressão	13
1.2 Dimorfismo sexual da dor	14
1.3 Vias nociceptivas.....	15
1.4 Amígdala e dor	16
1.5 Sistema endocanabinoide.	17
1.6 Sistema endocanabinoide e Dimorfismo sexual.....	19
1.7 Modelo de hiperalgesia latente (do inglês, " <i>Hyperalgesic priming</i> ")	19
1.8 Justificativa.....	20
1.9 Hipótese.....	20
2. OBJETIVOS.....	21
2.1 Objetivo Geral	21
2.2 Objetivos específicos.....	21
3. MATERIAL E MÉTODO	22
3.1 Sujeitos	22
3.2 Escala facial de dor para camundongos	22
3.3 Avaliação de hiperalgesia mecânica (Teste de Von Frey)	22
3.4 Avaliação do Ganho de Peso.....	22
3.5 Avaliação da Condição da Pelagem	23
3.6 Procedimento cirúrgico	23
3.7 Tratamentos farmacológicos.	23
3.8 Teste Labirinto em Cruz Elevado (LCE)	24
3.9 Perfusão e ensaio de Imunofluorescência	25
3.10 Delineamento experimental.....	26
3.11 Análise estatística	27
3.12 Ética.....	28
4.1 Experimento 1a. Inibidor da FAAH: PF3845 (iFAHH).....	29
4.1.1 Avaliação da Escala facial de dor para camundongos.....	29
4.1.2 Avaliação de hiperalgesia mecânica (Teste de Von Frey)	30
4.1.3 Avaliação do Ganho de Peso	31
4.1.4 Avaliação Condição da pelagem	31

4.1.5 Teste Labirinto em Cruz Elevado (LCE).....	32
4.2 Experimento 1b. Inibidor da MAGL:JZL184 (iMAGL).....	34
4.2.1 Avaliação Escala facial de dor para camundongos	34
4.2.2 Avaliação de hiperalgesia mecânica (Teste de Von Frey)	35
4.2.3 Avaliação do Ganho de Peso.....	36
4.2.4 Avaliação Condição da pelagem	36
4.2.5 Teste Labirinto em Cruz Elevado (LCE)	37
4.3 Padrão de ativação neuronal (Δ FosB) no complexo amigdalóide	39
4.3.1 Padrão de ativação neuronal (Δ FosB) no complexo amigdalóide Experimento 1a. Inibidor da FAAH:PF3845 (iFAAH)	39
4.3.2 Padrão de ativação neuronal (Δ FosB) no complexo amigdalóide Experimento 1b. Inibidor da MAGL:JZL184 (iMAGL)	40
5. DISCUSSÃO	42
6. CONCLUSÕES	55
REFERÊNCIAS.....	56
ANEXO A - ESTRUTURA DE VON FREY	67
ANEXO B - MICROFILAMENTOS DE VON FREY	68
APÊNDICE A – Dados das Análises Estatísticas.....	69

1. INTRODUÇÃO

1.1 Dor, Ansiedade e Depressão

A Associação Internacional para o estudo da Dor (do inglês *International Association for the Study of Pain - IASP*) define a dor como “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada, ou semelhante àquela associada, a uma lesão tecidual real ou potencial” A dor aguda é identificada por sua curta duração que varia de alguns minutos a várias semanas, além de caracterizar-se por ter sua resolução quando a causa desencadeante desaparece, sendo geralmente bem localizada e com função protetora (Perrot *et al.*, 2019). A dor crônica tem uma duração de 3 ou 6 meses, segundo a literatura médica, e persiste mesmo que não haja mais um fator desencadeante (Blanco Naranjo; Chavarría Campos; Garita Fallas, 2021). A dor é um importante problema de saúde pública, sendo o principal motivo de procura por consultas médicas nos serviços de saúde. Dados recentes apontam que cerca de 60% da população em algum momento procurou serviços de saúde com queixas de dor (Solano Guillén; Villalobos Zúñiga, 2022).

Neste sentido, os quadros de dor crônica são altamente prevalentes em todo o mundo. Estima-se que 25% dos adultos sofram de dor crônica, e que a patologia seja diagnosticada em outros 10% a cada ano, e, além disso, observa-se que a prevalência geral da dor crônica é maior em mulheres (Carvalho *et al.*, 2018). Pesquisas publicadas pela *Spanish Pain Society* (SED), o Observatório da Dor (*The Observatory of Pain*) e o Ministério da Saúde Espanhol, juntamente com os estudos realizados pela plataforma de organizações de pacientes da Espanha, descrevem que a dor crônica é duas vezes mais prevalente em mulheres que em homens. Além disso, as mulheres apresentam quadros algícos mais intensos e de maior duração para diferentes tipos de dor, como na fibromialgia, enxaqueca e dores de cabeça relacionadas a processos tensionais (Gallach *et al.*, 2020). A dor crônica é uma condição que influencia na qualidade de vida, sendo a ineficácia da farmacoterapia uma realidade em muitos quadros, gerando a busca pelo desenvolvimento de novos analgésicos (Donvito; Nass; Wilkerson *et al.*, 2018).

Diversas evidências apontam para a alta prevalência de comorbidade da dor crônica e distúrbios de caráter afetivo. Neste sentido, Hudson e Pope, em 1994, já descreveram a frequente presença de manifestações de depressão e ansiedade em quadros de dor crônica. Além disso, já foi demonstrado que 58% dos pacientes deprimidos apresentam algum tipo de ansiedade e 52,2% dos

pacientes com ansiedade apresentam depressão, o que demonstra também a frequente associação entre estes transtornos emocionais e afetivos (Arango-Davila; Rincon-Hoyos, 2018). Também tem sido descrito que a dor crônica pode ser caracterizada como um preditor de depressão maior ou piora dos sintomas leves, assim como também se observa uma correlação entre ansiedade e depressão com a gravidade dos sintomas dolorosos (Xie *et al.*, 2012; Romera *et al.*, 2012). No Brasil, a SBED (Sociedade Brasileira do Estudo da Dor) reporta uma prevalência de 30-50% de pessoas que procuram atendimento nos SUS em relação a dor crônica e em torno de 5% apresentam alguma limitação grave. Em relação aos transtornos psicológicos, existe uma prevalência média de 40,17% de ansiedade e 35,31% de depressão em pessoas com alguma dor crônica como dor crônica pélvica, dor lombar crônica, pancreatite crônica, fibromialgia, artrite reumatoide e polineuropatia diabética dolorosa (Fortes Júnior, Edmar José *et al.*, 2023)

1.2 Dimorfismo sexual da dor

Um importante aspecto dentro do campo de pesquisa dos processos algícos são as diferenças sexuais na modulação da dor. Atualmente existem informações onde múltiplos estudos demonstram a existência de mecanismos distintos entre os sexos na modulação da resposta à dor, como a evidenciada no desenvolvimento da Escala de Hipersensibilidade Sensorial (Dixon *et al.*, 2016). Neste estudo, foi descrito que as mulheres tinham menor limiar sensorial em comparação aos homens em grupos de pacientes saudáveis. Complementarmente, quando a ativação parassimpática é analisada durante estímulos dolorosos, a modulação da dor foi associada à atividade parassimpática apenas em homens, enquanto as que mulheres tiveram maior atividade parassimpática basal, esta ativação não estava associada à modulação da dor (Nahman-Averbuch *et al.*, 2016)

Além disso, Girad-Tremblay e colaboradores (2014) demonstraram que existem diferenças sexuais em centros responsáveis pelo processamento das emoções frente a percepção dolorosa. Enquanto os homens mobilizariam áreas do córtex pré-frontal ventromedial que medeiam os circuitos de controle de ameaças, sendo uma área diretamente relacionada à ansiedade; as mulheres para lidar com a dor desagradável, recrutam centros de processamento de emoções, como o complexo amigdalóide e córtex cingulado anterior.

Embora esta realidade clínica seja conhecida, uma revisão de artigos de estudos pré-clínicos na revista especializada PAIN evidenciou que, entre 1996-2005, 79% das publicações utilizaram apenas ratos machos (Mogil *et al.*, 2024). Desta forma, este panorama deixa uma lacuna

do ponto de vista da relevância translacional para a compreensão deste fenômeno biológico. Infelizmente, este aspecto evidencia um viés na literatura nas áreas de neurociências, fisiologia, farmacologia e endocrinologia, criando um ruído na terapêutica da dor e consequentemente dificultando o desenvolvimento de fármacos com similar eficácia tanto em homens quanto em mulheres. Assim, historicamente a exclusão de fêmeas dos experimentos pré-clínicos resultou no desenvolvimento de terapias que identificam alvos e processos apenas em machos (Burma *et al.*, 2017; Linher-Melville; Shah; Singh, 2020).

Com o exposto, podemos destacar a relevância de investigações na área da modulação da transmissão nociceptiva, referente à presença de dimorfismo sexual nas vias emocionais (Girard-Tremblay *et al.*, 2014) e nociceptivas (Blanton; Barnes; MChann *et al.*, 2021). Neste sentido, tem sido crescente o interesse da comunidade científica em identificar diferenças sexuais em resposta à dor.

1.3 Vias nociceptivas

A capacidade de detectar estímulos nocivos é importante para a sobrevivência e o bem-estar do organismo, entretanto, existem alterações nas vias da dor que geram hipersensibilidade, passando de um sistema de alerta e sobrevivência para um sistema debilitante e crônico. O processo de nocicepção, de acordo com a descrição proposta na revisão de Basbaum *et al.*, (2009), se inicia a partir da ativação dos nociceptores (os receptores da dor) quando o estímulo atinge um nível nocivo. Como consequência deste estímulo, a informação é captada e transmitida para fibras aferentes mielinizadas de diâmetro médio (A δ), que medeiam a dor aguda, bem localizada, "primeira" ou rápida, e que respondem a estímulos mecânicos e químicos; as fibras A β , de maior diâmetro e condução rápida, que respondem à estimulação mecânica não nociva; e as fibras "C", amielínicas e de diâmetro pequeno, que transmitem dor mal localizada, "segunda" ou lenta.

As fibras nervosas aferentes primárias projetam-se para a coroa dorsal da medula espinhal, que está organizada em lâminas anatômicas e eletrofisiológicas distintas (Basbaum; Jessell, 2000). No caso dos nociceptores A δ , eles projetam-se tanto para a lâmina I quanto para a coroa dorsal mais profunda (lâmina V). As aferências A β projetam-se para as lâminas profundas (III, IV e V); por outro lado, as fibras C projetam-se de forma mais superficial para as lâminas I e II. Os neurônios de projeção dentro das lâminas I e V constituem a principal via de saída da coroa dorsal para o cérebro e levam mensagens de dor para o tálamo e o tronco encefálico. Além disso, também há um interesse atual nas projeções da medula espinhal para a região parabraquial da protuberância

dorsolateral, pois a saída dessa região fornece uma conexão muito rápida com a amígdala, uma área que geralmente é considerada como processadora de informações relevantes para as propriedades aversivas da experiência da dor.

A percepção dolorosa é o resultado da ativação de diferentes estruturas, algumas das quais estão mais associadas às propriedades sensoriais e discriminativas (como o córtex somatossensorial) e outras aos aspectos emocionais (como o giro cingulado anterior e o córtex insular). Mais recentemente, estudos de imagem demonstram a ativação das áreas corticais pré-frontais, assim como de regiões que geralmente não são associadas ao processamento da dor, como os gânglios da base e o cerebelo (Basbaum e Jessell, 2000).

1.4 Amígdala e dor

Dentre as regiões do sistema nervoso central que participam dos processos relacionados à nocicepção está o complexo amigdaloide. A amígdala mantém uma complexa rede de conexões com diversas regiões corticais, subcorticais e do tronco encefálico. Ela inclui núcleos cruciais que desempenham um papel fundamental no processamento sensorial e nas respostas relacionadas à dor, conforme mencionado na revisão de Neugebauer (2015). Este complexo é descrito como um conjunto de núcleos interrelacionados que modulam a dor persistente e estados emocionais e afetivos como medo, ansiedade e depressão, apontando para a amígdala como local importante dessa interação (Perez Ruiz, Jimenez Gutierrez; Veja Cisneros, 2018).

O núcleo basolateral da amígdala (BLA) contém neurônios que respondem principalmente a estímulos nocivos. As informações processadas na rede LA (lateral)-BLA são transmitidas ao núcleo central (CeA), que atua como uma via de saída essencial da amígdala, projetando-se para os sistemas moduladores da dor por meio de conexões com o prosencéfalo e o tronco encefálico. Além disso, a divisão laterocapsular do CeA (CeLC) recebe informações nociceptivas específicas da medula espinhal e do tronco encefálico, particularmente da área parabraquial lateral externa, por meio da via da dor espino-parabraquial-amígdala. A maioria dos neurônios do CeLC responde predominantemente ou exclusivamente a estímulos nociceptivos (Neugebauer, 2004).

Além disso, já é descrito na literatura o papel da amígdala na modulação afetiva da dor em algumas áreas específicas como: amígdala basolateral (BLA), lateral, central (CeA) e medial (MeA). Cabe destacar que estudos anteriores já demonstraram que a ativação da amígdala central (CeA) pode atenuar ou exacerbar a dor em camundongos (Wilson *et al.*, 2019) e que o CeA processa informações e envia para os núcleos lateral e capsular que respondem a estímulos

nocivos, sendo as áreas relacionadas a esse processamento também chamadas de "amígdala nociceptiva" (Neugebauer *et al.*, 2004).

Embora existam poucas informações sobre o dimorfismo sexual da amígdala, Cantu e colaboradores (2022) caracterizaram as projeções da CeA e medial em estado de dor persistente, e propuseram que a MeA favorece a antinocicepção em ratos machos e a CeA facilita a hiperalgesia em ratas fêmeas, isto torna interessante o estudo das diferenças sexuais e da participação da amígdala na modulação da dor. Adicionalmente, nesta região também já foi demonstrada a presença de dimorfismo sexual, um exemplo é a pesquisa realizada por Baptista-De-Souza e colaboradores, (2020) na qual a manipulação de mecanismos de plasticidade sináptica nesta região poderia influenciar a sensibilização hiperalgésica.

1.5 Sistema endocanabinoide.

Dentre os diferentes neurotransmissores que modulam a transmissão dolorosa, cabe destacar o relevante papel do sistema endocanabinoide (Blanton; Barnes; Mchann *et al.*, 2021). Nesse cenário, estudos pré-clínicos apontam para o potencial analgésico dos endocanabinoides, ao demonstrarem a eficácia de fármacos que atuam nessa neurotransmissão em modelos de dor inflamatória em roedores (Richardson, 2000 apud Donvito; Nass; Wilkerson *et al.*, 2018).

O sistema endocanabinoide é um sistema lipídico neuromodulador composto por dois ligantes endógenos (AEA, do inglês *N-arachidonoyl ethanolamine* e *2-arachidonoylglycerol*), enzimas que regulam sua biossíntese e degradação (FAAH do inglês “fatty acid amide hydrolase” e MAGL do inglês “monoacylglycerol lipase”), e dois receptores principais (CB₁ e CB₂), que têm um papel fundamental no sistema nervoso periférico (Batkai *et al.*, 2004; Ziegler *et al.*, 2010) e central (Kano *et al.*, 2009), sobretudo em diferentes processos fisiológicos e comportamentais, como ansiedade e nocicepção (Busquets-Garcia *et al.*, 2011).

A neurotransmissão endocanabinoide consiste na síntese do AEA e o 2-AG s sob demanda, a partir dos precursores de fosfolipídios na membrana pós-sináptica por um mecanismo dependente de Ca²⁺, e retroalimentam os terminais pré-sinápticos suprimindo a liberação aferente de neurotransmissores por meio da ativação dos receptores CB₁ (Ohno-Shosaku; Kano, 2014). Esse processo ainda permanece um enigma, mas acredita-se atualmente que ocorra por meio de uma síntese pós-sináptica e um sítio de ação pré-sináptico. Após sua liberação, o AEA e o 2-AG são reabsorvidos pela célula através de um processo de captação que ainda não foi completamente elucidado, mas que é mediado por um mecanismo transportador (Fu *et al.*, 2011; Hillard *et al.*,

1997), e são degradados pelas enzimas hidrolíticas FAAH, (Cravatt *et al.*, 2001), e MAGL (Dinh *et al.*, 2002).

Diferentes estudos descrevem o papel do receptor CB₁ no controle da transmissão de estímulos nociceptivos periféricos para o sistema nervoso central, podendo agir na intensificação ou atenuação da propagação de tais estímulos para o cérebro. Por outro lado, o receptor CB₂ teria seu papel desempenhado principalmente nas células do sistema imunológico, sendo que sua ativação gera inibição dos efeitos inflamatórios, além de ter também um papel importante no desenvolvimento de estados de dor crônica (Devaney *et al.*, 1988; Matsuday *et al.*, 1990; Munro *et al.*, 1993 apud Donvito *et al.*, 2018).

Estudos vêm apontando também para a participação do sistema endocanabinoide em transtornos afetivo-emocionais associados à ansiedade e depressão (Manduca *et al.*, 2015; Bedse *et al.*, 2018; Maldonado *et al.*, 2020). Em trabalho com camundongos, Busquets-Garcia e colaboradores (2011) demonstram que estímulos emocionais transmitidos ao núcleo basolateral da amígdala (BLA) modulam os níveis da anandamida (AEA) e do 2-araquidonoilglicerol (2-AG), os dois principais ligantes endocanabinoides, e, ainda, que o bloqueio farmacológico dos receptores CB₁ e/ou CB₂ do BLA produziu efeito ansiolítico. Adicionalmente, Sciolino e colaboradores, (2011) demonstram também níveis plasmáticos aumentados de 2-AG em roedores em estados de depressão e ansiedade. Nesse sentido, Sciolino *et al.*, (2011) explicitam que, por se tratar de um sistema neuromodulador de processos psicofisiológicos, a desregulação do sistema endocanabinoide estaria relacionada com distúrbios afetivos-emocionais como os transtornos do humor e ansiedade.

Desse modo, aumentos indiretos dos endocanabinoides por meio da inibição da amida hidrolase de ácidos graxos (FAAH, do inglês “*fatty acid amide hydrolase*”) e monoacilglicerol lipase (MAGL, do inglês “*monoacylglycerol lipase*”), as principais enzimas de degradação endocanabinoide, vêm sendo exploradas como novas abordagens terapêuticas (Carnevali *et al.*, 2017; Bedse *et al.*, 2020; Ren *et al.*, 2020). Nesse cenário, em revisão feita por Donvito e colaboradores (2018), são destacadas diferentes investigações pré-clínicas com modelos de dor inflamatória e neuropática em roedores. Estes achados demonstram que, ao inibir estas enzimas, há redução da hiperalgesia gerada por vários processos inflamatórios e dor neuropática e potencialização da eficácia do sistema endocanabinoide. Estes efeitos ocorrem em decorrência da rápida hidrólise da AEA, do inglês “*N-arachidonoyl ethanolamine*” e do 2-AG pelas enzimas

catalisadoras FAAH e MAGL, podendo, desta forma, os inibidores dessas duas enzimas produzirem ações antinociceptivas e antiinflamatórias (Devaney *et al.*, 1992; Mechoulamy *et al.*, 1995; Cravatty *et al.*, 2001; Dinhy *et al.*, 2002).

1.6 Sistema endocanabinoide e Dimorfismo sexual

Com relação ao possível dimorfismo sexual presente na neurotransmissão endocanabinoide, a informação atual ainda não é muito clara em relação a este aspecto, mas evidências apontam para expressão diferenciada dos receptores CB₁ e CB₂ em áreas responsáveis pela síntese e regulação de hormônios, o que pode contribuir para a ocorrência de diferenças no perfil da resposta à dor entre os sexos em áreas que modulam processos nociceptivos. Por exemplo, os roedores fêmeas tendem a ter níveis circulantes mais altos de AEA em comparação com os machos, e foi demonstrado que as ratas possuem níveis mais altos de 2-AG no hipotálamo em comparação aos ratos (Bradshaw *et al.*, 2006). Além disso, em ratas ovariectomizadas, foi encontrado aumento de CB₁ no córtex pré-frontal e hipófise anterior (Castelli *et al.*, 2014; Gonzales *et al.*, 2000) e diminuição de CB₁ em regiões como os núcleos límbicos rostrais, núcleo accumbens, núcleos septais e partes dos núcleos amigdalianos anteriores (Rodriguez de Fonseca *et al.*, 1994).

