



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA
CELULAR

KLINSMANN THIAGO LIMA

INIBIÇÃO DE CICLOOXIGENASE-2 (COX-2) EM CAMUNDONGOS INFANTIS
SAUDÁVEIS: CONSEQUÊNCIAS SOBRE O COMPORTAMENTO E O PERFIL
OXIDATIVO.

BELÉM-PA

2022

KLINSMANN THIAGO LIMA

INIBIÇÃO DE CICLOOXIGENASE-2 (COX-2) EM CAMUNDONGOS INFANTIS SAUDÁVEIS: CONSEQUÊNCIAS SOBRE O COMPORTAMENTO E O PERFIL OXIDATIVO.

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Neurociências e Biologia Celular.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Gilmara de Nazareth Tavares Bastos.

BELÉM-PA

2022

KLINSMANN THIAGO LIMA

INIBIÇÃO DE CICLOOXIGENASE-2 (COX-2) EM CAMUNDONGOS INFANTIS SAUDÁVEIS: CONSEQUÊNCIAS SOBRE O COMPORTAMENTO E O PERFIL OXIDATIVO.

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do grau de mestre em Neurociências e Biologia Celular, aprovado com o conceito _____.

Belém (PA), 26 **de** agosto **de 2022.**

Banca Examinadora:

Prof.^a Dr.^a Gilmara de Nazareth Tavares Bastos

Prof.^a Dr.^a Karen Renata Herculano Matos Oliveira

Prof.^a Dr.^a Juliana Silva Cassoli

AGRADECIMENTOS

Ao concluir este ciclo, gostaria de agradecer profundamente às seguintes pessoas e instituições:

Em primeiro lugar, gostaria de expressar os meus mais sinceros agradecimentos à minha orientadora e também amiga, Dr.^a Gilmara Bastos; por todo apoio, dedicação, críticas, sugestões e ensinamentos (acadêmicos e de vivência) que contribuíram de forma significativa para que eu pudesse vencer mais esta etapa. A você Prof.^a, meu muitíssimo obrigado!

Também gostaria de agradecer profusamente à Universidade Federal do Pará, ao Instituto de Ciências Biológicas (meu lar acadêmico), em particular, ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular por me proporcionarem a oportunidade de estimular cientificamente o meu cérebro.

A todos os meus colegas do Laboratório de Neuropatologia Experimental (LANEx), e também, do Laboratório de Morfofisiologia Aplicada à Saúde, vocês são ótimos!

A todos os integrantes do Laboratório de Neuroinflamação. Em especial, agradeço ao Prof.^o Paulo Ávila, pelos momentos de risadas, conversas, brincadeiras e também de críticas; ao Rayan Monteiro, Ramon Almeida e Marcos Lebrago, pelas diversas conversas, risadas, cervejas e cafés, além das horas intermináveis de experimentos compartilhadas ao longo desses recentes anos de amizade. Um grande abraço em todos vocês!

À minha namorada, Jessamine Pantoja, pois ninguém, ao longo desses dois anos, me ouviu falar mais sobre neurociências ou sobre os meus experimentos do que ela (desculpe, querida!). Obrigado por todo apoio, incentivo, abraços, compreensão e companheirismo. Nada disso seria possível sem sua imensa contribuição. Obrigado por tudo. Um beijo, te amo!

Ao meu pai, por toda sua amizade, suporte e ajuda que me proporcionou ao longo desses anos de academia. Minha gratidão a você, Álvaro Araújo.

À minha avó Raimunda Araújo, meus tios Mônica e Will, meu primo Henrique Keano, minha prima Nádia (e também ao Theozinho!), e a todos os outros membros de minha família e queridos amigos, por seu apoio, companheirismo e amizade ímpar.

À minhas irmãs (Thayser, Karol, Isabel e Pollyana), meus irmãos (Patryk e Aluísio), minhas sobrinhas (Ana e Vivian), e principalmente, à minha mãe Vera Lima, por todo amor, carinho, orações, preocupações e ensinamentos dedicados a mim. Muito obrigado pelo privilégio de lhe ter como mãe. Por todo o seu empenho e exemplo de vida como mulher preta e batalhadora, comprometida em me fazer estudar e mudar a nossa realidade, essa dissertação de mestrado é dedicada à senhora, dona Vera, com todo o meu amor.

No coração da ciência existe um equilíbrio essencial entre duas atitudes aparentemente contraditórias: uma abertura para ideias novas, por mais bizarras ou contrárias à intuição que sejam, e o exame cético mais implacável de todas as ideias, antigas e novas. É assim que verdades profundas são separadas de disparates profundos.