Outra investigação focada no dimorfismo sexual é a de Amir Hamzah *et al.* (2023), na qual os autores descobriram que os níveis de endocanabinoides apresentam variações ao longo da vida, dependendo do sexo e da idade. Esses níveis estão correlacionados com períodos conhecidos de mudanças fisiológicas significativas, como durante a gravidez, menopausa e pós-menopausa. Além disso, foi descrito que, à medida que a idade avançava, os níveis de AEA e 2-AG eram mais altos nos homens em comparação com as mulheres. Em relação à amígdala, estrutura relacionada com a neurotransmissão endocanabinoide a literatura atual menciona que existe um dimorfismo sexual, um exemplo está destacado no trabalho de Castelli e colaboradores (2014), em que os autores demonstraram maior expressão de receptores CB₁ nessa estrutura límbica em camundongos machos em comparação com fêmeas.

1.7 Modelo de hiperalgesia latente (do inglês, "*Hyperalgesic priming*")

Uma importante ferramenta que pode ser utilizada em investigações sobre os mecanismos envolvidos na cronificação da dor é o modelo animal que envolve o processo de hiperalgesia latente (do nome em inglês, "*Hyperalgesic priming*"), o qual permite entender a plasticidade do sistema nociceptivo, contribuindo para esclarecimentos acerca do processo de dor crônica

(Reichling; Levine, 2009). A plasticidade neuronal, observada nos processos de cronificação da dor, é uma propriedade adaptativa do sistema nervoso que se refere à habilidade de um neurônio de responder a estímulos internos ou externos. Nesse contexto, após uma lesão, as mudanças plásticas que reconfiguram o sistema nervoso autônomo envolvem um equilíbrio entre a morte celular e a regeneração dos neurônios que se mantêm intactos (Terenghi; Kingham, 2009).

Desta forma, o modelo de Hiperalgia latente implica em uma sensibilização inicial, onde os animais são submetidos em um primeiro estímulo nocivo (incisão plantar), o que provoca hiperalgia aguda, observada como uma redução no limiar da resposta de retirada frente a um estímulo de pressão mecânica aplicado à pata inflamada. Essa inflamação diminui em poucos dias, momento em que os animais recebem um segundo estímulo, uma citocina inflamatória chamada prostaglandina E_2 (PGE_2), desencadeando um processo de hiperalgia sustentada. Pesquisas anteriores já evidenciaram que a hiperalgia provocada pela PGE_2 não só intensifica e prolonga a inflamação, como também induz neuroplasticidade nas vias de sinalização intracelular (Reichling; Levine, 2009; Price; Ray, 2019; Kandasamy; Price, 2015; Baptista-De-Souza et al., 2020).

1.8 Justificativa

Este projeto busca investigar a presença de dimorfismo sexual na modulação da transmissão dolorosa, especificamente no processo de cronificação da dor. A presente investigação tem como foco a avaliação de respostas sensoriais e afetivas frente ao estímulo doloroso, e o papel da neurotransmissão endocanabinoide no complexo amigdalóide. A justificativa para a condução deste estudo é o reduzido número de uso de fêmeas como sujeito experimental em estudos pré-clínicos. Além disso, tal como apontado na revisão realizada por Blanton; Barnes; Mchann e colaboradores (2021), os estudos investigando o papel da neurotransmissão endocanabinoide nas diferenças sexuais em quadros algícos são relativamente limitados. Portanto, esta pesquisa pré-clínica tem por propósito contribuir com informações relevantes para o desenvolvimento de analgésicos que sejam mais efetivos no tratamento de quadros de dor crônica em homens e mulheres.

1.9 Hipótese

A neurotransmissão endocanabinóide no complexo amigdalóide atua por mecanismos sexualmente diversos sobre as respostas sensoriais e afetivo-emocionais desencadeadas pelo processo de cronificação da dor.

1. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar diferenças sexuais, comportamentais e neuro-funcionais ocasionadas pela acentuação da neurotransmissão endocanabinoide sobre as respostas sensoriais e afetivo-emocionais induzidas pelo processo de cronificação da dor em camundongos fêmeas e machos.

2.2 Objetivos específicos

1. Avaliar o efeito da inibição das enzimas FAAH (PF3845) e MAGL (JZL184) sobre a hiperalgesia mecânica, expressão facial de dor e comportamentos relacionados à ansiedade e depressão no processo de cronificação da dor em camundongos fêmeas e machos.
2. Investigar o padrão de ativação do complexo amigdalóide após a exacerbação da neurotransmissão endocanabinoide em camundongos fêmeas e machos submetidos ao modelo de hiperalgesia latente.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1 Sujeitos

Foram utilizados 174 camundongos fêmeas (87) e machos (87) da linhagem Swiss-Webster com 21 dias pós-natal (DPN) provenientes do biotério central da Universidade Estadual Paulista, UNESP. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura (23 ± 2 °C), ciclo de luz 12h/12h (luzes acesas às 7:00h) e tiveram livre acesso ao alimento e à água, exceto durante os períodos de teste.

3.2 Escala facial de dor para camundongos

A escala facial de dor para camundongos é utilizada para quantificar os aspectos afetivos relacionados à dor. A escala foi desenvolvida por Langford et al., (2010), levando em consideração aspectos como o estreitamento orbital, a protuberância nasal e da bochecha, o posicionamento das orelhas e alteração nas vibrissas, avaliados quando o animal está no aparato previamente ao teste de Von Frey (ver seção 4.3). Após a análise desses aspectos é atribuído um escore: (0) para dor ausente/não visível; (1) dor moderada e (2) para dor intensa e realizada uma média considerando as cinco características avaliadas (ANEXO A).

3.3 Avaliação de hiperalgesia mecânica (Teste de Von Frey)

Os animais são alocados individualmente em caixas acrílicas transparentes (9,8 x 22,5 x 7,8 cm) com tela ou fundo penetrável que permite o acesso às suas patas. Após a habituação dos animais ao aparelho, microfilamentos de Von Frey com diferentes forças são aplicados em ordem crescente ou decrescente de força a depender da resposta na região plantar da pata direita traseira do sujeito experimental, com força suficiente para gerar uma ligeira curvatura por aproximadamente 6-8 segundos. No teste são consideradas respostas positivas quando o animal exhibe comportamentos nocifensivos, como a retirada brusca da pata, agitação da pata após a retirada do microfilamento, lamber ou sacudir a pata, seja durante a aplicação do estímulo ou imediatamente após a retirada do filamento (Deuis; Dvorakova; Vetter, 2017). Para análise dos resultados, os dados são normalizados através do cálculo estabelecido por Chaplan e colaboradores (1994), que converte o limiar de retirada da pata em gramas (ANEXOS B e C).

3.4 Avaliação do Ganho de Peso

A maior parte dos pacientes em quadros de depressão apresenta alterações no consumo alimentar e no peso, seja com perda ou aumento do apetite (Hasler et al., 2004). Em roedores, diferentes medidas podem ser tomadas para avaliar possível ganho (da Costa *et al.*, 2023; Moles *et al.*, 2006) ou perda de peso (Surget; Belzung, 2009; Willner, 2017) durante um período,

permitindo evidenciar comportamentos relacionados à depressão, como a anedonia, por meio da redução do consumo de alimentos. Para avaliar se o protocolo de Hiperalgesia latente prejudica o ganho de peso corporal, os animais foram pesados antes da incisão plantar e ao final do protocolo, e o ganho de peso foi calculado subtraindo o peso inicial do animal do peso no último dia do protocolo.

3.5 Avaliação da Condição da Pelagem

Em roedores, a piora na condição da pelagem é associada à apatia, que é uma resposta secundária da depressão. A apatia é definida como um déficit em comportamentos orientados a um objetivo, tal qual o comportamento de autolimpeza (Cathomas et al., 2015; Planchez; Surget; Belzung, 2019). Para avaliação do estado da pelagem realizou-se uma adaptação do protocolo estabelecido Nollet e colaboradores (2021), no qual atribui-se à qualidade do pêlo um valor numérico entre 0 e 1; onde 0 equivale às boas condições; 0,5 se moderadamente em más condições e 1 se em más condições. Ao final, a pontuação total pode ser conferida pela soma da análise de cada área (cabeça, pescoço, abdômen, dorso e começo da cauda) (ANEXO D).

3.6 Procedimento cirúrgico

Antes do procedimento cirúrgico (24 horas antes), os animais foram submetidos ao Teste de Von Frey para mensuração da latência nociceptiva basal. No procedimento cirúrgico, sob anestesia com isoflurano (concentração de indução de 4-5% + 0,8-1 L/min e concentração de manutenção de 1-3% + 0,8-1 L/min), foi realizada uma incisão plantar de aproximadamente 11 mm na pata traseira direita do animal. Vinte e quatro horas e 15 dias após a cirurgia são realizados o teste de Von Frey e a avaliação da escala facial de dor para camundongos. Após a confirmação do retorno do limiar de retirada da pata aos níveis basais (o que se dá em aproximadamente 15 dias depois), os animais receberam uma injeção de prostaglandina E₂ (*Cayman Chemical Company, 14010*) (100 ng/25 µl) no mesmo local da incisão cirúrgica para desencadear o processo de cronificação da dor (Asiedu et al., 2011). O limiar de retirada da pata foi avaliado novamente 3h e 24h após as injeções de PGE₂.

3.7 Tratamentos farmacológicos.

Os animais receberam os diferentes tratamentos farmacológicos via intraperitoneal (i.p.) a depender do grupo experimental (Tabelas 1 e 2), no caso do **experimento 1a** foi avaliado o efeito do inibidor da FAAH (Tocris Ellisville, MO, EUA. 13279)(PF-3845, 5 mg/kg) e no **experimento 1b** foi avaliado o efeito do inibidor da MAGL (Tocris Ellisville, MO, EUA. 13158) (JZL184, 8 mg/kg). As doses desses fármacos foram baseadas em estudos prévios (Bedse et al., 2018; Sakin

et al., 2015; Sciolino *et al.*, 2011; Fernandez-Suarez *et al.*, 2014). Além disso, cabe destacar que o grupo Salina – Salina tanto para os machos como para as fêmeas foi o mesmo nos dois experimentos que foram conduzidos de forma simultânea.

Para verificação do efeito do protocolo experimental sobre as respostas comportamentais, foi adicionado um grupo controle (Naïve) (Fêmeas n = 10 e Machos n = 9) onde os animais não passaram pelo processo de cronificação da dor. Neste grupo foi avaliado ganho de peso e os comportamentos relacionados a ansiedade no LCE.

Tabela 1-Tratamento farmacológico Experimento 1a.

	Macho	Fêmea	Pós-incisão	Pós-PGE2
Quantidade	11	13	Salina	Salina
de animais	11	10	Salina	Inibidor da FAAH (PF3845, 5mg/kg)
por grupo (n)	12	12	Inibidor da FAAH (PF3845, 5mg/kg)	Salina
	11	13	Inibidor da FAAH (PF3845, 5 mg/kg)	Inibidor da FAAH (PF3845, 5mg/kg)

Fonte: criação própria.

Tabela 2-Tratamento farmacológico Experimento 1b.

	Macho	Fêmea	Pós-incisão	Pós-PGE2
Quantidade	11	13	Salina	Salina
de animais	16	13	Salina	Inibidor da MAGL (JZL184, 8 mg/kg)
por grupo (n)	13	12	Inibidor da MAGL (JZL184, 8 mg/kg)	Salina
	13	14	Inibidor da MAGL (JZL184, 8 mg/kg))	Inibidor da MAGL (JZL184, 8 mg/kg)

Fonte: criação própria.

3.8 Teste Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

O teste é reconhecido como um dos modelos eto-experimentais de ansiedade mais utilizados, focando-se na aversão natural dos roedores por espaços abertos. O desenho básico do LCE é muito similar ao originalmente apresentado em Lister (1987) e validado para camundongos por Rodgers; Johnson (1995). É composto por paredes de vidro transparente; dois braços abertos (30 × 5 × 0,25 cm) e dois braços fechados (30 × 5 × 15 cm) conectados através de uma plataforma central comum (5 × 5 cm). Todo o conjunto está a uma altura de 38,5 cm acima do nível do chão. Este modelo baseia-se na livre exploração de roedores em um ambiente novo, neste caso dois pares de zonas distintas: um par de braços potencialmente aversivos (braços abertos) e um par de braços seguros (braços fechados) (Celis; Martinez; Conde, 2010).

Os animais são colocados no centro do aparato com a cabeça voltada para um dos braços abertos e exploram livremente a plataforma por 5 minutos. Medidas espaço-temporais relacionadas ao comportamento do tipo ansioso são analisadas, consistindo nas porcentagens de frequência de entrada e tempo de permanência nos braços abertos ($[\text{aberto} / \text{total}] \times 100$) e a porcentagem de

tempo gasto no braço aberto do labirinto ($[\text{tempo no braço aberto} / 300] \times 100$), enquanto a atividade locomotora é aferida pelo número de entradas nos braços fechados. Também são quantificadas o número de entradas nos braços fechados do LCE como avaliação da resposta locomotora (Rodgers; Johnson, 1995). Todos os testes no labirinto foram feitos sob a luminosidade de 1×60 W (ou seja, 50 lux no assoalho do LCE), durante a fase de luz do ciclo claro-escuro. As sessões foram gravadas por um sistema de filmagem e posteriormente analisadas no software "X-plo-Rat 2005", desenvolvido pelo grupo de pesquisa do laboratório do Dr. Silvio Morato, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo, em Ribeirão Preto-Brasil (o software pode ser baixado livremente em <http://Scotty.FFCLRP.USP.br/X-plo-Rat.html>) (Tejada *et al.*, 2018).

3.9 Perfusão e ensaio de Imunofluorescência

Ao final dos experimentos, os camundongos foram anestesiados e perfundidos (12 ml/min) com solução salina tamponada com fosfato (PBS), seguido por paraformaldeído 4%. Os encéfalos removidos foram pós-fixados em paraformaldeído por 1h e transferidos para solução de sacarose 30% em PBS 4°C. Após 2 dias, os encéfalos foram congelados mantidos em -80°C até serem fatiados no criostato em secções coronais de 30-40 μm de espessura com a presença do complexo amidaloide (CM1900, Leica, Alemanha). Cabe ressaltar que foi feita uma marcação, com uma agulha, no lado esquerdo dos encéfalos para nos certificarmos com relação ao hemisfério que é analisado.

O protocolo de imunofluorescência foi o mesmo ao adotado pelo laboratório de Neuropsicofarmacologia da FCFAr-UNESP (Santos-Costa *et al.*, 2021). A técnica de imunohistoquímica por fluorescência foi feita após a obtenção de cortes das regiões de interesse. As fatias coronais foram lavadas 5 vezes com PBS e em seguida incubadas com solução bloqueadora - veículo (soro de cabra 10%; Triton X-100 0,3% dissolvidos em PBS) por uma hora à temperatura ambiente. Após o bloqueio, as fatias foram incubadas com o anticorpo primário de interesse (anti- ΔFosB , Cat. No. EPR15905;) em solução veículo por 24 horas a 4°C. Após essa incubação, as fatias foram lavadas com PBS por 5 vezes e incubadas com um anticorpo secundário (Alexa Fluor 488; ab150077) diluído em solução veículo, por 3 horas à temperatura ambiente. Em seguida as fatias foram lavadas com PBS por 5 vezes e transferidas para solução de PBS e montadas em lâminas gelatinizadas. Na sequência foi acrescentado de 2 a 3 gotas de Fluoroshield MountingMedium + DAPI (Sigma-Aldrich) e seladas com lamínula. A imunomarcagem foi

capturada usando uma câmera microscópica Axiocam 503 colorida (Zeiss), acoplada ao microscópio Axio Imager 2 com sistema para observação de luz visível (iluminador halógeno, 127V, 100W) e marcação epifluorescente (iluminador HXP 120V, filtros com transmitância 430-750 nm,). A quantificação da fluorescência foi realizada no software ImageJ (NIH), utilizando a técnica “Corrected total cell fluorescence”.

Nesta técnica o programa mensura a fluorescência da área definida, entretanto, a fluorescência emitida pelo fundo (background) é removida do valor final, realizado conforme descrito anteriormente (Baptista-De-Souza et al., 2020; Santos-Costa *et al.*, 2021). Os valores obtidos são uma média de 3-4 cortes de cada sujeito experimental/área.

3.10 Delineamento experimental

O protocolo experimental (Figura 1) teve início quando os animais chegaram ao biotério com aproximadamente 21 DPN. Neste momento, os animais foram distribuídos aleatoriamente aos diferentes grupos experimentais e de tratamento farmacológico (ver Tabelas 1 e 2). As medidas basais dos testes comportamentais dos camundongos machos e fêmeas foram coletadas quando os animais atingiram 60-70 dias DPN. Foram realizadas por meio do peso inicial do animal, condição da pelagem, escala facial de dor para camundongos e Teste do Von Frey.

Posteriormente (24 horas depois), foram realizadas as cirurgias da incisão plantar para o desencadeamento da primeira fase da dor (aguda), unicamente nos grupos experimentais. Após 24 horas, os animais receberam o tratamento farmacológico administrado via intraperitoneal (i.p.) de acordo com o grupo experimental ao qual o animal pertencia. Duas horas depois, foram avaliadas as respostas nociceptivas dos camundongos com o teste de Von Frey e a escala facial de dor para camundongos.

Aproximadamente 2 semanas após a intervenção, os animais foram avaliados para verificar se as latências para retirada da pata no Von Frey retomaram aos níveis basais. 24 horas após a confirmação de respostas semelhantes a aquelas observadas nas condições basais, foi feito um gatilho para desencadear a dor crônica através da injeção intraplantar de PGE₂ no mesmo local da incisão e foram realizadas as injeções sistêmicas do tratamento farmacológico 2 horas após a injeção de PGE₂. Após 3 horas da injeção de PGE₂, os animais foram submetidos novamente ao teste do Von Frey e escala facial de dor.

Vinte e quatro horas após as injeções de PGE₂, os aspectos emocionais e afetivos foram avaliados através da exposição ao LCE, do estado da pelagem e ganho de peso, seguidos pelos

testes de nocicepção Von Frey e escala facial de dor. Ao final de todos os testes, todos os animais foram submetidos à perfusão para retirada dos encéfalos

Figura 1- Protocolo experimental

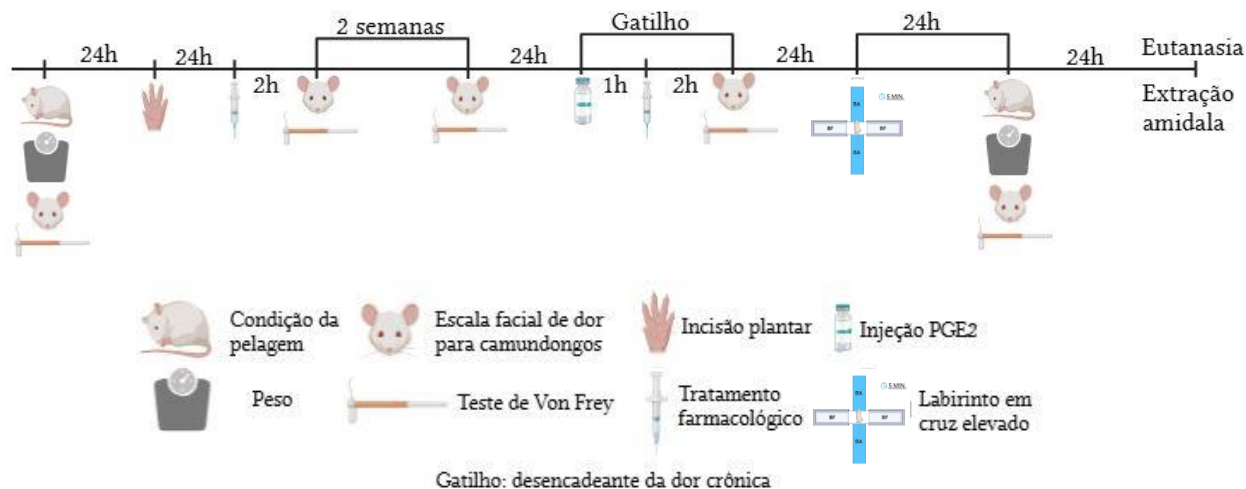


Imagem criada com BioRender.

3.11 Análise estatística

Para as medidas basais, os resultados dos testes de Von Frey e da Escala Facial de Dor em camundongos foram analisados por meio de uma análise de variância (ANOVA) de uma via. Em relação às respostas na Escala Facial de Dor e no teste de Von Frey após a incisão e Pré-PGE₂, foi aplicada uma ANOVA para medidas repetidas, considerando: Tratamento 1 (pós-incisão, F1), o tempo (F2), que foi considerado basal, pós incisão e pré-PGE₂.

Para a Escala Facial de Dor e o teste de Von Frey após a administração de PGE₂, utilizou-se uma ANOVA de dois fatores para medidas repetidas, considerando o Tratamento 1 (pós-incisão, F1) e o Tratamento 2 (pós-PGE₂, F2) no tempo (F3) em que foram consideradas 3h e 24h pós PGE₂.

Além disso, para a análise dos resultados do teste da condição da pelagem, foi utilizada a ANOVA de dois fatores para medidas repetidas a fim de avaliar os efeitos e interações do Tratamento 1 (F1) e do Tratamento 2 (F2) nas condições de tempo (F3) basal e 24 horas pós-PGE₂. Para os dados obtidos nos testes do Labirinto em cruz elevado, Ganho de peso foram submetidos à ANOVA de uma via. Por último, os dados da imunofluorescência foram submetidos a ANOVA de uma via para medidas repetidas.

Nos casos de significância, as análises foram seguidas pelo teste de comparações múltiplas de Duncan. O valor de p menor ou igual a 0,05 foi considerado como significativo. Os gráficos foram

elaborados com o software Prisma e as estatísticas com statistica. Todos os resultados das análises estatísticas estão disponíveis nos anexos.

3.12 Ética

Todos os procedimentos e protocolos experimentais foram submetidos e aprovados pelo pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FCFAr-UNESP (Protocolo: CEUA/FCF/CAR: 08/2023). Além disso, os experimentos seguiram as normas e preceitos especificados pela diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos, elaborada pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA.

4. RESULTADOS

Os resultados da análise estatística estão organizados em forma de tabelas no Anexo E (Tabelas de 3 a 10).

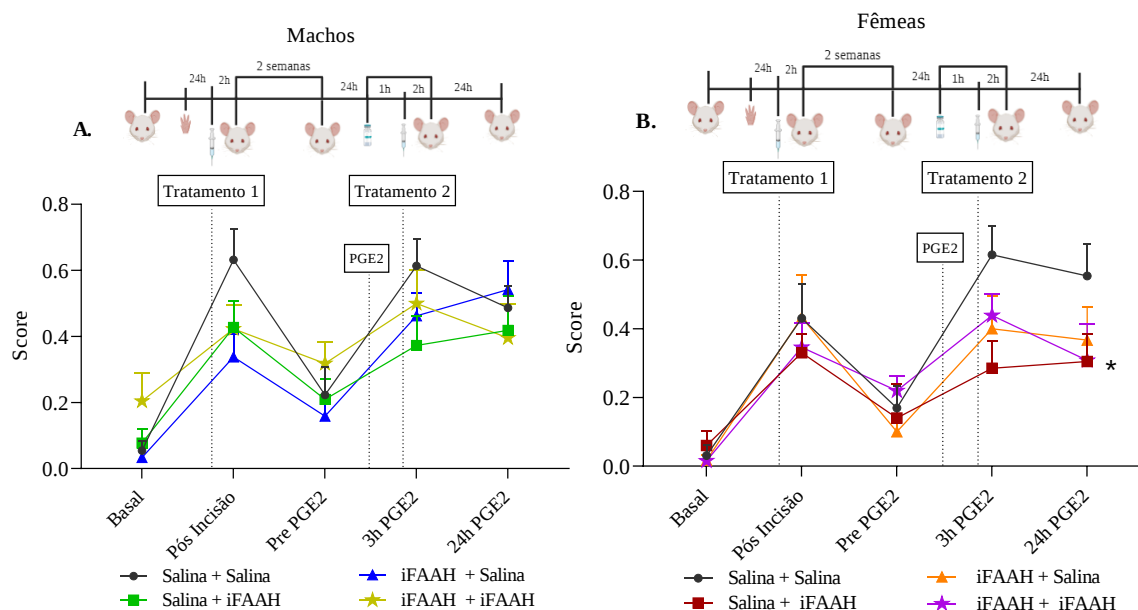
4.1 Experimento 1a. Inibidor da FAAH: PF3845 (iFAAH)

No total, foram utilizados 93 camundongos para este experimento, sendo 45 machos e 48 fêmeas

4.1.1 Avaliação da Escala facial de dor para camundongos

Na análise da Escala facial de dor para camundongos tanto os machos (Figura 2A) como as fêmeas (Figura 2B) um maior escore foi observado após a incisão independente do tratamento farmacológico, evidenciando que o modelo de hiperalgesia latente promove alterações nas respostas emocionais à dor. No caso dos machos, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos. Pelo contrário, os camundongos fêmeas do grupo Salina – iFAAH apresentaram menor escore em relação ao grupo Salina-Salina 24 horas após a PGE₂ demonstrando que o tratamento farmacológico promove diminuição das expressões faciais de dor.

Figura 2. Avaliação da expressão facial de dor exibida pela média de escores dado a cada região facial em camundongos machos (A) (n= 11-12/GRUPO) e fêmeas (B) (n= 10-13/GRUPO). As linhas representam as médias e o erro padrão da média (M+EPM). * p < 0,05 significância do grupo Salina - iFAAH em comparação com os que passaram pelos tratamentos Salina – Salina.

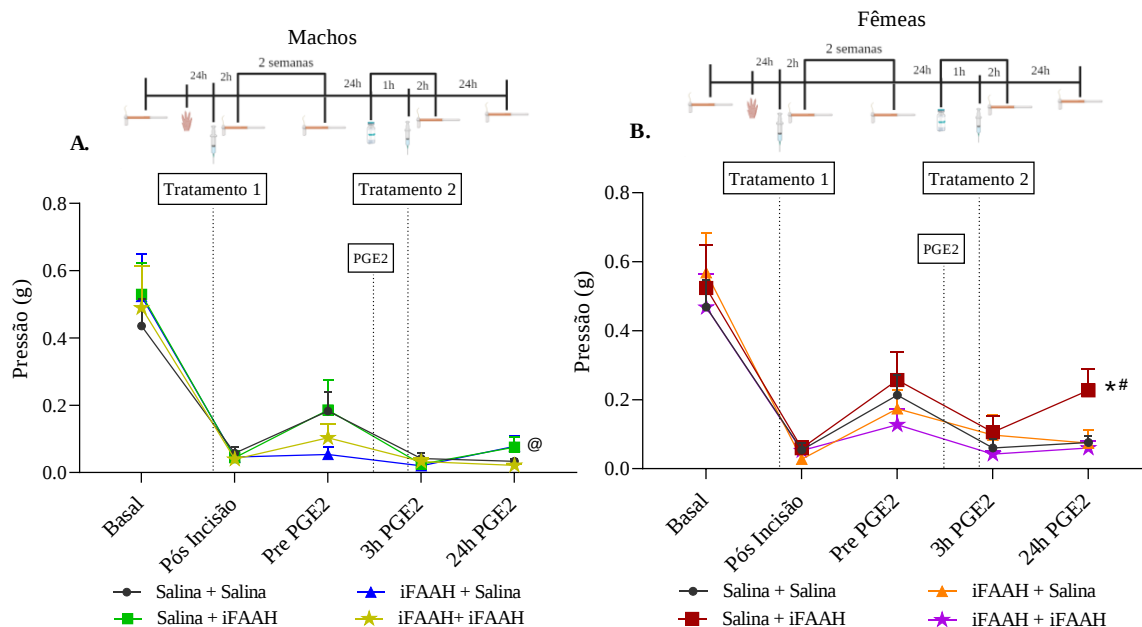


Fonte: criação própria

4.1.2 Avaliação de hiperalgesia mecânica (Teste de Von Frey)

A análise estatística da hiperalgesia mecânica no teste de Von Frey indicou uma diminuição significativa no limiar de retirada da pata em camundongos machos (Figura 3A) e fêmeas (Figura 3B) após incisão plantar, independentemente do tratamento farmacológico. Foi observada atenuação da hiperalgesia 24h após a PGE₂ quando comparados a eles mesmos 3h após a PGE₂ nos machos dos grupos Salina - iFAAH e iFAAH - Salina quando comparados nas situações de 24 horas e 3 horas. Nas fêmeas, um efeito farmacológico foi evidente no grupo Salina - iFAAH 24h após injeção de PGE₂. Essa atenuação da hiperalgesia nas fêmeas com este tratamento se assemelha aquela observada na escala facial de dor para camundongos onde houve menores escores com grupo tratado em comparação ao grupo controle.

Figura 3. Avaliação da hiperalgesia mecânica avaliada no Von Frey expressa pela pressão necessária para retirada da pata em camundongos machos (A) (n= 11-12/GRUPO) e fêmeas (B) (n= 10-13/GRUPO). As linhas representam as médias e o erro padrão da média (M+EPM). @ p < 0,05 significância dos tratamentos Salina – iFAAH e iFAAH- Salina na situação 24H comparado com eles mesmos na situação 3H. * p < 0,05 significância do grupo Sal - iFAAH em comparação ao grupo Salina – Salina e # P < 0,05 significância do grupo Salina – iFAAH em comparação ao grupo iFAAH – iFAAH.

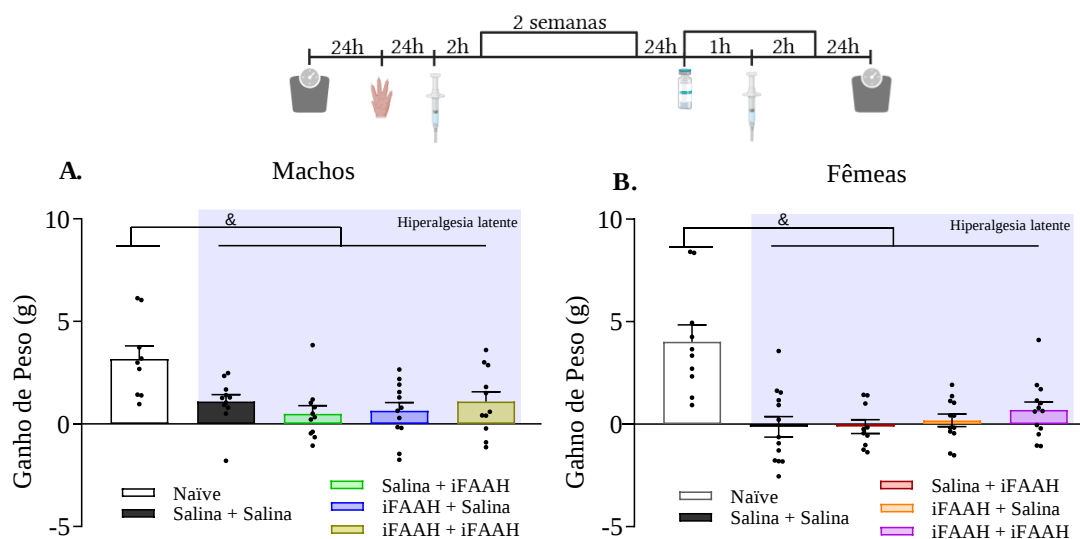


Fonte: criação própria

4.1.3 Avaliação do Ganho de Peso

O teste de ANOVA de uma via indicou diferenças significativas entre os grupos tanto para os machos (Figura 4A) como as fêmeas (Figura 4B). O Post Hoc de Duncan evidenciou uma perda de peso significativa de todos os grupos experimentais quando comparados com o grupo Naïve.

Figura 4. Avaliação do ganho de peso em camundongos machos (A) (n= 11-12/GRUPO) e fêmeas (B) (n= 10-13/GRUPO). As barras representam as médias e o erro padrão da média (M+EPM). & significância estatística entre todos os grupos experimentais em comparação ao grupo Naïve.

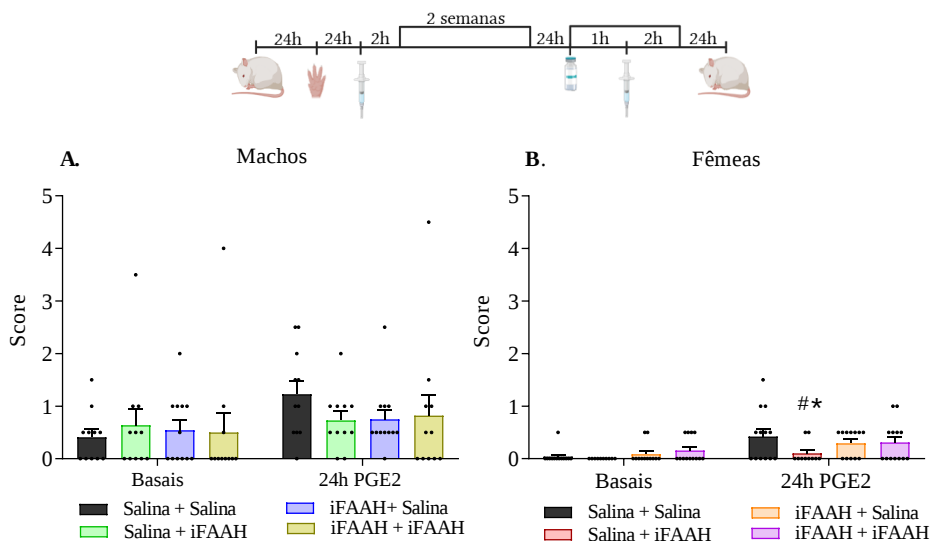


Fonte: criação própria

4.1.4 Avaliação Condição da pelagem

Para a análise da condição da pelagem foi demonstrado que tanto em camundongos machos (Figura 5A) quanto em fêmeas (Figura 5B) há efeito do tempo na condição da pelagem. Revelando que o modelo de hiperalgisia latente promove piora na condição da pelagem o que pode relacionar-se a um efeito sobre o componente emocional da dor. Mas o post hoc de Duncan revelou que apenas os camundongos fêmeas do grupo Salina - iFAAH apresentam melhor condição de pelagem em comparação com o grupo Salina - Salina e iFAAH - iFAAH e esse dado concorda com o encontrado na escala facial de dor para camundongos e no teste de Von Frey.

Figura 5. Avaliação condição da pelagem em camundongos machos (A) (n= 11-12/GRUPO) e fêmeas (B) (n= 10-13/GRUPO). As barras representam as médias e o erro padrão da média (M+EPM). * p < 0,05 significância do grupo Salina - iFAAH em comparação ao grupo Salina – Salina e # p < 0,05 do grupo Salina – iFAAH em comparação ao grupo iFAAH – iFAAH.

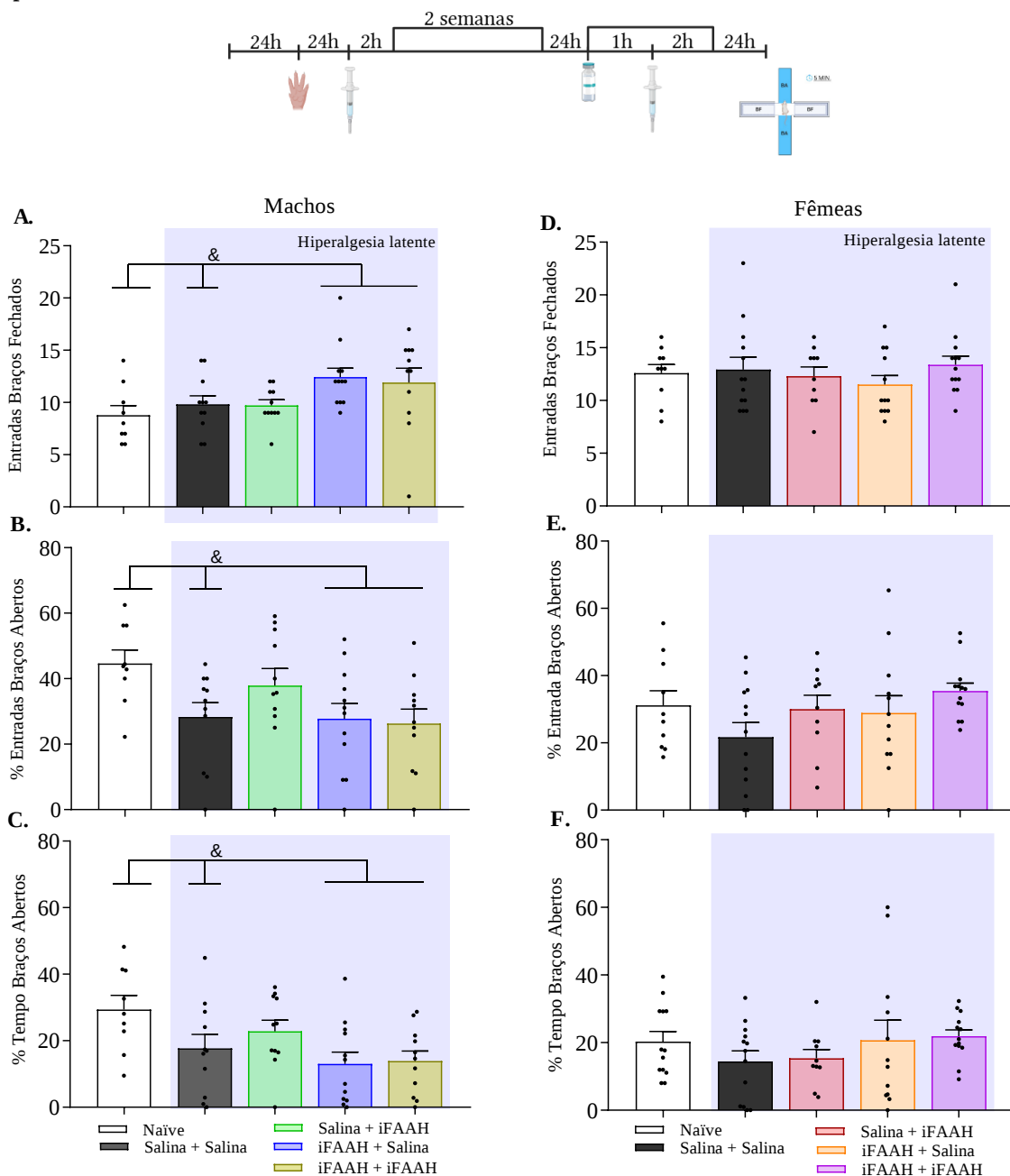


Fonte: criação própria

4.1.5 Teste Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

Para os resultados obtidos no teste do labirinto em cruz elevado, a ANOVA de uma via apontou diferenças significativas entre os grupos para a porcentagem de tempo nos braços abertos, porcentagem de entradas nos braços abertos ou entradas nos braços fechados apenas nos machos (Figura 6A), mas não nas fêmeas (Figura 6D). Para os machos nas entradas nos braços fechados (Figura 6A), o post hoc de Duncan evidenciou aumento significativo para os grupos iFAAH - Salina e iFAAH - iFAAH quando comparados com o grupo Naïve. Além disso, demonstrou uma diminuição na porcentagem de entradas aos braços abertos (Figura 6B) pelos grupos, grupos Salina-Salina, iFAAH – Salina e iFAAH – iFAAH quando comparados com o grupo Naïve. Enquanto a Porcentagem de tempo gasto nos braços abertos (Figura 6C) evidenciou uma diminuição do tempo gasto pelos grupos Salina-Salina, iFAAH – Salina e iFAAH - iFAAH quando comparados com o grupo Naïve.