CARL SAGAN

RESUMO

No sistema nervoso central a ciclooxigenase 2 (COX-2) é uma enzima constitutiva, expressa por neurônios de diferentes regiões cerebrais, que atua na manutenção da homeostase neural, modulando a plasticidade sináptica e a geração de novos neurônios. Os Antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) são fármacos de escolha que atuam na inibição das enzimas COXs, sendo a nimesulida (NMS) um fármaco desta classe. Diversos estudos vêm demonstrando o papel dessas enzimas em distúrbios neurológicos e neuropsiquiátricos como a Doença de Parkinson, Doença de Alzheimer, epilepsia, depressão e esquizofrenia. Desse modo, o objetivo do presente trabalho foi investigar os efeitos da inibição de COX-2 em camundongos infantis saudáveis sobre os critérios comportamentais e bioquímicos, utilizando a NMS como ferramenta de bloqueio farmacológico. Para isso, foram utilizados camundongos infantis Swiss, machos, com idades entre 21 e 34 dias. Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos: (1) Veículo, (2) NMS 2,5mg/kg, (3) NMS 5mg/kg e (4) NMS 10mg/kg. Duas injeções de NMS/Veículo foram administradas ao dia por via intraperitoneal. Ao longo do experimento, diariamente, foi registrada a massa corporal dos animais e eles foram submetidos aos testes comportamentais: Teste de campo aberto (TCA), labirinto em cruz elevado (LCE), teste da caixa claro/escuro (TCE) e reconhecimento de novo objeto (RNO). Além disso, as amostras dos encéfalos foram coletadas para as análises bioquímicas. Os resultados demonstraram a indução de estresse oxidativo com níveis aumentados de peroxidação lipídica no córtex e hipocampo, bem como a expressão de um comportamento ansiosogênico, observado no LCE, possivelmente potencializado pelo medo. No RNO, os animais do grupo NMS 5mg/kg apresentaram um déficit na memória de reconhecimento de novos objetos, e conseqüentemente, na memória de curta duração. Dessa forma, nossos resultados demonstraram que a inibição *in vivo* de COX-2 em animais infantis induz um comportamento tipo-ansioso possivelmente potencializado pelo medo, porém não afeta a exploração e a locomoção desses animais. Ainda, a inibição de COX-2 induziu estresse oxidativo cortical e hipocampal. Portanto, a inibição de COX-2 em animais infantis e não inflamados pode comprometer funções cognitivas como memória e aprendizado, bem como alterar o perfil oxidativo cerebral.

Palavras chave: Ciclooxigenases, AINEs, Comportamento, Estresse Oxidativo, Nimesulida.

ABSTRACT

In the central nervous system, cyclooxygenase 2 (COX-2) is a constitutive enzyme, expressed by neurons from different brain regions, which acts in the maintenance of neural homeostasis, modulating synaptic plasticity and the generation of new neurons. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are drugs of choice that act to inhibit COX enzymes, with nimesulide (NMS) being a drug of this class. Several studies have demonstrated the role of these enzymes in neurological and neuropsychiatric disorders such as Parkinson's Disease, Alzheimer's Disease, epilepsy, depression and schizophrenia. Thus, the aim of the present work was to investigate the effects of COX-2 inhibition in healthy infant mice on behavioral and biochemical criteria, using NMS as a pharmacological blockade tool. For this, male Swiss infant mice, aged between 21 and 34 days, were used. The animals were randomly divided into four groups: (1) Vehicle, (2) NMS 2.5mg/kg, (3) NMS 5mg/kg and (4) NMS 10mg/kg. Two injections of NMS/Vehicle were administered intraperitoneally daily. Throughout the experiment, the body mass of the animals was recorded daily and they were subjected to behavioral tests: open field test (OFT), elevated plus maze (EPM), light/dark box test (LDBT) and novel object recognition test (NORT). In addition, brain samples were collected for biochemical analyses. The results demonstrated the induction of oxidative stress with increased levels of lipid peroxidation in the cortex and hippocampus, as well as the expression of an anxiogenic behavior, observed in the EPM, possibly potentiated by fear. In the NORT, the animals of the NMS 5mg/kg group showed a deficit in the memory of recognizing new objects, and consequently, in the short-term memory. Thus, our results demonstrated that the *in vivo* inhibition of COX-2 in infant animals induces an anxious-like behavior possibly potentiated by fear, but does not affect the exploration and locomotion of these animals. Furthermore, COX-2 inhibition induced cortical and hippocampal oxidative stress. Therefore, the inhibition of COX-2 in infantile and non-inflamed animals may compromise cognitive functions such as memory and learning, as well as alter the cerebral oxidative profile.

Keywords: Cyclooxygenases, NSAIDs, Behavior, Oxidative Stress, Nimesulide.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mecanismo de ação dos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs).....	11
Figura 2: Representação esquemática do delineamento experimental.	22
Figura 3: Representação ilustrativa do Teste de Campo Aberto.....	23
Figura 4: Representação esquemática do Labirinto em Cruz Elevado.....	24
Figura 5: Representação esquemática da Caixa Claro-Escuro.....	25
Figura 6: Representação esquemática do Teste de Reconhecimento de Novos Objetos.....	27
Figura 7: Efeitos da inibição de COX-2 sobre a massa corporal.....	29
Figura 8: Efeitos da inibição de COX-2 sobre o deslocamento horizontal e vertical em camundongos submetidos ao TCA.....	29
Figura 9: Efeitos da inibição de COX-2 sobre o número de entradas aos braços abertos e fechados e os comportamentos estereotipados por animais expostos ao LCE.....	31
Figura 10: Efeitos da inibição de COX-2 sobre o tempo gasto nos braços abertos e fechados do LCE.....	32
Figura 11: Efeitos da inibição de COX-2 sobre o comportamento tipo-ansioso em animais submetidos ao teste da caixa claro-escuro.....	34
Figura 12: Efeitos da inibição de COX-2 sobre a memória de reconhecimento em animais submetidos ao teste de RNO.....	35
Figura 13: Efeitos da inibição de COX-2 sobre o perfil oxidativo cortical e hipocampal.....	36