Figura 6. Avaliação da exploração aos braços do labirinto em cruz elevado em camundongos machos (A) (n= 11-12/GRUPO) e fêmeas (B) (n= 10-13/GRUPO). (A e D) Representa o número de entradas nos braços fechados (EBF). (B e E) Representa a porcentagem de entradas nos braços abertos (%EBA). (C e F) Representa a porcentagem de tempo gasto nos braços abertos (%TBA). As barras representam as médias e o erro padrão da média (M+EPM). & Salina – Salina, iFAAH – Salina e iFAAH – iFAAH diferentes ao grupo Naïve



Fonte: criação própria

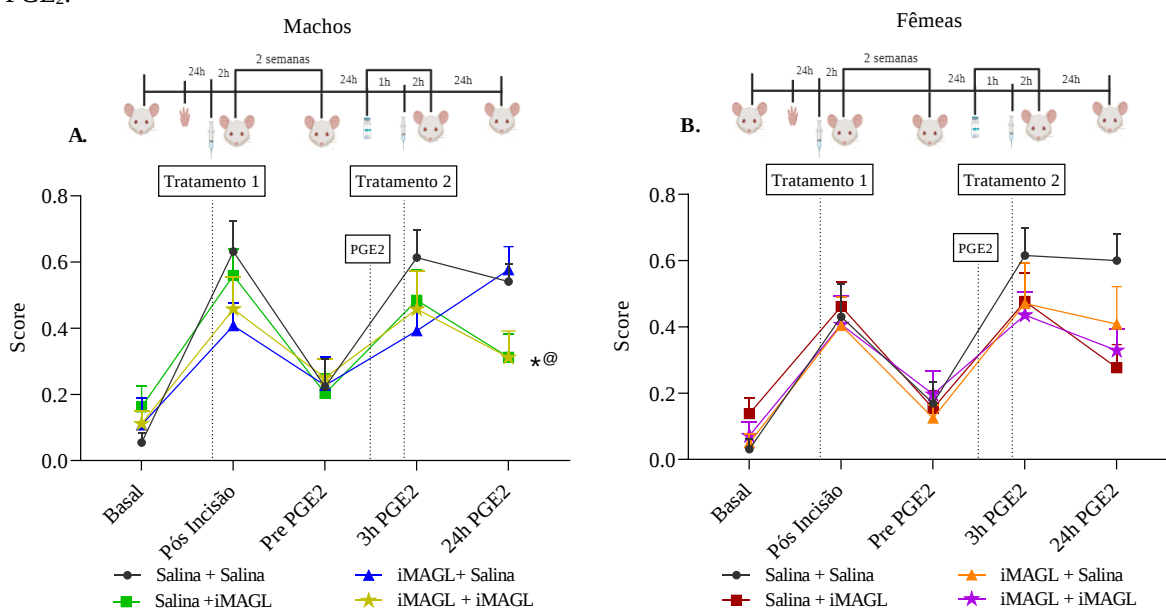
4.2 Experimento 1b. Inibidor da MAGL:JZL184 (iMAGL)

No total, foram utilizados 81 camundongos para este experimento, sendo 42 machos e 39 fêmeas.

4.2.1 Avaliação Escala facial de dor para camundongos

Na análise da Escala facial de dor para camundongos tanto os machos (Figura 7A) como as fêmeas (Figura 7B) apresentaram maiores escores para a expressão facial de dor após a incisão independente do tratamento farmacológico, evidenciando que o modelo de hiperalgesia latente promove respostas emocionais à dor. Além disso, a análise apontou para uma atenuação dos escores nos machos pertencentes ao grupo Salina – iMAGL e iMAGL – iMAGL, em comparação aos demais grupos experimentais e a eles mesmos, ao comparar a situação 24 horas com 3 horas. No caso das fêmeas, nenhuma diferença foi evidente entre os grupos experimentais.

Figura 7. Avaliação da expressão facial de dor exibida pela média de escores dado a cada região facial em camundongos machos (A) (n= 11-16/GRUPO) e fêmeas (B) (n= 12-14/GRUPO). As linhas representam as médias e o erro padrão da média (M+EPM). * $p < 0,05$ significância dos grupos Salina – iMAGL e iMAGL – iMAGL comparados com os animais que passaram pelos tratamentos Salina na Situação 24h PGE₂ (Salina – Salina e iMAGL – Salina). @ $p < 0,05$ significância dos Salina – iMAGL e iMAGL – iMAGL comparados com eles mesmos na Situação 3h PGE₂.

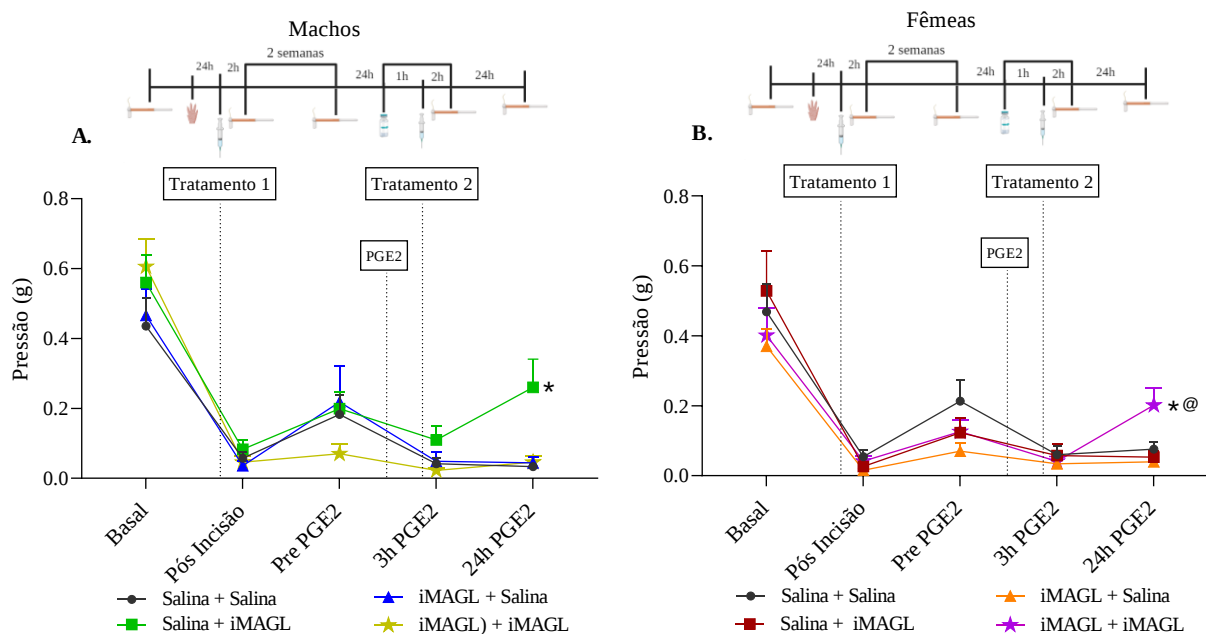


Fonte: criação própria

4.2.2 Avaliação de hiperalgesia mecânica (Teste de Von Frey)

A análise estatística da hiperalgesia mecânica no teste de Von Frey indicou uma diminuição significativa no limiar de retirada da pata em camundongos machos (Figura 8A) e fêmeas (Figura 8B) após incisão plantar. Os machos do grupo Salina – iMAGL é diferente de todos os grupos experimentais 24h depois da injeção de PGE₂. No caso das fêmeas foi evidenciado um efeito farmacológico do grupo iMAGL – iMAGL que é diferente dos outros grupos experimentais 24 horas após PGE₂ dele mesmo nos mesmos momentos.

Figura 8. Avaliação da hiperalgesia mecânica avaliada no Von Frey expressa pela pressão necessária para retirada da pata em camundongos machos (A) (n= 11-16/GRUPO) e fêmeas (B) (n= 12-14/GRUPO). As linhas representam as médias e o erro padrão da média (M+EPM). No caso dos machos * $p < 0,05$ significância do grupo Salina – iMAGL em comparação com todos os grupos experimentais. Nas fêmeas, * $p < 0,05$ significância do grupo iMAGL – iMAGL em comparação a todos os grupos experimentais grupos experimentais nas situações 3H pós PGE₂ e 24H pós PGE₂. @ $p < 0,05$ significância do grupo iMAGL – iMAGL na situação 24h PGE₂ em comparação com ele mesmo na situação 3h PGE₂.

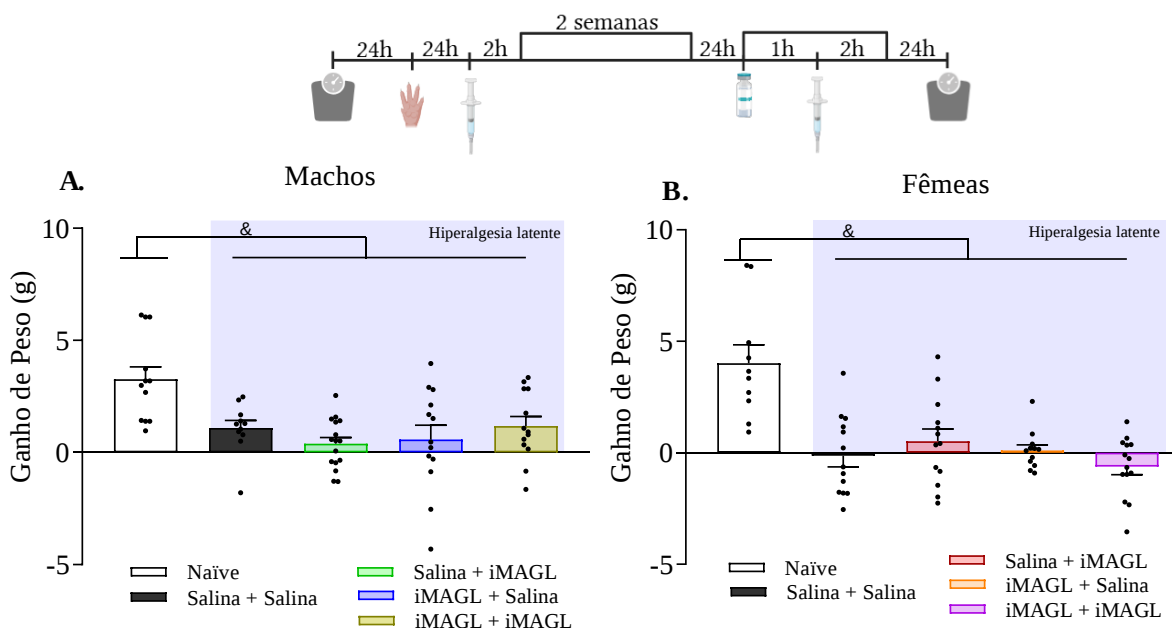


Fonte: criação própria

4.2.3 Avaliação do Ganho de Peso

A ANOVA de uma via indicou diferenças significativas entre os grupos tanto para os machos (Figura 9A) como as fêmeas (Figura 9B). O post hoc de Duncan evidenciou uma perda de peso significativa de todos os grupos experimentais quando comparados com o grupo Naïve.

Figura 9. Avaliação do ganho de peso em camundongos machos (A) (n= 11-16/GRUPO) e fêmeas (B) (n= 12-14/GRUPO). As barras representam as médias e o erro padrão da média (M+EPM). & significância de todos os grupos experimentais em comparação ao grupo Naïve.

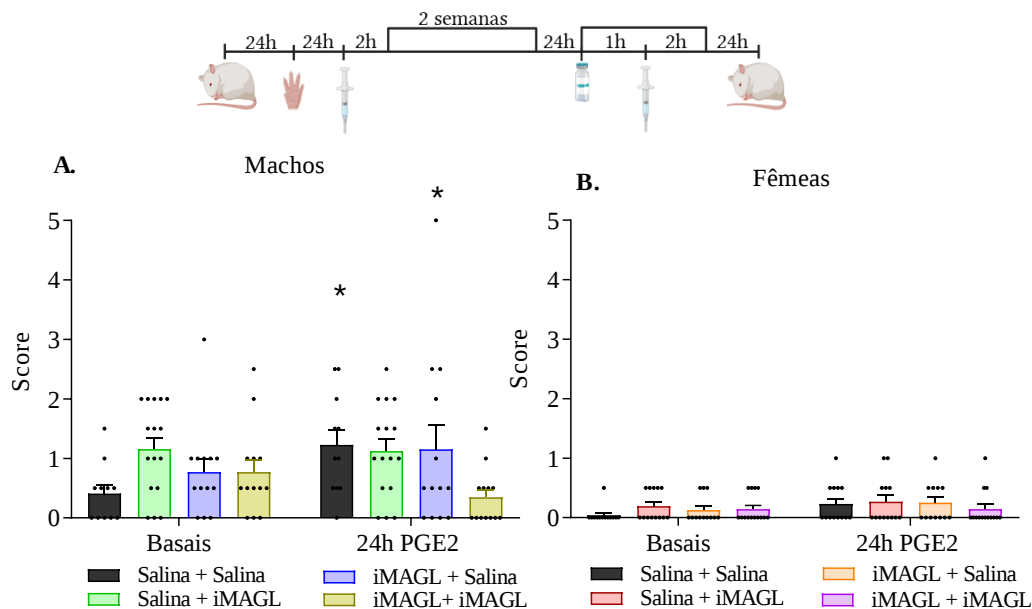


Fonte: criação própria

4.2.4 Avaliação Condição da pelagem

Para a análise da condição da pelagem o post hoc de Duncan revelou que apenas os camundongos machos (Figura 10A) dos grupos Salina – Salina e iMAGL – Salina apresentaram pontuação mais alta na condição da pelagem 24 horas após a PGE₂ quando comparados na condição basal. No caso das fêmeas (Figura 10B) não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos.

Figura 10. Avaliação condição da pelagem em camundongos machos (A) (n= 11-16/GRUPO) e fêmeas (B) (n= 12-14/GRUPO). As barras representam as médias e o erro padrão da média (M+EPM). * p < 0,05 significância dos grupos Salina – Salina e iMAGL – Salina em comparação com eles mesmos na condição basal.

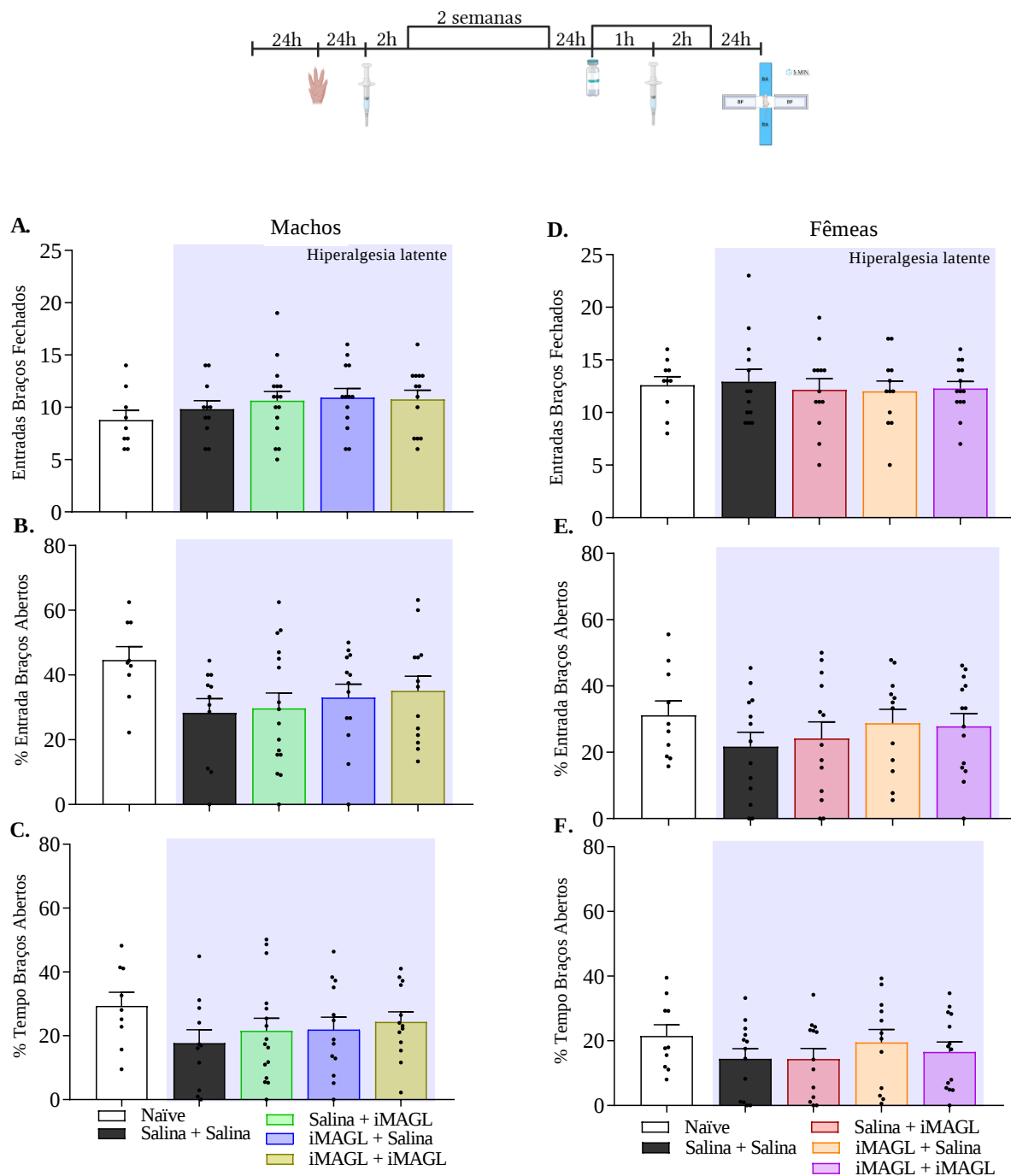


Fonte: criação própria

4.2.5 Teste Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

A ANOVA de uma via não evidenciou diferenças significativas nem para os machos (Figura 11A), nem para as fêmeas (Figura 11D) entre os grupos para a porcentagem de tempo nos braços abertos, porcentagem de entradas nos braços abertos ou entradas nos braços fechados.

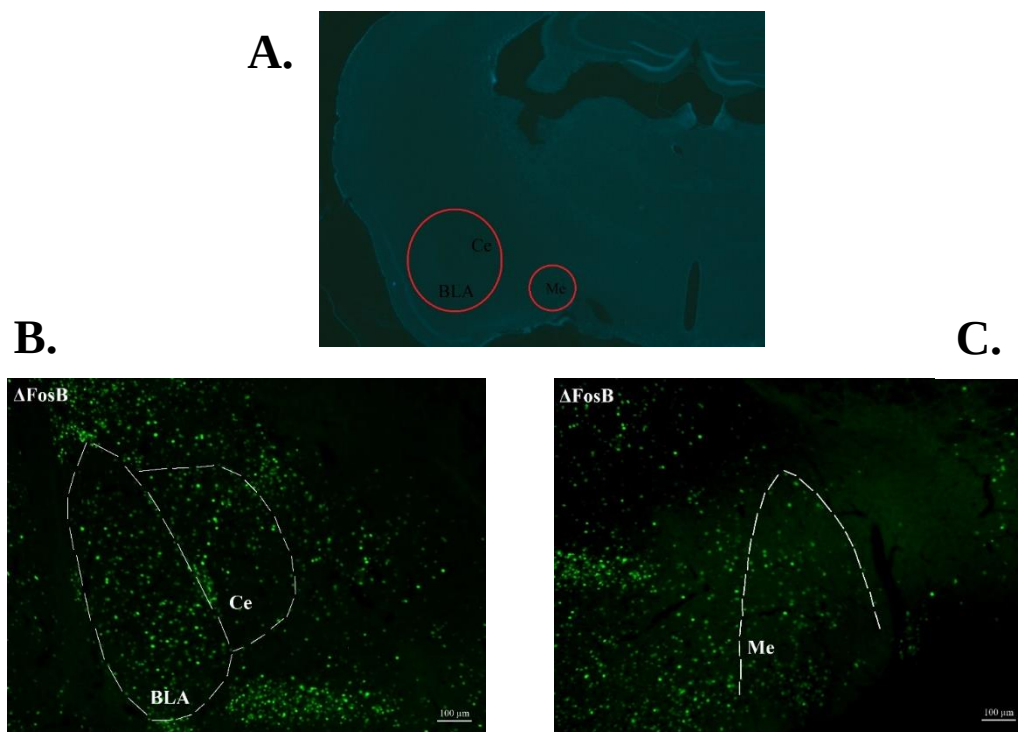
Figura 11. Avaliação da exploração aos braços do labirinto em cruz elevado em camundongos machos (n= 11-16/GRUPO) e fêmeas (n= 12-14/GRUPO). **(A e D)** Representa o número de entradas nos braços fechados (EBF). **(B e E)** Representa a porcentagem de entradas nos braços abertos(%EBA). **(C e F)** Representa a porcentagem de tempo gasto nos braços abertos (%TBA). As barras representam as médias e o erro padrão da média (M+EPM).



Fonte: criação própria

4.3 Padrão de ativação neuronal (Δ FosB) no complexo amigdalóide

Figura 12. Fotomicrografias, ampliadas 20 vezes (barra de escala = 100 μ m), que ilustram de maneira representativa a marcação neuronal positiva para Δ FosB no complexo amigdalóide (A) representa o hemisfério esquerdo do complexo amigdalóide, (B) representa os núcleos Basolateral e Central, (C) representa o núcleo Medial.