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AINEs	Anti-inflamatórios não esteroidais
AA	Ácido Araquidônico
AEA	Aracondoíl-etanolamina ou Anandamida
2-AG	2- araquidonoilglicerol
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BDZs	Benzodiazepínicos
BrdU	5-Bromo-2'-deoxyuridina
CAT	Catalase
COXs	Ciclooxigenases
COX-1	Ciclooxigenase-1
COX-2	Ciclooxigenase-2
Cx	Córtex cerebral
DG	Giro Denteado
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ERONs	Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio
GPx	Glutathione Peroxidase
Hc	Hipocampo
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IL-6	Interleucina-6
LaNEx	Laboratório de Neuropatologia Experimental
LCE	Labirinto em Cruz Elevado
LPS	Lipopolissacarídeo

LTP	Potenciação de longa duração
LTD	Depressão de longa duração
MDA	Malondialdeído
MIPs	Medicamentos Isentos de Prescrição
NaCl	Cloreto de Sódio/Solução salina
NF- κ B	Fator de transcrição nuclear kappa B
NMS	Nimesulida
NO/NO ₂ ⁻	Óxido nítrico/Nitrito
OMS	Organização Mundial da Saúde
PGs	Prostaglandinas
PGE2	Prostaglandina E2
PLA2	Fosfolipase A2
PSTD	Transtorno do Estresse Pós-Traumático
RNO	Teste de Reconhecimento de Novos Objetos
SOD	Superóxido dismutase
SL	Sistema Límbico
SNC	Sistema Nervoso Central
TBARs	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	Teste do Campo Aberto
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral-alfa
UFPA	Universidade Federal do Pará

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1 ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO ESTEROIDAIIS E PLASTICIDADE NEURAL	10
1.2 CICLOOXIGENASE E FISIOLOGIA NEURAL.....	13
1.3 CICLOOXIGENASE E ESTRESSE OXIDATIVO.....	14
1.4 USO INDISCRIMINADO DE ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO ESTEROIDAIIS	17
2. OBJETIVO GERAL	19
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS	20
3.2 DROGAS E GRUPOS EXPERIMENTAIS	20
3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	21
3.4 ENSAIOS COMPORTAMENTAIS.....	23
a) Teste do Campo Aberto (TCA).....	23
b) Labirinto em Cruz Elevado (LCE).....	24
c) Teste claro-escuro	25
d) Teste de Reconhecimento de Novos Objetos (RNO).....	26
3.5 ENSAIOS BIOQUÍMICOS	27
a) Ensaio de peroxidação lipídica	27
b) Quantificação de nitrito (NO ₂ ⁻).....	28
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	28
4. RESULTADOS	29
4.1 MASSA CORPORAL	29
4.2 TESTE DE CAMPO ABERTO (TCA)	29
4.3 LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO (LCE)	31
4.4 TESTE CLARO/ESCURO	34
4.5 TESTE DE RECONHECIMENTO DE NOVOS OBJETOS (RNO).....	36
4.6 ENSAIOS BIOQUÍMICOS	37
5. DISCUSSÃO	39
6. CONCLUSÃO	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

1. INTRODUÇÃO

1.1 ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO ESTEROIDAIIS E PLASTICIDADE NEURAL

A plasticidade neural corresponde à alta capacidade de adaptação/resposta do cérebro a uma infinidade de estímulos, promovendo alterações morfológicas e funcionais no tecido neural, que constituem a base neurobiológica dos processos de aprendizado e memória (FERRARI et al., 2001). Woodling e colaboradores (2016), utilizando um modelo de doença de Alzheimer em camundongos, mostraram que a inibição de ciclooxigenase-2 (COX-2) aumenta os níveis de neurotransmissores como dopamina e noradrenalina, além de prevenir os déficits de memória em animais submetidos a uma tarefa comportamental de discriminação de objetos (WOODLING et al., 2016). Consistente com isso, estudos em humanos têm demonstrado níveis aumentados de produtos de COX-2 no líquido cefalorraquidiano (LCR) de pacientes diagnosticados com Alzheimer (COMBRINCK et al., 2006), indicando a participação dessa enzima na patogênese das doenças neurodegenerativas.

Os anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) consistem um grupo diversificado de substâncias com propriedades similares, que atuam por meio da inibição das ciclooxigenases 1 e/ou 2 (COX-1 e COX-2), enzimas responsáveis pela conversão do ácido araquidônico (AA) em prostaglandinas (PGs) (Figura 1), as quais são mediadoras pró-inflamatórias e responsáveis pelos sinais da inflamação (ROSENBLOOM; CRAVEN, 1983; SCHELLACK, NATALIE; SCHELLACK, GUSTAV; FOURIE, 2015). Conseqüentemente, os AINEs são medicamentos amplamente utilizados pela população, sobretudo, para tratar dores e quadros inflamatórios. No entanto, esses fármacos geram uma ampla gama de efeitos adversos à nível de sistemas, tais como, o sistema nervoso central (SNC), sistema gastrointestinal e cardiovascular, favorecendo o aumento da pressão sanguínea, a retenção de água e sódio, a fibrilação atrial e o prejuízo cognitivo, especialmente, déficits de memória (SCHELLACK, NATALIE; SCHELLACK, GUSTAV; FOURIE, 2015; TÜRKOĞLU, GOZDE; TÜRKOĞLU, SERHAT; KAYALI, SEHER; KARAHAN, 2016).

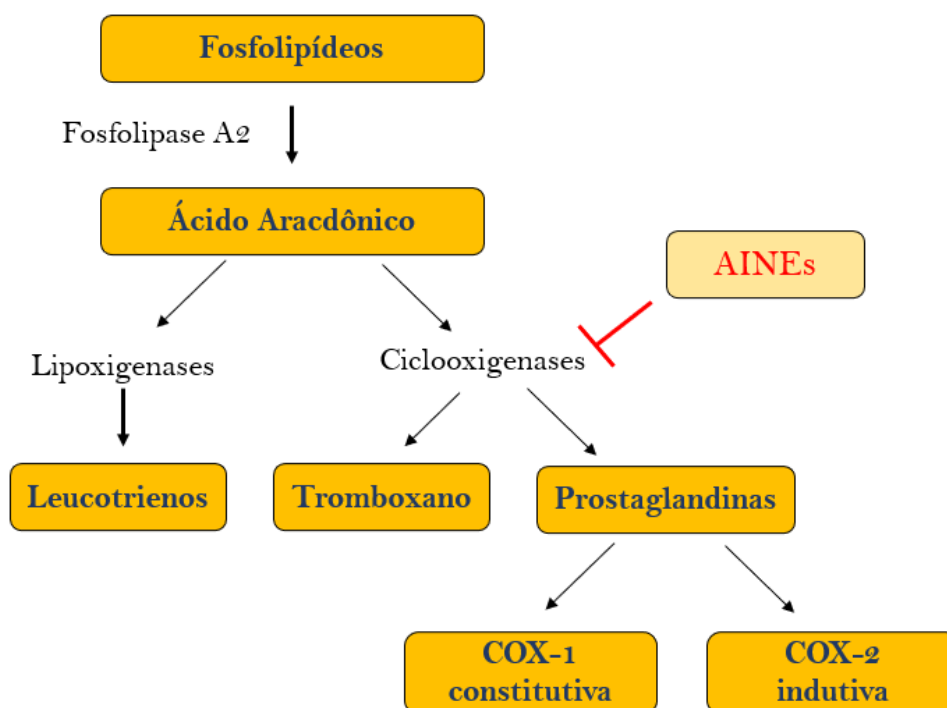


Figura 1: Mecanismo de ação dos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs).

O símbolo vermelho indica o mecanismo de ação dos AINEs por meio da inibição das enzimas ciclooxigenases (COXs).

Fonte: Elaborada pelo autor.

A potenciação de longa duração (LTP, do inglês *long-term potentiation*) e a depressão de longa duração (LDP, do inglês *long-term depression*) são dois processos de plasticidade sináptica dependentes de atividade associados à aquisição de memória e aprendizado (IZQUIERDO et al., 2008). Diversos estudos vêm demonstrando o papel fisiológico das enzimas COX-1 e COX-2 naqueles processos, e conseqüentemente, em distúrbios neurológicos como a doença de Parkinson, doença de Alzheimer, epilepsia e acidente vascular cerebral (VIJITRUTH et al., 2006; WARNER; MITCHELL, 2004). Um estudo realizado por Albrecht (2007) avaliou o papel da COX-2 na plasticidade sináptica na amígdala de camundongos nocautes. O tratamento com o inibidor seletivo NS-398 reduziu significativamente a probabilidade da indução de LTP no núcleo lateral da amígdala, e os autores concluíram, que o LTP naquela região é dependente da atividade

da COX-2, e também, que há uma intercomunicação entre COX-2 e óxido nítrico (NO) e que essa relação pode modular a plasticidade sináptica (ALBRECHT, 2007).

Em estudos realizados no final do século XX mostraram que, sob condições fisiológicas, no córtex cerebral e hipocampo, a COX-2 está presente somente em neurônios e não é expressa em células gliais (YAMAGATA et al., 1993). Em contrapartida, trabalhos mais recentes indicam que em processos patofisiológicos, tais como transtorno do estresse pós traumático e na Doença de Alzheimer, os níveis de expressão da enzima aumentam significativamente na micróglia e astrócitos, contribuindo para um quadro neuroinflamatório (KAHVECI, 2010).

O processo neuroinflamatório é observado em diversas patologias neuropsicológicas, neuropsiquiátricas e neurodegenerativas, com ativação anormal de células microgлияis, incluindo Esclerose Múltipla, Doença de Parkinson (HIRSCH; HUNOT, 2009a), além de estresse e ansiedade, bem como, síndromes metabólicas como obesidade e diabetes mellitus tipo 2 (LITTLE et al., 2022).