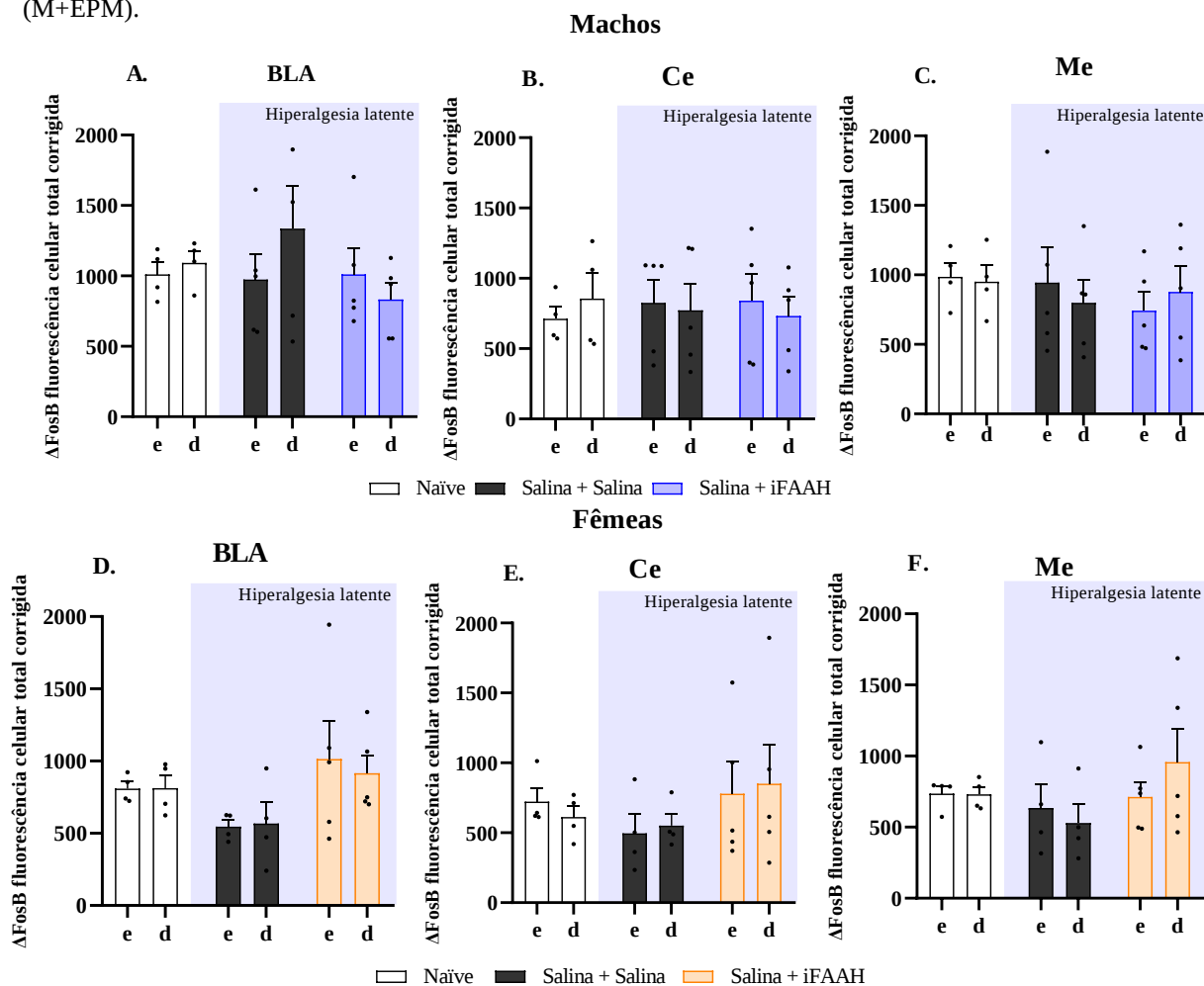


Fonte: criação própria

4.3.1 Padrão de ativação neuronal (Δ FosB) no complexo amigdalóide Experimento 1a. Inibidor da FAAH:PF3845 (iFAAH)

Na análise do padrão de ativação dos núcleos amigdalóides basolateral (BLA), central (Ce) e medial (Me) no complexo amigdalóide (Figura 12), tanto para machos (Figura 13A) quanto para fêmeas (Figura 13D), a ANOVA de uma via para medidas repetidas não indicou interação entre os fatores hemisfério e condição. Ao avaliar os efeitos individuais, também não foram encontradas diferenças significativas na condição na fluorescência celular total corrigida (FCTC) para condição ou hemisfério.

Figura 13. Efeito do processo de cronificação da dor e os tratamentos farmacológicos do experimento 1^a iFAAH na Fluorescência Celular Total Corrigida (CTCF) da expressão de Δ FosB no complexo amigdalóide em camundongos machos (n=5/GRUPO) e fêmeas (n=4-5/GRUPO) (**e**) hemisfério esquerdo, (**d**) hemisfério direito. (**A**) núcleo basolateral de camundongos machos (**D**) núcleo basolateral de camundongos fêmeas, (**B**) núcleo central de camundongos machos (**E**) núcleo central de camundongos fêmeas, (**C**) núcleo basolateral de camundongos machos (**F**) núcleo basolateral de camundongos fêmeas. As barras representam as médias e o erro padrão da média (M+EPM).



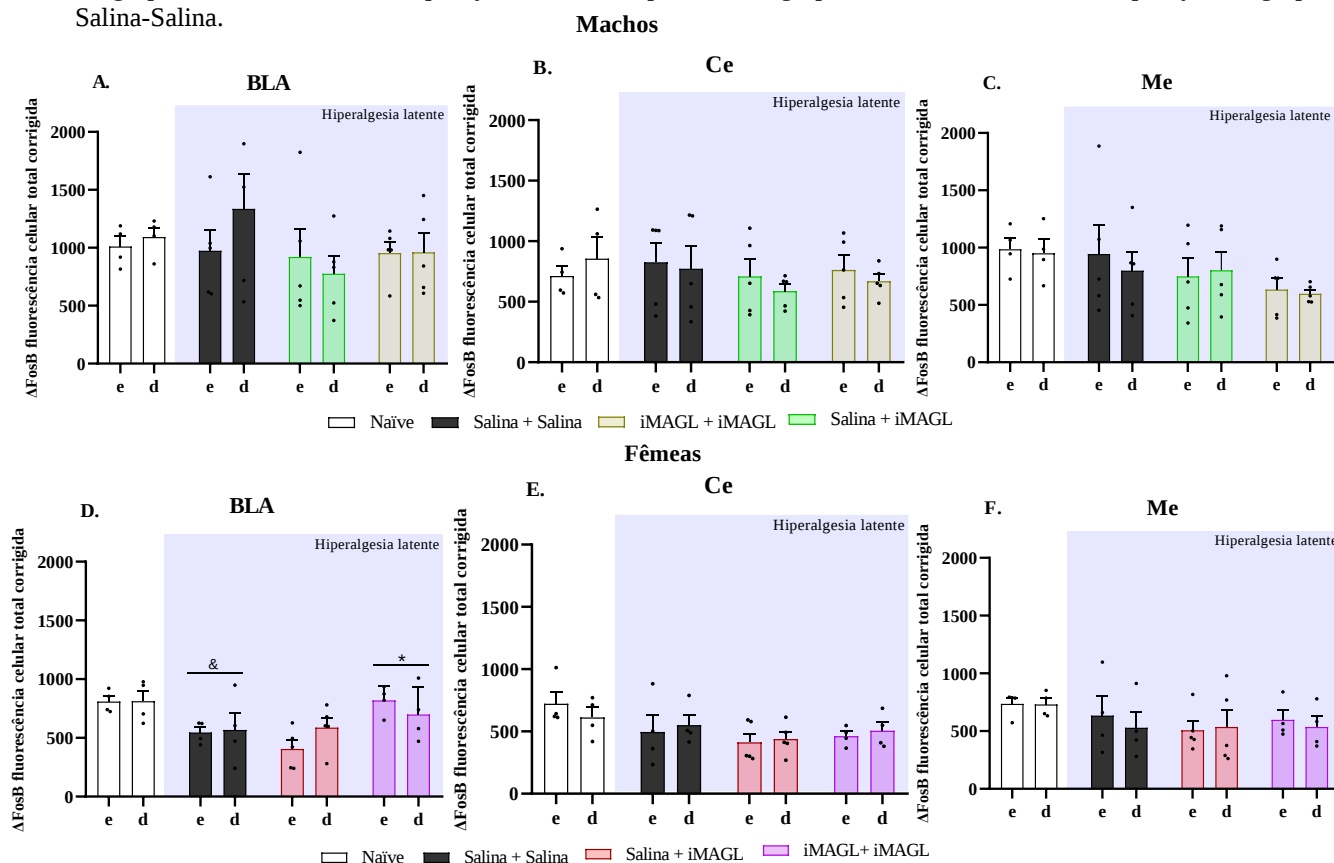
Fonte: criação própria

4.3.2 Padrão de ativação neuronal (Δ FosB) no complexo amigdalóide Experimento 1b. Inibidor da MAGL: JZL184 (iMAGL)

Na análise do padrão de ativação dos núcleos amigdalóides basolateral (BLA), central (Ce) e medial (Me) no complexo amigdalóide (Figura 12), tanto para machos (Figura 14A) quanto para fêmeas (Figura 14D), a ANOVA de uma via para medidas repetidas não indicou interação entre os fatores hemisfério e condição. Ao avaliar os efeitos individuais, também não foram encontradas diferenças significativas na da condição na fluorescência celular total corrigida

(CTCF) para condição ou hemisfério. Em relação aos fatores principais, nas fêmeas foi evidenciado um efeito significativo para Δ FosB na BLA. O teste post-hoc de Duncan mostrou aumento significativo na CTCF das condições iMagl – iMagl e Naïve em comparação com as condições Salina-Salina e Salina- iMagl. No padrão de ativação do Ce e Me, tanto para machos quanto para fêmeas, a ANOVA de uma via para medidas repetidas não indicou interação entre os fatores hemisfério e condição.

Figura 14. Efeito do processo de cronificação da dor e os tratamentos farmacológicos do experimento 1b na Fluorescência Celular Total Corrigida (CTCF) no complexo amidoide em camundongos machos (n=5/GRUPO) e Fêmeas (n=4-5/GRUPO) (e) hemisfério esquerdo, (d) hemisfério direito. (A) núcleo basolateral de camundongos machos (D) núcleo basolateral de camundongos fêmeas, (B) núcleo central de camundongos machos (E) núcleo central de camundongos fêmeas, (C) núcleo basolateral de camundongos machos (F) núcleo basolateral de camundongos fêmeas. As barras representam as médias e o erro padrão da média (M+EPM). & p <0.05 significância do grupo Salina-Salina em comparação ao Naïve. *p <0.05 do grupo iMAGL-iMAGL em comparação ao grupo Salina-Salina.



Fonte: criação própria

5. DISCUSSÃO

Os dados apresentados neste trabalho indicam que o protocolo de Hiperalgesia latente é capaz de promover alterações sensoriais e emocionais em camundongos machos e fêmeas. Além disso, também demonstramos que o tratamento com PF3845 (inibidor da FAAH) promove redução da expressão facial de dor e melhora da qualidade da pelagem apenas nas fêmeas, enquanto há redução da hiperalgesia mecânica em ambos os sexos. Para os dados com o JZL184 (inibidor da MAGL), observamos que o tratamento atenuou a expressão facial de dor apenas nos machos e reduziu a hiperalgesia mecânica em machos e fêmeas. Em relação a ativação do complexo amigdalóide, apenas fêmeas Salina-Salina do experimento 1b apresentaram diminuição da expressão de Δ FosB no núcleo basolateral em comparação as fêmeas do grupo controle e as fêmeas tratadas com JZL184 (pós incisão e pós PGE₂) apresentaram aumento da ativação em comparação ao grupo salina-salina.

A hiperalgesia é definida como uma resposta intensificada a um estímulo doloroso (Meeker *et al.*, 2021). Este fenômeno representa a modificação da maneira como o corpo gera e processa sinais de dor, resultando em redução do limiar de dor e aumento da sensibilidade aos estímulos dolorosos. Em modelos animais, uma das maneiras de avaliar respostas nociceptivas é utilizando os microfilamentos no teste de Von Frey, que possuem uma força calibrada aplicada a uma parte do corpo do animal, neste estudo, especificamente a pata traseira direita (onde foi realizada a incisão e injetada a PGE₂). Dessa forma, é possível avaliar a sensibilidade nociceptiva mecânica (Mcmackin *et al.*, 2016). Além disso, dados publicados pelo nosso grupo de pesquisa demonstraram que no modelo de hiperalgesia latente é possível evidenciar respostas sexualmente diversas como consequência de manipulações farmacológica, os autores por meio de uma microinjeção de pep2m intra-BLA acharam supressão na hipersensibilidade mecânica e respostas afetivas, tanto em machos quanto em fêmeas. Além disso, observou-se um aumento na expressão de aPKC na BLA apenas em machos, o que apoia a hipótese de que os mecanismos moleculares nesta região podem variar entre os sexos (Baptista-De-Souza *et al.*, 2020).

Diferentes achados da literatura sugerem que os inibidores de FAAH (PF3845) e MAGL (JZL184) diminuem os estados nociceptivos associados à lesão neuronal através de diversos mecanismos de ação, incluindo ações sobre os receptores canabinóides (Desroches *et al.*, 2014; Naguib *et al.*, 2012). No entanto, muitos estudos são inconclusivos quanto à contribuição específica de cada receptor canabinoide para os efeitos antinociceptivos dos endocanabinóides (Chang *et al.*, 2006; Russo *et al.*, 2007). Parece que ambos os receptores canabinóides são

essenciais para que os inibidores de FAAH tenham efeito, enquanto as ações dos inibidores de MAGL são mediadas apenas por um mecanismo de ação CB₁, sugerindo que os receptores CB₂ não são necessários para os efeitos antinociceptivos do 2-AG. (Caprioli *et al.*, 2012; Chang *et al.*, 2006; Gattinoni *et al.*, 2010). No entanto, na pesquisa de Desroches e colaboradores (2014), os autores concluem que tanto os receptores CB₁ quanto CB₂ são necessários para os efeitos anti-hiperalgésicos periféricos, enquanto apenas os receptores CB₂ são necessários para os efeitos anti-alodínicos. Além disso, já foi constatado que 85% da hidrólise total de 2-AG no cérebro é mediado por outro inibidor importante, MAGL (Blankman; Simon; Cravatt, 2007).

Os dados obtidos neste estudo fornecem informações valiosas sobre os efeitos dos inibidores de FAAH (PF3845) e MAGL (JZL184) na modulação da dor em camundongos, além de destacar a presença de dimorfismo sexual nas respostas à nociceptivas e um papel potencial do sistema endocanabinoide como modulador analgésico. No experimento **1a**, observamos que as fêmeas do grupo experimental Salina - FAAH (PF3845) apresentaram atenuação significativa da resposta dolorosa tanto no componente afetivo da dor (Escala de Dor Facial para camundongos) quanto no componente sensorial (hiperalgesia mecânica no Teste de Von Frey) depois da injeção de PGE₂. Em contraste, nos machos não foram observadas alterações nas respostas afetivas, entretanto os grupos Salina – FAAH (PF3845) e FAAH (PF3845) - Salina apresentaram maior limiar de retirada da pata na avaliação de hiperalgesia mecânica. Isso sugere que o tratamento parece influenciar as respostas sensoriais independentemente do momento de sua administração e do sexo do animal.

Com os presentes resultados, podemos acrescentar novas evidências sobre o efeito do inibidor de FAAH (PF3845) na modulação da nocicepção. Neste sentido, Woyach e colaboradores, (2022), demonstraram que a administração sistêmica deste inibidor em ratos e ratas Sprague-Dawley atenua a hiperalgesia neuropática, entretanto sem induzir diferenças sexuais nesta resposta. Esses dados diferem dos nossos achados, nos quais observamos diferenças sexuais, enquanto corroboram o papel analgésico do tratamento. Em outro estudo, num modelo de dor crônica associada à osteoporose em ratos machos Wistar, observou-se a redução da hiperalgesia e da alodinia mecânica (Kędziora *et al.*, 2023), reforçando as evidências do potencial analgésico do PF3845.

É importante mencionar que, em nosso estudo, foi observado um efeito após a injeção de PGE₂, o que nos leva à hipótese de que esse efeito de atenuação das respostas dolorosas esteja relacionado à dor crônica em ambos os sexos, provavelmente devido à ação prolongada do inibidor, uma vez

que se demonstrou que seu pico de efeito ocorre 24 horas após a administração (Ahn et al., 2009). No entanto, em camundongos machos, observamos que, administrado depois da PGE₂, o inibidor também diminui as respostas dolorosas. Até o momento, não foram encontrados estudos que utilizem um modelo de Hiperalgesia latente para comparar esse efeito farmacológico, entretanto pesquisas relacionadas à dor inflamatória identificaram uma redução parcial da alodinia em camundongos C57BL/6 induzida por LPS (Lipopolysaccharide-induced), sugerindo que o FAAH no sistema nervoso periférico modula a dor inflamatória e provavelmente o efeito encontrado esteja relacionado a dor inflamatória (Booker et al., 2012). Outro exemplo desta modulação sobre o processo inflamatório foi demonstrado em um experimento *in vitro* sobre a supressão da FAAH sobre a prostaglandina E2 e a expressão de genes pró-inflamatórios (Tanaka et al., 2019).

Com estes resultados, é importante levar em consideração a via de administração do tratamento farmacológico como variável no estudo da dor. A realização de uma administração focal onde não estão presentes efeitos do tratamento sistêmico poderia nos permitir encontrar efeitos mais robustos contra a atenuação das respostas à dor (Woyach et al., 2022).

No experimento **1b**, as fêmeas na condição experimental iMAGL – iMAGL também exibiram um maior limiar de retirada da pata na avaliação de hiperalgesia mecânica, indicando uma atenuação da resposta dolorosa, embora não tenha sido observada qualquer diferença significativa na escala facial de dor. Para os machos, os grupos experimentais que receberam o tratamento farmacológico do iMAGL após PGE₂ foram observados uma atenuação nas respostas afetivas da dor, consistente com os dados do Teste de Von Frey, onde os machos na condição Salina – iMAGL apresentaram um maior limiar de retirada da pata.

São escassas as evidências na literatura sobre os efeitos de diferentes tratamentos farmacológicos utilizando este tipo de protocolo, o que já mostra a necessidade de um número maior de pesquisas, particularmente em sujeitos experimentais fêmeas. Cabe destacar que, na investigação realizada por Ghosh e colaboradores (2013), utilizando um modelo prolongado de nocicepção inflamatória utilizando carragenina, foram observadas redução do edema na pata de camundongos C57BL/6 e da alodinia mecânica, utilizando-se a administração de JZL184 (inibidor de MAGL) antes ou depois da carragenina, neste trabalho, embora os autores tenham utilizados machos e fêmeas não relataram diferença em relação ao sexo, porém esses dados fortalecem o potencial analgésico do inibidor. Além disso, este efeito analgésico ficou evidente antes da injeção

de carragenina e 3 horas depois, levando à hipótese de que, assim como a FAAH, o sistema endocanabinoide pode estar modulando principalmente a dor inflamatória.

Cabe destacar que em nossos achados, observamos dimorfismo sexual no efeito farmacológico sobre a nocicepção, uma vez que as fêmeas necessitaram de tratamento do inibidor de MAGL (JZL184) nos dois momentos para apresentar atenuação das respostas dolorosas em comparação aos machos, onde foi encontrado efeito após a injeção de PGE₂, é provável que esta diferença seja devido ao dimorfismo sexual do sistema endocanabinoide.

Neste sentido, na revisão de Blanton e colaboradores (2021) é mencionado que a administração local de SR144528, um antagonista seletivo do receptor CB₂, apresenta um bloqueio parcial nos efeitos antinociceptivas em homens, mas não em mulheres, porém mais estudos são necessários para elucidar as diferenças sexuais na expressão do CB₂, e isso levaria a hipóteses da existência de uma maior quantidade do receptor em algum dos dois sexos. Por outro lado, dados com os efeitos da inibição do MAGL com camundongos machos DBA/1J no modelo de artrite induzida por colágeno apresentaram inconclusão em relação à hiperalgesia e alodinia, os autores não utilizaram fêmeas, já que não respondem a esse tipo de modelo, mas a combinação do inibidor com um tratamento anti-inflamatório mostrou efeito na redução da inflamação (Nass et al., 2021).

Estes dados permitem demonstrar o potencial analgésico do inibidor MAGL (JZL184) num modelo de dor crônica e não apenas o seu efeito na inflamação como já mencionado. Além disso, é necessário levar em consideração algumas variáveis que podem afetar os resultados como tolerância à dose, o uso de doses altas e repetidas gera tolerância e dependência física em comparação com doses baixas, mas repetidas (Nass et al., 2021; Ghosh et al., 2013). Também seria importante avaliar a influência do processo inflamatório sobre a modulação nociceptiva, já que algumas ações do inibidor JZL184 poderiam ser geradas dentro do gânglio da raiz dorsal ou corno dorsal da medula espinhal (Ghosh *et al.*, 2013).

Esses resultados coletivamente sugerem que os inibidores de FAAH (PF3845) e MAGL (JZL184) têm potencial terapêutico na modulação da dor, com efeitos variados para diferentes sexos e tipos de dor e são consistentes com a literatura, que indica que os inibidores de FAAH e MAGL reduzem os estados de hiperalgesia especialmente aqueles associados a lesões nervosas (Caprioli *et al.*, 2012; Gattinoni *et al.*, 2010). Adicionalmente, a variabilidade nas respostas entre machos e fêmeas destaca a importância de considerar o sexo como uma variável biológica significativa nos estudos de fármacos com potenciais analgésicos. Há que se destacar, contudo,

ainda são poucas as evidências da literatura sobre os efeitos da inibição da MAGL sobre a nocicepção em comparação a maior quantidade de estudos que investigaram o papel da inibição da FAAH (Ghosh et al., 2013). Desta forma, os dados obtidos neste estudo buscam colaborar com a ampliação do conhecimento sobre os efeitos de manipulações na neurotransmissão endocanabinoide sobre a nocicepção de modo mais amplo.

Outro aspecto importante é mencionado na revisão de Ren e colaboradores., (2020), onde apenas a inibição de FAAH ou MAGL é incapaz de induzir um espectro completo de todos os seus efeitos em doenças neuropsiquiátricas e neurodegenerativas, razão para que atualmente a dupla inibição de FAAH/MAGL tem sido o foco de novas pesquisas. Além disso, diferentes autores propõem que alguns dos efeitos farmacológicos dos inibidores duplos de FAAH/MAGL são mais pronunciados do que a inibição completa de FAAH ou MAGL de modo isolado (Sakin; Tanoğlu; Gülşen, 2018). Com isso, novos estudos com a inibição dupla das enzimas no processo de Hiperalgesia latente podem esclarecer ainda mais a participação de inibidores do sistema endocanabinoide.

Em nossos experimentos **1a** e **1b**, tanto para machos quanto para fêmeas, não foram observados efeitos significativos relacionados ao tratamento farmacológico para o ganho de peso. No entanto, ao avaliar o ganho de peso do grupo que não foi submetido ao modelo de hiperalgesia latente com os demais grupos experimentais, pode-se notar o efeito do protocolo experimental em prejudicar o ganho de peso.

Cabe destacar que são escassas as investigações que utilizam o ganho de peso como um teste para caracterizar comportamentos do tipo depressivo em animais submetidos a protocolos relacionados à dor. No entanto, no modelo de neuropatia periférica induzida por quimioterapia, foi observado que os camundongos BALB/C perderam peso corporal durante o protocolo experimental (Lv et al., 2022), o que está em concordância com os nossos dados, onde todos os animais ganharam menos peso após o início do processo de cronificação da dor. Com isso, podemos sugerir que os estados de dor crônica atuam como estressores potentes, capazes de alterar respostas comportamentais relacionadas à anedonia.

A ausência de efeito dos tratamentos farmacológicos no ganho de peso, pode indicar que esses fármacos não atuam sobre os mecanismos subjacentes ao comportamento alimentar alterado por estados depressivos induzidos pela dor crônica. Além disso, é possível que, como os mecanismos neurobiológicos da depressão e da dor ainda não estão totalmente descritos, seja necessário

considerar outras variáveis, para os comportamentos do tipo depressivo, dependendo do modelo animal utilizado (lesão nervosa preservada, ligadura parcial do nervo ciático ou constrição crônica), poderiam demorar entre 2-7 semanas para serem evidenciados no teste de nado forçado (Li, 2015). Esta evidência pode indicar que possivelmente seja necessário mais tempo após a indução do quadro de dor crônica (pós PGE₂) para avaliar adequadamente os comportamentos do tipo depressivo.

Avaliamos também as respostas relacionadas à ansiedade utilizando o teste do labirinto em cruz elevado (LCE), um método amplamente empregado para analisar os efeitos de substâncias que interferem na ansiedade (Walf; Frye, 2007). Nossos dados revelaram efeitos significativos unicamente nos machos do experimento **1a** ao comparar o grupo controle sem dor (Naïve) com os demais grupos experimentais, no caso da porcentagem no tempo e entradas nos braços abertos os grupos Salina – Salina, iFAAH-Salina e iFAAH- iFAAH apresentam uma diminuição e na entrada nos braços fechado os grupos iFAAH -Salina e iFAAH - iFAAH aumento da exploração.

Cabe destacar que tal qual mencionado sobre os comportamentos relacionados a depressão, a literatura atual conta com poucos dados relacionados ao comportamento do tipo ansioso no processo de cronificação da dor. Porém, uma investigação de dor neuropática por ligadura parcial do nervo ciático em ratos Wistar machos constatou que, após 4 semanas de ligadura, os animais diminuíram o tempo no centro e nos braços abertos do LCE, mas isso não ficou evidente duas semanas após a cirurgia (Dang *et al.*, 2024). É relevante mencionar este achado já que observamos com o grupo Salina-Salina uma diminuição na porcentagem nas entradas e tempo nos braços abertos, assim podemos considerar que possivelmente o tempo seja uma variável importante para podermos ver com mais clareza o comportamento do tipo ansioso em modelos animais com dor, principalmente devido ao fato de que a interação entre a progressão da dor e da ansiedade e os seus mecanismos subjacentes ainda não estão claramente descritos.

Por outro lado, a pesquisa de Sieberg *et al.*, (2018), com o modelo de dor neuropática induzida por quadro de diabetes em camundongos C57BL/6 machos e fêmeas, avaliou o comportamento do tipo ansioso no LCE, encontrando que os animais ficavam menos tempo no braço aberto antes da cirurgia, dados semelhantes aos observados no presente estudo em relação aos grupos iFAAH-Salina e iFAAH - iFAAH, mas, cabe destacar que neste estudo foi utilizado um protocolo de estresse contínuo antes de induzir a dor, e não apenas o efeito da dor sobre as respostas relacionadas à ansiedade. Além disso, a resposta comportamental foi observada nas fêmeas, em nosso caso foi

nos machos, o que os leva a hipóteses de que esse efeito poderia ser pelo tipo de modelo utilizado para avaliar a dor.

Complementarmente, no estudo de Ferdousi e colaboradores (2023), com o modelo adjuvante completo de Freund de dor inflamatória crônica nenhuma das duas linhagens de ratos machos Wistar Kyoto e Sprague Dawley apresentou comportamento semelhante ao da ansiedade, o que mostra que esse modelo de dor não nos permite caracterizar o comportamento do tipo ansioso. Estes achados apontam para a complexidade de avaliar o comportamento ansioso e a dor, pois dependendo do modelo os resultados são variados como também pode ser evidenciado na presente pesquisa.

Quanto ao efeito do tratamento farmacológico, observamos que o comportamento do grupo Salina - iFAAH tratamento que atenuou a hiperalgesia, não difere das respostas observadas no grupo Naïve o que nos poderia indicar um potencial ansiolítico deste fármaco. Entretanto, considerando que os efeitos observados nesse grupo também não diferem estatisticamente do grupo Salina-Salina, novos experimentos são necessários para confirmar esse potencial ansiolítico. Cabe ainda destacar que na pesquisa de Greco e colaboradores (2021), onde o inibidor duplo FAAH-MAGL (JZL195) foi utilizado em modelo de enxaqueca em ratos machos Sprague-Dawley, os autores não encontraram nenhuma ação ansiolítica do inibidor no teste de campo aberto e mencionam que pode ser devido à dose, ao momento em que o teste é implementado, e aos níveis de endocanabinoides basais em determinadas regiões cerebrais.

Além disso, no estudo realizado por Duang e colaboradores (2017) em que foi utilizado o estresse como variável, o inibidor da FAAH (PF3845) exerceu efeito ansiolítico em camundongos C57BL/6J machos no LCE e no campo aberto, evidenciando uma relação entre estresse e ansiedade, neste caso os autores mencionam que a utilização do inibidor tem como vantagem a ausência de efeitos indesejados, mas os mecanismos ansiolíticos ainda não estão claros. Outro exemplo da relação entre ansiedade e inibidores é a pesquisa de Pavón e colaboradores (2021), no qual foram encontrados efeitos ansiolíticos robustos em camundongos machos C57BL/6J ao avaliar comportamentos de enfrentamento semelhantes à ansiedade induzida por estresse por meio de suspensão pela cauda, nado forçado e LCE, os autores utilizaram os testes como estímulo estressor para avaliar o efeito do inibidor, constatando que o inibidor duplo JZL195 apresentou efeito ansiolítico no LCE e não nos demais testes. Tais dados apontam para a necessidade de outros

estudos com inibição dupla para avaliar efeitos em relação ao comportamento do tipo ansioso em roedores.

Apesar da aparente simplicidade do labirinto em cruz elevado, vários fatores influenciam o comportamento dos animais submetidos a este teste, como sexo, estado nutricional, horário do dia, manejo dos animais, ruído ambiental e iluminação da sala experimental (Morato, 2006). O momento em que o comportamento do tipo ansioso é avaliado também deve ser levado em consideração. Por exemplo, Ferdousi e colaboradores (2023) utilizaram o teste LCE 13 dias após a injeção do adjuvante completo de Freund e o comportamento do tipo ansioso não foi evidente, neste estudo os autores descrevem que podem ser necessárias 3 a 4 semanas após o estímulo doloroso ter sido iniciado para que sejam detectadas alterações nas respostas relacionadas à ansiedade.

Tomados em conjunto, a maior parte destes estudos aponta que os inibidores FAAH e MAGL previnem comportamentos semelhantes à ansiedade induzidos pelo estresse e não pela dor, apresentando uma limitação sobre quais mecanismos estariam relacionados a esta resposta (Ren *et al.*, 2020). Além disso, é importante considerar variáveis como o intervalo entre os testes, o sexo e a linhagem dos roedores, já que esses fatores podem influenciar a relação entre dor e ansiedade. Além disso, os mecanismos subjacentes à ansiedade induzida por doenças crônicas dificultam a compreensão de como um tratamento farmacológico pode afetar as respostas de ansiedade. Grande parte da literatura atual foca-se no estresse, o que evidencia uma lacuna em nosso entendimento sobre os mecanismos de progressão da dor e da ansiedade. Contudo, os dados obtidos nesta investigação fornecem uma primeira abordagem sobre a relação entre dor e ansiedade e os efeitos da acentuação da neurotransmissão endocanabinoide considerando o dimorfismo sexual.

Em relação à conduta apática, definida como uma "deficiência no comportamento direcionado a objetivos" (Planchez, Surget & Belzung, 2019) e avaliada com base na condição da pelagem, onde uma pontuação geral mais alta reflete piores condições da pelagem, observou-se no Experimento 1a tanto fêmeas quanto machos apresentaram deterioração na qualidade da pelagem devido ao protocolo experimental. No entanto, apenas as fêmeas tratadas com Salina – iFAAH mostraram uma melhor qualidade da pelagem em comparação com o grupo Salina-Salina e iFAAH – iFAAH. Esses resultados sugerem a presença de um dimorfismo sexual relacionado ao sistema endocanabinoide e que o tratamento farmacológico pode influenciar comportamentos associados à apatia.

Até o momento, não foram encontrados protocolos na literatura que utilizem a condição da pelagem para avaliar comportamentos semelhantes à depressão em processos de cronificação da dor. Entretanto, a investigação de Rácz e colaboradores (2015), que utilizou o modelo de ligadura parcial do nervo ciático para induzir dor em ratos machos geneticamente modificados com a eliminação do receptor CB₁, apontou que, através do teste de preferência à sacarose, observou-se diminuição da preferência dos animais pela sacarose. Isso indica que a ausência do receptor torna os sujeitos experimentais mais suscetíveis à dor, levando os autores a concluir que o CB₁ desempenha um papel significativo nos comportamentos afetivos relacionados à dor.

Também tem sido apontado que os comportamentos relacionados a depressão induzidos pelo estresse são atenuados quando os animais são tratados com um inibidor da FAAH (Jiang *et al.*, 2019), mas ainda não está claro se o mesmo efeito é obtido quando em protocolos experimentais de dor. Desta forma, com dados em ratos Wistar machos que sofreram constrição crônica do nervo ciático, foi observado efeito de atenuação de respostas relacionadas à depressão com o inibidor URB597, porém, os autores associam isso ao processo de neurogênese no hipocampo (Jiang *et al.*, 2019). Entretanto nossos dados divergem em parte os encontrados por este estudo, pois não encontramos nenhum efeito nos machos, mas sim nas fêmeas, o que nos leva a sugerir que existe um possível efeito antidepressivo do inibidor nas fêmeas, embora sejam necessárias mais investigações relacionadas a dor e a avaliação de comportamentos relacionados a depressão para maior entendimento dos efeitos deste tratamento farmacológico.

No Experimento **1b**, os machos exibiram deterioração na qualidade da pelagem, especialmente no grupo Salina - Salina, em comparação com as condições basais. Além disso, o grupo iMAGL - Salina revelou um efeito relacionado ao fármaco, onde apresentam uma pior qualidade da pelagem comparado com as condições basal e 24h PGE₂. Até o momento, não foram encontradas pesquisas que avaliem simultaneamente dor e depressão utilizando esse tipo de teste e este fármaco. Contudo, a investigação de Mineur, Belzung & Crusio (2006) utilizou o modelo de estresse leve imprevisível com diferentes linhagens de camundongos machos e fêmeas, como C57BL/6J, BALB/cJ e DBA/2J, e observou deterioração na qualidade da pelagem em todas as linhagens, com diferenças sexuais notáveis, sendo as fêmeas da linhagem BALB/cJ as que apresentaram as piores condições. Com base nesses achados, somados àqueles obtidos no presente estudo, podemos determinar que a condição da pelagem dos animais pode ser influenciada por diferentes fatores como cepa, sexo e protocolo experimental, mas até o momento não está claro como o inibidor de MAGL pode

alterar esse comportamento em animais submetidos em protocolos experimentais. Adicionalmente, diferentes autores já descreveram que os comportamentos relacionados à depressão podem ser alterados de modo distintos pelo tratamento com MAGL a depender da dose (Chaves et al., 2021; Kruk-Slomka; Michalak; Biala, 2015).

É importante mencionar que são escassos os achados que envolvem a investigação dos efeitos inibidores FAAH e MAGL no comportamento do tipo depressivo e alguns dados são contraditórios. Na revisão de Bright e Akirav (2022), é mencionado que a maioria dos efeitos decorrentes dos tratamentos com estes fármacos pode estar relacionado ao modelo de estresse utilizado (estresse crônico leve, crônico leve imprevisível, por derrota social, natação forçada, suspensão pela cauda). Além disso, também é importante mencionar que existem variáveis que podem afetar a eficácia do inibidor, a exemplo do momento da vida em que é administrado. Por exemplo, em ratos machos e fêmeas foi observado efeito antidepressivo do inibidor da FAAH quando estavam no final da adolescência, porém esse efeito não foi evidente no início da adolescência (Alteba et al., 2021).

Em relação à análise de imunofluorescência, evidenciamos uma menor expressão de Δ FosB no núcleo basolateral (BLA) do complexo amigdalóide nas fêmeas do grupo Salina-Salina em comparação as fêmeas naïve, e uma aumento dessa expressão nas fêmeas do grupo iMAGL - iMAGL em comparação ao grupo Salina-Salina. Enquanto não foram observadas diferenças significativas entre os grupos para nenhum dos outros subnúcleos amigdalóides, assim como para as análises nos machos.

A investigação de aspectos neurofuncionais e neuroplásticos neste modelo conta com marcadores bem estabelecidos na literatura, os quais se destacam como ferramentas moleculares relevantes. Entre eles, a quantificação da expressão de proteínas da família Fos no sistema nervoso central tem sido amplamente empregada, especialmente o fator de transcrição Δ FosB (Nestler; Kelz; Chen, 1999; Perrotti et al., 2004). Este marcador se destaca por sua elevada estabilidade molecular e pela capacidade de se acumular em resposta a estímulos prolongados (Nestler, 2008; Nestler, 2013). Dessa forma, a análise da Δ FosB em áreas encefálicas oferece uma predição valiosa sobre o papel dessas regiões no dimorfismo sexual envolvido na modulação da dor

Curiosamente com nossos dados, achamos uma diminuição da ativação do BLA nas fêmeas submetidas ao protocolo de dor em comparação aquelas do grupo Naïve se mostra diverso daquele observado na literatura. Neste sentido, tal qual descrito na revisão de Neugebauer, (2015) já e

mencionado que em modelos de dor neuropática e artrite o BLA e o núcleo central (Ce) apresenta uma maior ativação em comparação ao grupo controle. Entretanto, cabe mencionar que a maioria dos dados são em animais experimentais machos.

Dentre as poucas evidências encontradas sobre o papel do complexo amigdaloide no modelo de hiperalgesia latente em fêmeas o trabalho anteriormente publicado pelo nosso grupo de pesquisa apontou que o protocolo experimental foi capaz de promover aumento da expressão de receptores glutamatérgicos no BLA apenas de camundongos machos, enquanto nas fêmeas esse efeito não ocorreu (Baptista-de-Souza et al., 2020). Comparando esse resultado com nosso grupo Salina-Salina, que apresentou menor ativação dessa mesma estrutura, levantamos a hipótese de que o glutamato está relacionado ao processo de desenvolvimento de hipersensibilidade nociceptiva e à existência de mecanismos distintos dependendo do sexo.

Por outro lado, não encontramos diferenças entre os hemisférios, o que difere também do observado na literatura, onde a dor inflamatória está mais relacionada à amígdala direita, enquanto a dor neuropática está relacionada à amígdala esquerda (Neugebauer, 2015). Isso nos leva à hipótese de que, nesse modelo de cronificação da dor onde estudamos os dois tipos de dor (inflamatória e neuropática), a amígdala pode estar sendo ativada de modo distinto ao que já foi observado em outros estudos. Destacando ainda que pouco foi explorado sobre a lateralização no processo de cronificação da dor, então seria interessante realizar mais estudos focados nisso com esse tipo de modelo, especialmente ao observar que apenas as fêmeas apresentaram uma diferença, contrastando com a literatura existente.

Até o momento, a literatura atual sobre dor e o papel da amígdala está focada em modelos específicos de dor. A exemplo da pesquisa de Cantu e colaboradores (2022) utilizando o modelo de dor inflamatória com ratos machos e fêmeas Sprague-Dawley, utilizando modelo de dor inflamatória persistente, as projeções da amígdala medial (Me) e da Ce para a substância cinzenta periaquedutal são diferentes tanto em termos de organização anatômica quanto de atividade neural. Na análise de Fos induzida por CFA, a atividade na Ce e na Me foi de 2 a 9 vezes maior nos machos do que nas fêmeas, entretanto neste estudo os autores não avaliaram a BLA.

Outra pesquisa, também recente de Presto e Neugebauer (2022) utilizando o modelo de dor por ligadura do nervo espinal em ratos machos e fêmeas os autores demonstraram que, ao bloquear o receptor CGRP1, houve diminuição na atividade neural da Ce e, consequentemente, nas respostas dolorosas e no comportamento de tipo ansioso nas fêmeas. Isso levou os autores a

proporem uma nova estratégia para o tratamento da dor crônica em fêmeas. Em contraste com nossos dados, embora o papel da Ce na dor esteja definido, não evidenciamos diferença nos nossos resultados, sugerindo a possibilidade de que a Ce apresenta um mecanismo neural diferente no processo de cronificação da dor, mas a metodologia usada nesta investigação não permite determinar isso.

Em relação ao papel dos endocanabinoides na dor, ainda há muito a ser explorado, especialmente em relação às fêmeas. No entanto, Greco e colaboradores (2021) mencionam que os efeitos de FAAH e MAGL podem depender de vários fatores, e um desses fatores pode ser os níveis de endocanabinoides nas diferentes áreas do cérebro. Isso é relevante ao observarmos os resultados desta pesquisa, já que apenas o grupo iMAGL – iMAGL evidenciou um efeito de restabelecimento da atividade da BLA, ao não apresentar diferença com o grupo naïve. Isso nos leva à hipótese de que provavelmente existam maior concentração de receptores CB₂ nas fêmeas nessa área, mas é necessário um maior aprofundamento para determinar isso. Ressaltando o ponto já levantado por outros autores sobre a necessidade de esclarecer as diferenças sexuais na expressão de CB₂, além da limitação existente nas pesquisas, uma vez que a maioria se concentrou em investigar os efeitos da inibição da FAAH devido à maior disponibilidade de inibidores seletivos em comparação com MAGL (Blanton et al., 2021)(Ghosh et al., 2013).