Por outro lado, no sistema nervoso central (SNC), na ausência de estímulos lesivos e infecciosos, a COX-2 é uma enzima constitutiva, importante na manutenção da homeostase, promovendo *up-regulation* da plasticidade neural e a geração de novos neurônios ou neurogênese (ROUZER; MARNETT, 2009; YANG; CHEN, 2008). O processo de neurogênese já é bem descrito na literatura, em diferentes espécies e com estágios bem caracterizados, sendo preservado também, em humanos ao longo de toda a vida (BOLDRINI et al., 2018). Nesse sentido, um estudo realizado em roedores adultos fêmeas da linhagem C57BL/6, demonstrou que a administração de inibidores de COX-2 (meloxicam e nimesulida), na dose de 10 e 20mg/kg inibiu o processo de neurogênese na zona subventricular e no hipocampo desses animais, duas regiões neurogênicas clássicas (GONCALVES et al., 2010; JURKOWSKI et al., 2020).

Evidentemente, tais achados apoiam a hipótese de participação da COX-2 na modulação da plasticidade neural e outros estudos vêm sendo conduzidos na tentativa de compreender os mecanismos pelos quais os AINEs podem atuar na proteção de doenças neurodegenerativas (KOTILINEK et al., 2008). Nesse sentido, estudos recentes sugerem que os inibidores de COX-2 diminuem o comportamento tipo-ansioso em animais (GAMBLE-GEORGE et al., 2016) e podem representar uma nova abordagem ou estratégia de tratamento para transtornos afetivos como depressão e ansiedade. Ainda, em

animais submetidos a desafios inflamatórios, os inibidores de COXs apontam efeitos neuroprotetores.

O modelo de neuroinflamação induzida por LPS (lipopolissacarídeo) já é bem caracterizado e promove alterações microgлияis e diminuição da neurogênese. Bastos et al., (2008) utilizando o referido modelo de neuroinflamação, avaliaram a neurogênese no giro denteado (DG) de camundongos adultos marcados com bromodeoxiuridina (BrdU), um marcador de proliferação celular. Os autores observaram uma diminuição considerável de células marcadas com BrdU, 7 e 21 dias, além de uma maior morte celular no giro denteado dos animais, proporcional à dose de LPS administrada. Em contrapartida, os pesquisadores observaram que o tratamento com inibidores seletivos e não seletivos de COX-1 e COX-2 (indometacina e NS-398, respectivamente) não apenas suprimiu a morte celular induzida por LPS, como também promoveu um efeito protetor contra a redução da neurogênese (BASTOS et al., 2008). Portanto, é bem claro a participação das enzimas COXs na modulação da plasticidade neural, e outros estudos também evidenciam seus papéis nas doenças neurodegenerativas (WOODLING et al., 2016; ZOU et al., 2020).

Ademais, outros estudos têm documentado que inibidores seletivos de COX-2, tais como os celocoxibes, podem, de fato, auxiliar no tratamento de distúrbios neuropsiquiátricos como esquizofrenia e distúrbio obsessivo-compulsivo, além de distúrbios do neurodesenvolvimento como transtorno do espectro autista (SETHI et al., 2019). Esses achados atestam que os distúrbios neuropsiquiátricos e neurodegenerativos possuem um cunho inflamatório, e, portanto, o tratamento feito com AINEs (inibidores de COXs) poderia, de fato, aliviar os sintomas relacionados àquelas mazelas.

1.2 CICLOOXIGENASE E FISIOLOGIA NEURAL

No encéfalo a COX-2 é distribuída em regiões do córtex, hipocampo e hipotálamo sendo mais abundante em neurônios glutamatérgicos hipocampais e corticais (KAUFMANN et al., 1996). Tal localização implica envolvimento em processos de aprendizado e memória e na liberação de neurotransmissores (SMOLEN; BAXTER; BYRNE, 2019). Embora apresente um papel constitutivo à nível de SNC, a COX-2 pode

ser induzida nas células gliais em resposta à processos lesivos e infecciosos e promover a neuroinflamação.

As enzimas COXs catalisam a conversão do ácido araquidônico (AA) em prostaglandinas (PGs) (Figura 1). Estas, por sua vez, são responsáveis por modularem as sinalizações sinápticas, sobretudo a prostaglandina E2 (PGE2), cujo papel está associado à manutenção da excitabilidade de membrana, transmissão sináptica e integração, além de atuar como um mensageiro na modulação sináptica (YANG; CHEN, 2008). Estudos têm demonstrado que os endocanabinóides como 2- araquidonoilglicerol (2-AG) e o N-aracidoil-etanolamina ou Anandamida (AEA) são substratos para COX-2, e que a degradação desses pode resultar em novos tipos de prostaglandinas (YANG et al., 2008; YANG; CHEN, 2008). A degradação de ambos endocanabinóides resulta na geração de AA, e este por sua vez, pode ser metabolizado pelas enzimas COXs, reiniciando o ciclo e exacerbando o processo de neuroinflamação (ZOU; KUMAR, 2018).

Ao inibirem a ação daquelas enzimas, os AINEs promovem alterações motoras (HUI et al., 2018), comportamentais (TEELING et al., 2010) e fisiológicas (BINDU; MAZUMDER; BANDYOPADHYAY, 2020). Um relato observado em humanos constatou um quadro de distúrbio psicótico induzido pelo uso crônico de indometacina durante três semanas, em que durante os dias de medicação, o indivíduo se mostrava extremamente em alerta, irritável e com alucinações visuais e auditivas (TÜRKOĞLU, GOZDE; TÜRKOĞLU, SERHAT; KAYALI, SEHER; KARAHAN, 2016), porém, após a suspensão da medicação, esses sintomas foram abolidos. Como já discutido anteriormente, os transtornos neuropsiquiátricos como depressão e ansiedade, assim como, as doenças neurodegenerativas, apresentam um caráter neuroinflamatório. Nesse sentido, uma variedade de estudos vêm demonstrando a associação entre inflamação e estresse oxidativo (HE et al., 2020; HUSSAIN et al., 2016; LINDQVIST, 2016). No entanto, ainda não está completamente entendido se o estresse oxidativo é causa ou consequência do processo inflamatório ou vice-versa.

1.3 CICLOOXIGENASE E ESTRESSE OXIDATIVO

O estresse oxidativo caracteriza-se pelo desequilíbrio entre a geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERONs) e os mecanismos de defesa antioxidantes do

organismo. De outro modo, os agentes oxidantes excedem a capacidade de defesa do organismo, que inclui enzimas como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx), além de outras moléculas como as vitaminas C e E, e com isso, podem ocasionar danos à biomoléculas como DNA, lipídios e proteínas, prejudicando o funcionamento da célula, e conseqüentemente, acarretando em neurodegeneração e morte celular (BARBOSA; DE MEDEIROS; AUGUSTO, 2006).

Nesse contexto, uma série de evidências vêm demonstrando uma relação entre estresse oxidativo e neuroinflamação. À nível de SNC, estudos conduzidos em cérebros *post-mortem* de pacientes com doença de Parkinson, evidenciaram a morte de neurônios dopaminérgicos na substância negra, seguida de superativação de células microgliais, um fator indicativo do processo neuroinflamatório (HIRSCH; HUNOT, 2009b; LECOURS et al., 2018). Ainda, diversos outros estudos apontam o envolvimento do estresse oxidativo na etiologia e/ou progressão de doenças cardiovasculares, doenças pulmonares, diabetes, câncer, doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer, além de, desordens afetivas como depressão e ansiedade (ANSARI A.; SCHEFF W., 2010; LIGUORI et al., 2018).

A literatura científica apresenta diversos achados que evidenciam o papel da COX-2 na patogênese dos transtornos de humor como o distúrbio do estresse pós-traumático (PTSD). Um estudo realizado em 2018, conduzido em ratos Wistar modelo de distúrbio do estresse pós-traumático (PTSD), buscou investigar os níveis de expressão de COX-2 no hipocampo, bem como avaliar os efeitos da inibição de COX-2 naqueles animais. Os autores concluíram que a COX-2 pode estar envolvida na patogênese do PTSD, e que a inibição da sua expressão possui papel neuroprotetor em animais modelo do transtorno (WANG et al., 2018).

Em conjunto, esses dados certificam que uma ampla variedade de transtornos e fatores endógenos e exógenos desencadeiam um mecanismo de neuroinflamação no sistema nervoso central, cujo processo altera o parênquima cerebral, e conseqüentemente, ocasiona déficits cognitivos e motores, com elevados níveis de citocinas próinflamatórias, ativação de células gliais e níveis elevados de neurodegeneração (SHABAB et al., 2017).

O processo de neurodegeneração eleva os níveis de radicais livres, os quais podem prejudicar o funcionamento da maquinaria celular. O tecido neural é extremamente vulnerável ao estresse oxidativo. Isto torna as diferentes espécies reativas (ERONs)

importantes mediadores do processo de lesão à nível central, contribuindo para a disfunção mitocondrial, e conseqüentemente, para o quadro inflamatório, favorecendo a liberação de citocinas próinflamatórias como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 6 (IL-6), bem como a expressão de fatores de transcrição como o fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B) (HUSSAIN et al., 2016).

Dessa forma, vários estudos têm buscado identificar biomarcadores indicativos do dano oxidativo. Dentre esses marcadores, destacam-se os isoprostanos, os níveis plasmáticos e séricos de malondialdeído (MDA), dosagens de nitrito e nitrato, assim como os níveis das enzimas de defesa antioxidantes como SOD, CAT e GPx (DHAMA et al., 2019). Um dos biomarcadores mais bem estudados e estabelecidos é o MDA, um metabólito derivado do processo de peroxidação lipídica, no qual, as ERONs atacam os ácidos graxos insaturados presentes nas membranas celulares, e alteram a permeabilidade, fluidez e integridade destas estruturas (AYALA; MUÑOZ; ARGÜELLES, 2014). A quantificação dos níveis de MDA é avaliada, sobretudo, por meio de uma reação colorimétrica com o ácido tiobarbitúrico (TBA) (BEZERRA et al., 2004).

Nesse âmbito, a literatura mostra uma relação bem estabelecida entre níveis aumentados de marcadores do estresse oxidativo e o desenvolvimento de comportamento tipo-ansioso em roedores (SALIM et al., 2010). Ainda, alguns estudos vêm demonstrando a associação genética entre estresse oxidativo e transtornos de ansiedade (HASSAN et al., 2014).