Um fator importante é o tempo. Em uma investigação recente realizada por Dang e colaboradores (2024), onde foi observada uma maior densidade de neurônios positivos para parvalbumina e marcação de c-Fos nas sub-regiões LA, BLA, CA1 e CA2 às 8 semanas, mas não às 2 semanas após a ligadura parcial do nervo. No entanto, foi identificada uma mudança na densidade de células positivas para c-Fos na CeA apenas duas semanas após a cirurgia. Em relação aos presentes resultados, podemos sugerir a possibilidade de que alguns efeitos do tratamento farmacológico com inibidores da FAAH só possam ser observados semanas depois o estímulo nocivo ser realizado. Desta forma, seria necessário um enfoque na cronificação da dor levando em conta esse fator de plasticidade presente nos núcleos do complexo amigdaloide.

Tabela 3- Síntese dos Resultados Obtidos.

iFAAH								
Sexo	Ganho de peso	Condição da pelagem	Escala facial de dor para camundongos	Von Frey	Labirinto	Complexo amigdalóide		
						BLA	Ce	Me
♂	~	=	=	@ Sal-iFAAH iFAAH-Sal	~ Sal-Sal iFAAH-Sal iFAAH- iFAAH	=	=	=
♀	~	* # Sal-iFAAH	* Sal-iFAAH	*# Sal-iFAAH	=	=	=	=
iMAGL								
Sexo	Ganho de peso	Condição da pelagem	Escala facial de dor para camundongos	Von Frey	Labirinto	Amígdala		
						BLA	Ce	Me
♂	~	@ Sal-Sal iMALG-Sal	* @ # Sal-iMAGL iMGL- iMAGL	# Sal-iMAGL	=	=	=	=
♀	~	=	=	#@ iMAGL- iMAGL	=	~* Sal-Sal iMAGL- iMAGL	=	=

Os símbolos apresentam de maneira sintetizada os resultados principais da pesquisa. = indica ausência de diferenças significativas; * diferença quando comparado com o grupo Sal-Sal; # diferença quando comparado com outro grupo; @ diferença quando comparado com ele mesmo em outro momento; ~ diferença quando comparado com o grupo Naïve.

Fonte: criação própria

6. CONCLUSÕES

Os dados descritos neste estudo demonstraram que o modelo de hiperalgesia latente é uma ferramenta eficaz para estudar o processo de cronificação da dor em ambos os sexos, conforme evidenciado pelas respostas observadas nos testes de escala facial de dor para camundongos e na avaliação de hiperalgesia mecânica, em que foram observadas diminuição do limiar de retirada da pata e aumento dos escores de expressão de dor após injeção de PGE₂, corroborando dados já encontrados na literatura (Asiedu *et al.*, 2011; Reichling; Levine, 2009). Além disso, também foi observado prejuízo no ganho de peso e da condição da pelagem relacionada à condição dolorosa nos dois experimentos, tendo em conta a relação de algumas variáveis como sexo, tratamento farmacológico e momento de avaliação dos testes. Outro aspecto relevante são as respostas relacionadas à ansiedade, em que foram observadas diferenças em relação à condição dolorosa e o tratamento farmacológico unicamente nos machos do experimento **1a**. Além disso, também foi demonstrado que o núcleo basolateral da amígdala atua de modo sexualmente dimórfico em animais submetidos ao protocolo de hiperalgesia latente assim como estudos anteriores do grupo já indicavam com relação a neurotransmissão glutamatérgica (Baptista-de-Souza et al, 2020).

Este estudo destaca a importância de considerar o sexo como um fator biológico significativo nos estudos de dor e potenciais terapêuticas farmacológicas analgésicas. A variabilidade nas respostas entre machos e fêmeas sublinha a necessidade de abordagens diferenciadas no manejo da dor e do tipo de tratamento farmacológico, o uso de inibidores duplos ou outra distribuição dos inibidores nos grupos experimentais diferente daquele nesta investigação com o modelo de hiperalgesia latente poderia fornecer novas informações sobre a dor e o sistema endocanabinoide. Coletivamente, nossos achados sugerem que os inibidores de FAAH e MAGL têm potencial terapêutico na modulação da dor, com efeitos variados entre sexos e os momentos de utilização do tratamento farmacológico. Estes resultados fornecem uma base sólida para futuras pesquisas sobre o papel do sistema endocanabinoide na cronificação da dor levando em consideração diversos fatores como o sexo, o modelo animal, os diferentes testes e o momento de utilização do tratamento farmacológicos.

REFERÊNCIAS

ALTEBA, S. et al. Inhibition of fatty acid amide hydrolase (FAAH) during adolescence and exposure to early life stress may exacerbate depression-like behaviors in male and female rats. **Neuroscience**, v. 455, p. 89–106, 2021. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2020.12.022.

AMIR HAMZAH, K. et al. Dimorfismo sexual en las concentraciones séricas de endocannabinoides y n-aciletanolamina en humanos a lo largo de la vida. **Scientific Reports**, v. 13, p. 23059, 2023.

ARANGO-DÁVILA, C. A. et al. Depressive disorder, anxiety disorder and chronic pain: multiple manifestations of a common pathophysiological and clinical nucleus. **Revista Colombiana de Psiquiatría**, Bogotá, v. 47, n. 1, p. 46-55, mar. 2018.

ASIEDU, M. N. et al. Spinal Protein Kinase M Underlies the Maintenance Mechanism of Persistent Nociceptive Sensitization. **Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 18, p. 6646-6653, maio 2011.

BAPTISTA-DE-SOUZA, D. et al. Sex differences in the role of atypical PKC within the basolateral nucleus of the amygdala in a mouse hyperalgesic priming model. **Neurobiology of Pain**, v. 8, p. 100049, 2020.

BASBAUM, A. I. et al. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 267–284, 2009. DOI: 10.1016/j.cell.2009.09.028.

BASBAUM, A. I. et al. The perception of pain. In: KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J.; JESSELL, T. (Eds.). **Principles of neuroscience**. New York: Appleton & Lange, 2000. p. 472–491.

BATKAI, S. et al. Endocannabinoids acting at cannabinoid-1 receptors regulate cardiovascular function in hypertension. **Circulation**, v. 110, p. 1996-2002, 2004.

BEDSE, G. et al. 2-Arachidonoylglycerol Modulation of Anxiety and Stress Adaptation: From Grass Roots to Novel Therapeutics. **Biological Psychiatry**, v. 88, n. 7, p. 520-530, 2020.

BEDSE, G. et al. Therapeutic endocannabinoid augmentation for mood and anxiety disorders: comparative profiling of FAAH, MAGL and dual inhibitors. **Translational Psychiatry**, v. 8, n. 1, 26 abr. 2018.

BLANCO NARANJO, E. G. et al. Multimodal management of chronic pain. **Revista Médica Sinergia**, v. 6, n. 4, e625, 2021.

BLANKMAN, J. L. et al. A comprehensive profile of brain enzymes that hydrolyze the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. **Chemistry and Biology**, v. 14, n. 12, p. 1347–1356, 26 dez. 2007.

BLANTON, H. L. et al. Sex differences and the endocannabinoid system in pain. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 202, p. 173107, mar. 2021.

BOOKER, L. et al. The fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibitor PF-3845 acts in the nervous system to reverse LPS-induced tactile allodynia in mice. **British Journal of Pharmacology**, v. 165, n. 8, p. 2485, abr. 2012.

BRADSHAW, H. B. et al. Sex and hormonal cycle differences in rat brain levels of pain-related cannabimimetic lipid mediators. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 291, n. 2, p. R349-58, 2006.

BRIGHT, U. et al. Modulation of Endocannabinoid System Components in Depression: Pre-Clinical and Clinical Evidence. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 10, 1 maio 2022.

BURMA, N. E. et al. Animal models of chronic pain: Advances and challenges for clinical translation. **Journal of Neuroscience Research**, v. 95, n. 6, p. 1242-1256, 2017.

BUSQUETS-GARCIA, A. et al. Differential Role of Anandamide and 2-Arachidonoylglycerol in Memory and Anxiety-like Responses. **Biological Psychiatry**, v. 70, n. 5, p. 479-486, set. 2011.

CANTU, D. J. et al. Sex differences in the amygdaloid projections to the ventrolateral periaqueductal gray and their activation during inflammatory pain in the rat. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 124, 1 out. 2022.

CAPRIOLI, A. et al. The novel reversible fatty acid amide hydrolase inhibitor ST4070 increases endocannabinoid brain levels and counteracts neuropathic pain in different animal models. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 342, n. 1, p. 188-195, 2012.

CARNEVALI, L. et al. Pharmacological Inhibition of FAAH Activity in Rodents: A Promising Pharmacological Approach for Psychological-Cardiac Comorbidity? **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 74, p. 444-452, 2017.

CARVALHO, R. C. et al. Prevalence and characteristics of chronic pain in Brazil: a national internet-based survey study. **Brazilian Journal of Pain**, v. 1, n. 4, p. 331-338, 2018.

CASTELLI, M. et al. Male and Female Rats Differ in Brain Cannabinoid CB1 Receptor Density and Function and in Behavioural Traits Predisposing to Drug Addiction: Effect of Ovarian Hormones. **Current Pharmaceutical Design**, v. 20, n. 13, p. 2100-2113, maio 2014.

CATHOMAS, F. et al. The translational study of apathy—An ecological approach. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 9, set. 2015, p. 1–7.

CECCARELLI, I. et al. The CB2 Agonist β -Caryophyllene in Male and Female Rats Exposed to a Model of Persistent Inflammatory Pain. **Frontiers in Neuroscience**, v. 14, p. 555178, 18 ago. 2020.

CELIS, C.; MARTINEZ, D.; CONDE, C. First entry in elevated plus-maze as anxiety level predictor. **Revista Universidad Industrial de Santander. Salud**, Bucaramanga, v. 42, n. 3, p. 220-228, dez. 2010.

CHANG, L. et al. La inhibición de la amida hidrolasa de ácidos grasos produce analgesia por múltiples mecanismos. **British Journal of Pharmacology**, v. 148, p. 102-113, 2006.

CHAPLAN, S. R. et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 53, n. 1, p. 55-63, 1994.

CHAVES, Y. C. et al. El cannabidiol induce efectos antidepresivos y ansiolíticos en animales experimentales con diabetes tipo 1 mediante múltiples sitios de acción. **Metabolic Brain Disease**, v. 36, p. 639–652, 2021. doi: 10.1007/s11011-020-00667-3.

CRAVATT, B. F. et al. Supersensitivity to anandamide and enhanced endogenous cannabinoid signaling in mice lacking fatty acid amide hydrolase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 16, p. 9371–9376, 2001.

DA COSTA, V. F. et al. Emotional- and cognitive-like responses induced by social defeat stress in male mice are modulated by the BNST, amygdala, and hippocampus. **Frontiers in Integrative Neuroscience**, v. 17, p. 1168640, 2023.

DANG, T. N. et al. Enhanced anxiety-like behavior induced by chronic neuropathic pain and related parvalbumin-positive neurons in male rats. **Behavioural Brain Research**, v. 459, p. 114786, 2024.

DESROCHES, J. et al. Endocannabinoids decrease neuropathic pain-related behavior in mice through the activation of one or both peripheral CB1 and CB2 receptors. **Neuropharmacology**, v. 77, p. 441–452, 2014.

DEUIS, J. R.; DVORAKOVA, L. S.; VETTER, I. Methods Used to Evaluate Pain Behaviors in Rodents. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 10, art. 284, set. 2017.

DEVANE, W. A. et al. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. **Science (New York, N.Y.)**, v. 258, n. 5090, p. 1946–1949, 1992.

DINH, T. P. et al. Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 16, p. 10819–10824, 2002.

DIXON, E. A. et al. Development of the Sensory Hypersensitivity Scale (SHS): a self-report tool for assessing sensitivity to sensory stimuli. **Journal of Behavioral Medicine**, v. 39, n. 3, p. 537–550, 12 fev. 2016.

DONVITO, G. et al. The Endogenous Cannabinoid System: A Budding Source of Targets for Treating Inflammatory and Neuropathic Pain. **Neuropsychopharmacology**, v. 43, n. 1, p. 52–79, 31 ago. 2018.

DUAN, T. et al. Fatty acid amide hydrolase inhibitors produce rapid anti-anxiety responses through amygdala long-term depression in male rodents. **Journal of Psychiatry & Neuroscience**, v. 42, n. 4, p. 230–241, 2017.

FERDOUSI, M. I. et al. Characterization of pain-, anxiety-, and cognition-related behaviors in the complete Freund's adjuvant model of chronic inflammatory pain in Wistar–Kyoto rats. **Frontiers in Pain Research**, v. 4, 2023. DOI: 10.3389/fpain.2023.1131069.

FERNÁNDEZ-SUÁREZ, D. et al. The monoacylglycerol lipase inhibitor JZL184 is neuroprotective and alters glial cell phenotype in the chronic MPTP mouse model. **Neurobiology of Aging**, v. 35, n. 11, p. 2603–2616, nov. 2014.

FORTES JÚNIOR, E. J. et al. Prevalência de ansiedade e depressão em pacientes com dores crônicas: uma revisão integrativa. **Revista Neurociências**, v. 31, p. 1–12, 2023. DOI: 10.34024/rnc.2023.v31.15649.

FU, J. et al. A catalytically silent FAAH-1 variant drives anandamide transport in neurons. **Nature Neuroscience**, v. 15, n. 1, p. 64-69, 2011.

GALLACH SOLANO, E. et al. Gender determinants in the approach to chronic pain. **Revista de la Sociedad Española del Dolor**, Madrid, v. 27, n. 4, p. 252-256, ago. 2020.

GATTINONI, S. et al. A new group of oxime carbamates as reversible inhibitors of fatty acid amide hydrolase. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, n. 15, p. 4406-4411, 2010.

GHOSH, S. et al. The monoacylglycerol lipase inhibitor JZL184 suppresses inflammatory pain in the mouse carrageenan model. **Life Sciences**, v. 92, n. 0, p. 498, 3 mar. 2013.

GIRARD-TREMBLAY, L. et al. Sex differences in the neural representation of pain unpleasantness. *The Journal of Pain: Official Journal of the American Pain Society*, v. 15, n. 8, p. 867–877, 2014.

GONZÁLEZ, S. et al. Sex steroid influence on cannabinoid CB(1) receptor mRNA and endocannabinoid levels in the anterior pituitary gland. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 270, n. 1, p. 260–266, 2000.

GRECO, R. et al. Dual inhibition of FAAH and MAGL counteracts migraine-like pain and behavior in an animal model of migraine. **Cells**, v. 10, n. 10, p. 2543, 2021.

HASLER, G. et al. Discovering endophenotypes for major depression. **Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 29, n. 10, p. 1765–1781, 2004.

HILLARD, C. J. et al. Accumulation of N-arachidonylethanolamine (anandamide) into cerebellar granule cells occurs via facilitated diffusion. **Journal of Neurochemistry**, v. 69, p. 631-638, 1997.

HN, K. et al. Discovery and characterization of a highly selective FAAH inhibitor that reduces inflammatory pain. **Chemistry & Biology**, v. 16, n. 4, p. 411, 4 abr. 2009.

HUDSON, J. I.; POPE, H. G. The concept of affective spectrum disorder: relationship to fibromyalgia and other syndromes of chronic fatigue and chronic muscle pain. **Bailliere's Clinical Rheumatology**, v. 8, n. 4, p. 839–856, 1994. DOI: 10.1016/s0950-3579(05)80051-2.

IASP Announces Revised Definition of Pain - International Association for the Study of Pain (IASP). Disponível em: <https://www.iasp-pain.org/publications/iasp-news/iasp-announces-revised-definition-of-pain/>.

JAYAMANNE, A. et al. Actions of the FAAH inhibitor URB597 in neuropathic and inflammatory chronic pain models. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, p. 281–288, 2006.

JIANG, H. X. et al. Inhibition of fatty acid amide hydrolase improves depressive-like behaviors independent of its peripheral antinociceptive effects in a rat model of neuropathic pain. **Anesthesia and Analgesia**, v. 129, n. 2, p. 587–597, 1 ago. 2019.

KANDASAMY, R. et al. The pharmacology of nociceptor priming. In: SCHAIBLE, H. G. (ed.). **Pain Control. Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 227. Berlin, Heidelberg: Springer, 2015. DOI: 10.1007/978-3-662-46450-2_2.

KANO, M. et al. Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. **Physiological Reviews**, v. 89, n. 1, p. 309-380, jan. 2009.

KĘDZIORA, M. et al. Inhibition of anandamide breakdown reduces pain and restores LTP and monoamine levels in the rat hippocampus via the CB1 receptor following osteoarthritis. **Neuropharmacology**, v. 222, p. 109304, 1 jan. 2023.

KRUK-SŁOMKA, M. et al. Efectos similares a los antidepresivos de los ligandos del receptor cannabinoide en la prueba de natación forzada en ratones: mecanismo de acción y posibles interacciones con el sistema colinérgico. **Behavioural Brain Research**, v. 284, p. 24–36, 2015. DOI: 10.1016/j.bbr.2015.01.051.

LANGFORD, D. J. et al. Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. **Nature Methods**, v. 7, n. 6, p. 447-449, maio 2010.

LI, J. X. Pain and depression comorbidity: a preclinical perspective. **Behavioural Brain Research**, v. 276, p. 92–98, 2015.

LI, M. J. et al. Chronic stress exacerbates neuropathic pain via the integration of stress-affect-related information with nociceptive information in the central nucleus of the amygdala. **Pain**, v. 158, n. 4, p. 717-739, 1 abr. 2017.

LINHER-MELVILLE, K. et al. Sex differences in neuro(auto)immunity and chronic sciatic nerve pain. **Biology of Sex Differences**, v. 11, n. 1, art. 62, 2020.

LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, v. 92, p. 180-185, 1987.

LV, X. et al. Animal models of chemotherapy-induced peripheral neuropathy for hematological malignancies: a review. **Ibrain**, v. 9, n. 1, p. 72–89, 2022.

MALDONADO, R.; CABAÑERO, D.; MARTÍN-GARCÍA, E. The endocannabinoid system in modulating fear, anxiety, and stress. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 22, n. 3, p. 229-239, 2020.

MANDUCA, A. et al. Distinct roles of the endocannabinoids anandamide and 2-arachidonoylglycerol in social behavior and emotionality at different developmental ages in rats. **European Neuropsychopharmacology**, v. 25, n. 8, p. 1362-1374, 2015.

MCMACKIN, M. Z. et al. Use of von Frey filaments to assess nociceptive sensitization in the hornworm, *Manduca sexta*. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 257, p. 139-146, 15 jan. 2016. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2015.09.015.

MECHOULAM, R. et al. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. **Biochemical Pharmacology**, v. 50, n. 1, p. 83–90, 1995.

MEEKER, T. J. et al. During capsaicin-induced central sensitization, brush allodynia is associated with baseline warmth sensitivity, whereas mechanical hyperalgesia is associated with painful mechanical sensibility, anxiety and somatization. **European Journal of Pain**, v. 25, n. 9, p. 1971-1993, out. 2021. DOI: 10.1002/ejp.1815.

MINEUR, Y. S. et al. Effects of unpredictable chronic mild stress on anxiety and depression-like behavior in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 175, n. 1, p. 43–50, 2006.

MOGIL, J. S. et al. Sex differences in mechanisms of pain hypersensitivity. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 163, p. 105749, 1 ago. 2024.

MOLES, A. et al. Psychosocial stress affects energy balance in mice: modulation by social status. **Psychoneuroendocrinology**, v. 31, p. 623–633, 2006.

MORATO, S. O papel da visão na aversão aos espaços abertos no labirinto em cruz elevado. **Psicologia USP**, v. 17, n. 4, p. 159-174, 2006.

NAGUIB, M. et al. Prevention of paclitaxel-induced neuropathy through activation of the central cannabinoid type 2 receptor system. **Anesthesia and Analgesia**, v. 114, n. 5, p. 1104–1120, maio 2012.