1.4 USO INDISCRIMINADO DE ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO ESTEROIDAIIS

No Brasil, os AINEs, analgésicos e antipiréticos são os medicamentos mais prescritos na faixa etária pediátrica. Particularmente, alguns desses medicamentos são isentos de prescrição (MIPs), o que os torna de fácil aquisição por qualquer indivíduo. Além disso, muitas vezes são utilizados em indicações, doses, faixa etária e frequências para os quais não foram aprovados, configurando o uso “*off label*” (FERREIRA; LOPES, 2016). Por outro lado, em países desenvolvidos, a indicação daqueles medicamentos é extremamente restrita. Na Europa, por exemplo, somente dois fármacos estão aprovados para o tratamento de febre em crianças: paracetamol e ibuprofeno (AGENCY, 2009).

A isenção da prescrição médica garante a segurança e eficácia dos MIPs, mas não a isenção de orientação para o seu uso, pois podem acarretar riscos e ocasionar danos à saúde se utilizados de forma indevida. O boletim epidemiológico nº 9 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) de 2020, constatou que os MIPs representam cerca de 30% das vendas no mercado farmacêutico total. No Canadá, em 2018, foram gastos mais de 6 milhões de dólares com MIPs, enquanto que nos Estados Unidos, no mesmo ano, foram gastos cerca de 35 bilhões de dólares (BRASIL, 2020; RODRIGUES, 2017).

A automedicação é uma prática corrente no Brasil. Um estudo realizado por Arrais et al., (2016) avaliou a prevalência e os fatores associados à automedicação nas diferentes regiões brasileiras. Os autores constataram que a maior prevalência ocorreu em mulheres residentes nas regiões Norte, Nordeste ou Centro Oeste, sendo os anti-inflamatórios e os relaxantes musculares as classes mais utilizadas, tendo a dipirona como o fármaco mais consumido (ARRAIS et al., 2016). Um outro estudo buscou a incidência do consumo de anti-inflamatórios esteroidais e não esteroidais entre universitários de Imperatriz-MA. Os resultados mostraram que a faixa etária mais predominante foi entre 17 e 35 anos, sendo o ibuprofeno o anti-inflamatório mais consumido, seguido da nimesulida (SILVA et al., 2019).

Além da automedicação com o uso dos AINEs e devido à participação da enzima COX-2 nos mecanismos fisiológicos de plasticidade sináptica, degradação de endocanabionóides bem como na liberação de neurotransmissores e desenvolvimento

cerebral, faz-se necessário estudos que busquem avaliar de forma sistemática os efeitos da inibição daquela enzima, em níveis basais, sobre o comportamento de animais infantis *in vivo*.

Para isso, o presente estudo utilizou a nimesulida (NMS) como uma ferramenta de bloqueio farmacológico, uma vez que ela é um inibidor seletivo da COX-2, pertencente à classe das sulfonilidas, cujo tempo de uso recomendado para indicações como febre e dor, geralmente é por cerca de 7 dias. Apesar de ser proscrita em alguns países (por ex.: EUA, Japão e Alemanha), seu uso é liberado no Brasil, porém, somente para crianças acima de 12 anos, embora ainda seja usada em idades inferiores. Curiosamente, alguns estudos mostram casos graves e até fatais de hepatotoxicidade em pacientes que receberam tratamento com nimesulida (ZHOU et al., 2017). Devido a esse efeito adverso extremamente prejudicial, o uso de NMS foi, conseqüentemente, restringido ou retirado do mercado em vários países (KWON et al., 2019; TRAVERSA et al., 2003).

Por todo o exposto, é evidente a necessidade de estudos que busquem compreender os efeitos implicados à inibição de COX-2, sobretudo em crianças, afim de promover o uso racional desses medicamentos, e além disso, compreender os mecanismos e funções moduladas pelas COX-2.

2. OBJETIVO GERAL:

- Investigar os efeitos da inibição de COX-2 em camundongos infantis saudáveis sobre os critérios comportamentais e bioquímicos.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Mensurar a atividade exploratória e locomotora em animais infantis submetidos ao tratamento com inibidor de COX-2;
- Avaliar o comportamento tipo-ansioso em animais infantis tratados com inibidor de COX-2;
- Avaliar o estresse oxidativo em diferentes áreas do sistema nervoso central de camundongos infantis tratados com inibidor de COX-2;
- Investigar possíveis déficits de memória em camundongos infantis tratados com inibidor de COX-2.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

No geral, todos os animais utilizados no estudo (n= 49) foram camundongos *Swiss* machos infantis, com idades entre P21 e P34 dias e peso corporal em torno de 15-26g. Os animais foram obtidos do Biotério Central da Universidade Federal do Pará e foram mantidos em sala de acomodação com temperatura controlada em torno de 25°C, exaustão de ar e ciclo de claro/escuro de 12 horas no biotério do Laboratório de Neurofarmacologia Experimental (LaNEx), localizado no Hospital Universitário João de Barros Barreto. Os animais foram alojados em gaiolas plásticas (30 x 20 x 13 cm), com acesso *ad libitum* à água e à ração. Todos os procedimentos foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Pará, sob o número de registro N° 3286230918. Os animais foram mantidos em um período de habituação de 4 dias antes do início dos experimentos.