NAHMAN-AVERBUCH, H. et al. Sex differences in the relationships between parasympathetic activity and pain modulation. **Physiology & Behavior**, v. 154, p. 40-48, fev. 2016.

NASS, S. R. et al. Monoacylglycerol lipase inhibition using JZL184 attenuates paw inflammation and functional deficits in a mouse model of inflammatory arthritis. **Cannabis and Cannabinoid Research**, v. 6, n. 3, p. 233, 1 jun. 2021.

NESTLER, E. J. Transcriptional mechanisms of addiction: role of Δ FosB. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 363, n. 1507, 12 out. 2008.

NESTLER, E. J. Δ FosB: a Molecular Switch for Reward. **Journal of Drug and Alcohol Research**, 2013.

NESTLER, E. J. et al. DeltaFosB: a molecular mediator of long-term neural and behavioral plasticity. **Brain Research**, Netherlands, v. 835, n. 1, p. 10–17, jul. 1999.

NEUGEBAUER, V. Amygdala pain mechanisms. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 227, p. 261–284, 2015.

NEUGEBAUER, V. et al. The amygdala and persistent pain. **The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry**, v. 10, n. 3, p. 221–234, 2004.

NOLLET, M. Models of depression: Unpredictable chronic mild stress in mice. **Current Protocols**, v. 1, e208, 2021. DOI: 10.1002/cpz1.208.

NOLLET, M.; LE GUIQUET, A. M.; BELZUNG, C. Models of depression: Unpredictable chronic mild stress in mice. **Current Protocols in Pharmacology**, n. SUPPL.61, p. 1–17, 2013.

OHNO-SHOSAKU, T. et al. Endocannabinoid-mediated retrograde modulation of synaptic transmission. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 29, p. 1-8, 2014.

PAVÓN, F. J. et al. Selective inhibition of monoacylglycerol lipase is associated with passive coping behavior and attenuation of stress-induced dopamine release in the medial prefrontal cortex.

Neurobiology of Stress, v. 14, p. 100293, 2021

PEREZ RUIZ, A. et al. Regions of the brain linked to the interpretation of pain. **Revista Habanera de Ciencias Médicas**, Havana, v. 17, n. 3, p. 386-395, jun. 2018.

PERROT, S. et al. The IASP classification of chronic pain for ICD-11. *PAIN*, v. 160, n. 1, p. 77-82, jan. 2019.

PERROTTI, L. I. et al. Induction of Δ FosB in reward-related brain structures after chronic stress. **Journal of Neuroscience**, 2004.

PLANCHEZ, B. et al. Animal models of major depression: drawbacks and challenges. **Journal of Neural Transmission**, v. 126, n. 11, p. 1383–1408, 2019.

PRESTO, P. et al. Sex differences in CGRP regulation and function in the amygdala in a rat model of neuropathic pain. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 15, p. 928587, 2022.

PRICE, T. J. et al. Recent advances toward understanding the mysteries of the acute to chronic pain transition. **Current Opinion in Physiology**, v. 11, p. 42-50, out. 2019. DOI: 10.1016/j.cophys.2019.05.015.

REICHLING, D. B.; LEVINE, J. D. Critical role of nociceptor plasticity in chronic pain. **Trends in Neurosciences**, v. 32, n. 12, p. 611–618, 2009.

REN, S. Yu et al. Potential application of endocannabinoid system agents in neuropsychiatric and neurodegenerative diseases—focusing on FAAH/MAGL inhibitors. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 41, n. 10, p. 1263–1271, 18 mar. 2020.

RODGERS, R. J. et al. Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 52, n. 2, p. 297-303, 1995. DOI: 10.1016/0091-3057(95)00138-m.

RODRIGUEZ DE FONSECA et al. Cannabinoid receptors in rat brain areas: Sexual differences, fluctuations during estrous cycle and changes after gonadectomy and sex steroid replacement. **Life Sciences**, v. 54, n. 3, p. 159–170, 1994.

ROMERA, I. et al. Functional impairment related to painful physical symptoms in patients with generalized anxiety disorder with or without comorbid major depressive disorder: post hoc analysis of a cross-sectional study. **BMC Psychiatry**, v. 11, p. 69, 2011. DOI: 10.1186/1471-244X-11-69.

RUSSO, R. et al. El inhibidor de la amida hidrolasa de ácidos grasos URB597 (éster 3'-carbamoilbifenil-3-ílico del ácido ciclohexilcarbámico) reduce el dolor neuropático después de la administración oral en ratones. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 322, p. 236-242, 2007.

SAKIN, Y. et al. The effect of FAAH, MAGL, and Dual FAAH/MAGL inhibition on inflammatory and colorectal distension-induced visceral pain models in rodents. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 27, n. 7, p. 936-944, 2015.

SAKIN, Y. S. et al. Dual FAAH and MAGL inhibition might play a key role in visceral pain. *The Turkish Journal of Gastroenterology: The Official Journal of Turkish Society of Gastroenterology*, v. 29, n. 5, p. 625–626, 2018.

SANTOS-COSTA, N. et al. Glutamatergic neurotransmission controls the functional lateralization of the mPFC in the modulation of anxiety induced by social defeat stress in male mice. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, 2021.

SCIOLINO, N. R. et al. Enhancement of endocannabinoid signaling with JZL184, an inhibitor of the 2-arachidonoylglycerol hydrolyzing enzyme monoacylglycerol lipase, produces anxiolytic effects under conditions of high environmental aversiveness in rats. **Pharmacological Research**, v. 64, n. 3, p. 226-234, set. 2011.

SIEBERG, C. B. et al. Neuropathic pain drives anxiety behavior in mice, results consistent with anxiety levels in diabetic neuropathy patients. **Pain Reports**, v. 3, n. 3, p. e651, 2018.

SOLANO GUILLÉN, M. J. et al. Basic principles of pain management. **Science and Health Magazine Integrating Knowledge**, v. 6, n. 1, p. 57–62, 2022. DOI: 10.34192/cienciaysalud.v6i1.379.

TANAKA, M. et al. Anti-Inflammatory Effects by Pharmacological Inhibition or Knockdown of Fatty Acid Amide Hydrolase in BV2 Microglial Cells. **Cells**, v. 8, n. 5, p. 491, 22 maio 2019.

TEJADA, J. et al. X-PloRat: A Software for Scoring Animal Behavior in Enclosed Spaces. **Psicologia: Teoria e Pesquisa**, v. 33, n. 0, 8 jan. 2018.

TERENGHI, G. et al. Autonomic neuroplasticity and regeneration. In: ADELMAN, G.; SMITH, B. H. (ed.). **Encyclopedia of Neuroscience**. 3rd ed. Elsevier BV, 2009. p. 1017-1021.

VACHON-PRESSEAU, E. et al. The stress model of chronic pain: Evidence from basal cortisol and hippocampal structure and function in humans. **Brain**, v. 136, n. 3, p. 815–827, 2013.

WALF, A. et al. O uso do labirinto em cruz elevado como um ensaio de comportamento relacionado à ansiedade em roedores. **Nature Protocols**, v. 2, p. 322–328, 2007. DOI: 10.1038/nprot.2007.44.

WILLNER, P. The chronic mild stress (CMS) model of depression: History, evaluation and usage. **Neurobiology of Stress**, v. 6, p. 78-93, 2016.

WILSON, T. D. et al. Dual and opposing functions of the central amygdala in the modulation of pain. **Cell Reports**, v. 29, n. 2, p. 332–346.e5, 2019.

WOYACH, V. et al. Fatty acid amide hydrolase activity in the dorsal periaqueductal gray attenuates neuropathic pain and associated dysautonomia. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 323, n. 5, p. R749, 11 nov. 2022.

XIE, J. et al. Positive and negative relationship between anxiety and depression of patients in pain: a bifactor model analysis. **PLoS One**, v. 7, n. 10, p. e47577, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0047577.

ZIEGLER, C. G. et al. Expression and function of endocannabinoid receptors in the human adrenal cortex. **Hormone and Metabolic Research**, v. 42, n. 2, p. 88-92, 2010.

ANEXO A - ESTRUTURA DE VON FREY



Fonte: Laboratório de Neuropsicofarmacologia.

ANEXO B - MICROFILAMENTOS DE VON FREY



Fonte: Laboratório de Neuropsicofarmacologia.

APÊNDICE A – Dados das Análises Estatísticas

Tabela 4- ANOVA para medidas repetidas Escala facial de dor para camundongos e Von Frey.

Fig.	Painel	Tratamento 1			Tempo			Tratamento x Tempo		
		dfn,df d	F	p	dfn,df d	F	p	dfn,df d	F	P
2	A	1,43	0,41	0,53	2,86	32,40	<0,001	2,86	2,81	0,07
	B	1,46	0,04	0,85	2,92	29,92	<0,001	2,92	0,07	0,92
3	A	1,43	0,58	0,45	2,86	45,36	<0,001	2,86	0,94	0,39
	B	1,46	0,25	0,61	2,92	65,96	<0,001	2,92	0,86	0,42
7	A	1,51	0,87	0,35	2,102	41,33	<0,001	2,102	2,32	0,10
	B	1,50	0,25	0,62	2,100	38,41	<0,001	2,100	0,13	0,87
8	A	1,51	0,10	0,75	2,102	75,74	<0,001	2,102	0,38	0,68
	B	1,50	4,08	0,04	2,100	73,99	<0,001	2,100	1,11	0,33

Fonte: Criação própria

Escala facial de dor para camundongos e Von Frey nas situações pós incisão e pré-PGE₂ considerando: Tratamento 1 (pós incisão F1), o tempo (F2) que foi considerado basal, pós inscrição e Pre PGE₂.

Tabela 5-Fatores individuais ANOVA dois fatores para medidas repetidas Escala facial de dor para camundongos e Von Frey.

Fig.	Painel	Tratamento 1			Tratamento 2			Tempo		
		dfn,dfd	F	p	dfn,dfd	F	p	dfn,dfd	F	P
2	A	1,41	0,001	0,97	1,41	2,98	0,09	1,41	0,17	0,67
	B	1,44	0,50	0,48	1,44	4,83	0,03	1,44	1,37	0,25
3	A	1,41	0,15	0,69	1,41	0,11	0,75	1,41	4,29	0,04
	B	1,44	2,30	0,14	1,44	0,98	0,33	1,44	3,31	0,07
5	A	1,41	0,006	0,94	1,41	0,006	0,94	1,41	4,91	0,03
	B	1,44	1,53	0,22	1,44	1,53	0,22	1,44	11,84	<0,001
7	A	1,49	0,68	0,41	1,49	4,68	0,04	1,49	0,95	0,33
	B	1,48	1,08	0,30	1,48	3,37	0,07	1,48	6,73	0,01
8	A	1,49	4,61	0,03	1,49	4,21	0,04	1,49	2,55	0,12
	B	1,48	0,62	0,43	1,48	2,62	0,11	1,48	8,43	0,005
10	A	1,49	1,26	0,27	1,49	0,04	0,83	1,49	2,06	0,15
	B	1,48	0,09	0,76	1,48	0,19	0,66	1,48	3,33	0,07

Fonte: Criação própria

Escala facial de dor para camundongos e Von Frey considerando Tratamento 1 (pós incisão F1) e Tratamento 2 (pós PGE₂ F2) no tempo (F3) em que foram consideradas 3 e 24h pós PGE₂. Condição da pelagem analisando o efeito e interações do Tratamento 1(F1) e Tratamento 2(F2) nas situações(F3) basal e 24h pós PGE₂

Tabela 6- Interação entre os fatores ANOVA de dois fatores para medidas repetidas Escala facial de dor para camundongos e Von Frey.

Fig.	Painel	Trat 1 x Trat 2			Tempo x Trata 1			Tempo x Trata 2			Tempo x Trata 1 x Trata 2		
		dfn,dfd	F	P	dfn,dfd	F	P	dfn,dfd	F	P	dfn,dfd	F	P
2	A	1,41	0,68	0,41	1,41	0,04	0,83	1,41	0,001	0,96	1,41	1,91	0,17
	B	1,44	4,23	0,04	1,44	0,15	0,69	1,44	0,07	0,79	1,44	0,43	0,51
3	A	1,41	1,37	0,25	1,41	0,01	0,91	1,41	0,07	0,79	1,41	9,06	0,004
	B	1,44	4,35	0,04	1,44	3,89	0,054	1,44	4,11	0,04	1,44	0,79	0,37
5	A	1,41	0,0004	0,98	1,41	0,01	0,89	1,41	0,35	0,56	1,41	1,06	0,30
	B	1,44	4,07	0,04	1,44	0,24	0,62	1,44	1,89	0,17	1,44	0,87	0,35
7	A	1,49	0,37	0,54	1,49	1,79	0,18	1,49	4,13	0,04	1,49	1,20	0,27
	B	1,48	1,21	0,27	1,48	0,09	0,75	1,48	2,39	0,12	1,48	0,89	0,35
8	A	1,49	5,86	0,01	1,49	1,50	0,22	1,49	3,44	0,06	1,49	1,69	0,19
	B	1,48	4,75	0,03	1,48	6,37	0,01	1,48	4,87	0,03	1,48	8,19	0,006
10	A	1,49	3,43	0,06	1,49	2,50	0,11	1,49	10,09	0,002	1,49	0,006	0,93
	B	1,48	1,45	0,23	1,48	0,44	0,50	1,48	1,23	0,27	1,48	0,001	0,96

Fonte: Criação própria

Escala facial de dor para camundongos e Von Frey considerando Tratamento 1 (pós incisão F1) e Tratamento 2 (pós PGE₂ F2) no tempo (F3) em que foram consideradas 3 e 24h pós PGE₂. Condição da pelagem analisando o efeito e interações do Tratamento 1(F1) e Tratamento 2(F2) nas situações(F3) basal e 24h pós PGE₂

Tabela 7- ANOVA de dois fatores para medidas repetidas -Teste Post Hoc de Duncan Escala facial de dor para camundongos e Von Frey.

Comparações múltiplas de Duncan			
Fig.	Painel	Fatores	P
2	B	Salina - iFAAH x Salina - Salina	0,007
3	A	Salina - iFAAH x 3 e 24h pós PGE ₂ .	0,039
		iFAAH – Salina x 3 e 24h pós PGE ₂ .	0,021
3	B	Salina - Salina x Salina - iFAAH	0,044
		Salina - iFAAH x iFAAH – iFAAH	0,022
5	B	Salina – iFAAH x Salina – Salina	0,039
		iFAAH - iFAAH x Salina - Salina	0,033
7	A	Tratamento 2 iMAGL 24h pós PGE ₂ x 3h pós PGE ₂	0,036
		Tratamento Salina 24h pós PGE ₂ x 3h pós PGE ₂	0,006
8	A	Salina – iMAGL x Salina - Salina	0,003
		Salina - iMAGL x iMAGL - Salina	0,004
		Salina - iMAGL x iMAGL - iMAGL	0,003
		iMAGL - iMAGL 24h pós PGE ₂ x 3h pós PGE ₂	0,00003
8	B	iMAGL – iMAGL 24h pós PGE ₂ x Salina - Salina	0,0005
		iMAGL – iMAGL 24h pós PGE ₂ x Salina – iMAGL	0,0004
		iMAGL - iMAGL 24h pós PGE ₂ x iMAGL – Salina	0,0001
10	A	Tratamento 2 Salina na situação basal x 24h pós PGE ₂	0,004

Fonte: Criação própria

Escala facial de dor para camundongos e Von Frey considerando Tratamento 1 (pós incisão F1) e Tratamento 2 (pós PGE₂ F2) no tempo (F3) em que foram consideradas 3 e 24h pós PGE₂. Condição da pelagem analisando o efeito e interações do Tratamento 1(F1) e Tratamento 2(F2) nas situações(F3) basal e 24h pós PGE₂

Tabela 8- ANOVA de uma via Ganho de peso e Labirinto em Cruz Elevado.

Ganho de peso e Labirinto				
Fig.	Panel	dfn,dfd	F	P
4	A	4,49	5,159	0,001
	B	4,53	11,620	0,000
6	A	4,49	2,688	0,041
	B	4,49	2,720	0,040
	C	4,49	3,206	0,020
	D	1,53	0,602	0,662
	E	1,53	1,612	0,184
	F	1,53	0,952	0,441
9	A	4,57	4,704	0,002
	B	4,57	11,793	0,000
11	A	4,57	0,839	0,505
	B	4,57	1,637	0,177
	C	4,57	0,963	0,434
	D	4,57	01,49	0,962
	E	4,57	0,705	0,591
	F	4,57	0,798	0,531

Fonte: Criação própria

Ganho de peso e Labirinto em Cruz Elevado.

Tabela 9- ANOVA de uma via -Teste Post Hoc de Duncan Ganho de peso e Labirinto em Cruz Elevado.

Comparações múltiplas de Duncan			
Fig.	Painel	Fatores	P
4	A	Naïve x Salina-Salina	< 0,01
		Naïve x Salina - iFAAH	< 0,01
		Naïve x iFAAH – Salina	< 0,01
		Naïve x iFAAH - iFAAH	< 0,01
	B	Naïve x Salina-Salina	< 0,01
		Naïve x Salina - iFAAH	< 0,01
		Naïve x iFAAH – Salina	< 0,01
		Naïve x iFAAH - iFAAH	< 0,01
6	A	Naïve x Salina-Salina	0,470
		Naïve x Salina - iFAAH	0,482
		Naïve x iFAAH – Salina	0,016
		Naïve x iFAAH - iFAAH	0,035
	B	Naïve x Salina-Salina	0,022
		Naïve x Salina - iFAAH	0,310
		Naïve x iFAAH – Salina	0,021
		Naïve x iFAAH - iFAAH	0,014
	C	Naïve x Salina-Salina	0,037
		Naïve x Salina - iFAAH	0,214
		Naïve x iFAAH – Salina	0,005
		Naïve x iFAAH - iFAAH	0,007
9	A	Naïve x Salina-Salina	0,004
		Naïve x Salina - iMAGL	< 0,01
		Naïve x iMAGL – Salina	< 0,01
		Naïve x iMAGL - iMAGL	0,004
	B	Naïve x Salina-Salina	< 0,01
		Naïve x Salina - iMAGL	< 0,01
		Naïve x iMAGL – Salina	< 0,01
		Naïve x iMAGL - iMAGL	< 0,01

Fonte: Criação própria

Ganho de peso e Labirinto em Cruz Elevado.

Tabela 10- ANOVA de uma via Padrão de ativação neuronal (Δ FosB) no complexo amídaloide.

Fig.	Panel	Tratamento			Hemisfério			Tratamento x Hemisfério		
		dfn,dfd	F	p	dfn,dfd	F	p	dfn,dfd	F	p
13	A	2,11	0,527	0,604	1,11	0,738	0,408	2,11	2,488	0,128
	B	2,11	0,002	0,997	1,11	0,010	0,918	2,11	1,655	0,235
	C	2,11	0,237	0,792	1,11	0,027	0,872	2,11	0,866	0,447
	D	2,10	3,309	0,078	1,10	0,040	0,843	2,10	0,100	0,905
	E	2,10	0,963	0,414	1,10	0,001	0,968	2,10	0,180	0,837
	F	2,10	1,023	0,394	1,10	0,220	0,648	2,10	1,255	0,326
14	A	3,15	0,586	0,632	1,15	1,062	0,319	3,15	2,168	0,134
	B	3,15	0,337	0,798	1,15	0,297	0,593	3,15	0,975	0,430
	C	3,15	1,148	0,361	1,15	0,332	0,572	3,15	0,345	0,792
	D	3,13	5,553	<0,05	1,13	0,129	0,725	3,13	1,147	0,366
	E	3,13	2,725	0,086	1,13	0,004	0,945	3,13	0,489	0,695
	F	3,13	0,756	0,537	1,13	1,00	0,335	3,13	0,709	0,563

Fonte: Criação própria

Padrão de ativação neuronal (Δ FosB) no complexo amídaloide.

Tabela 11- ANOVA de uma via -Teste Post Hoc de Duncan Padrão de ativação neuronal (Δ FosB) no complexo amídaloide.

Comparações múltiplas de Duncan			
Fig.	Painel	Fatores	P
14	D	Naïve x Salina-Salina	< 0,05
		Naïve x Salina - iMAGL	< 0,01
		Naïve x iMAGL - iMAGL	0,58
		iMAGL - iMAGL x Salina - Salina	< 0,05
		iMAGL - MAGL x Salina - iMAGL	< 0,05
		Salina - Salina x Salina - iMAGL	0,538

Fonte: Criação própria

Padrão de ativação neuronal (Δ FosB) no complexo amídaloide.