O atual estudo levou em consideração os achados anteriores de Dutta e Sengupt (2016) sobre a relação entre as idades de humanos e camundongos, associando que um ano humano equivale a nove dias animais. Nesse contexto, todos os camundongos utilizados no presente estudo tinham idades entre 21 e 34 dias (3-4 anos – de acordo com a relação do estudo citado) e, portanto, dentro do período de infância.

3.2 DROGAS E GRUPOS EXPERIMENTAIS

O bloqueio farmacológico da COX-2 foi realizado com o inibidor seletivo NMS. Os animais foram aleatoriamente divididos em quatro grupos. (1) Grupo Veículo, (2) NMS 2,5mg/kg, (3) NMS 5mg/kg e (4) NMS 10mg/kg. O grupo Veículo recebeu a aplicação de PBS + DMSO (Dimetilsulfóxido) (Sigma Aldrich) a 0,1%, via intraperitoneal (i.p.). Os demais grupos receberam aplicação do inibidor seletivo de COX-2, nimesulida (NMS), em três diferentes doses (2,5; 5 e 10mg/kg), diluído em solução de PBS + DMSO a 0,1%, via i.p.

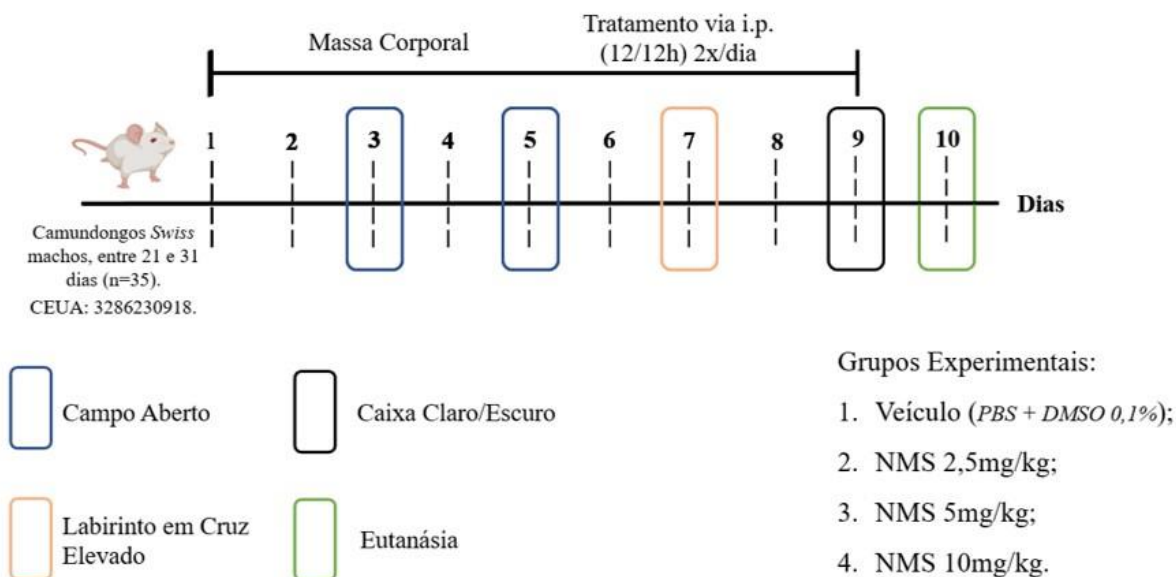
3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Após 4 dias de aclimação, todos os grupos foram submetidos ao tratamento (i.p.) com NMS ou Veículo duas vezes ao dia, em um intervalo de 12 horas entre uma aplicação e outra, ao longo de um período de 9 dias. O tratamento diário ocorreu entre 6h e 18h.

O presente experimento consistiu de duas partes. Na primeira, Figura 2-Parte I, n=36, o objetivo foi avaliar a atividade locomotora e exploratória, bem como, observar as alterações comportamentais do tipo-ansioso em camundongos em período infantil submetidos ao tratamento com o inibidor de COX-2 durante 9 dias. Desta forma, no 3º e 5º dia de tratamento, 2h após a primeira administração, todos os grupos foram submetidos ao teste comportamental do Campo Aberto. Novamente, ao 7º dia de tratamento, 2h após a primeira administração, todos os grupos foram submetidos ao teste comportamental do Labirinto em Cruz elevado (LCE). Por fim, no 9º dia após o início do tratamento, os animais foram submetidos ao teste comportamental da caixa claro/escuro. No dia seguinte (10º dia), os animais foram eutanasiados para a obtenção do encéfalo para análises bioquímicas.

Na segunda parte, Figura 2-Parte II, n=13, o objetivo foi avaliar os efeitos da inibição de COX-2 sobre os possíveis déficits de memória em animais infantis. Do mesmo modo, os animais foram submetidos ao tratamento com o inibidor e com veículo ao longo de 9 dias, sendo, ao final, expostos ao teste comportamental de Reconhecimento de Novos Objetos (RNO). No 10º dia, os camundongos foram eutanasiados para a obtenção e remoção do encéfalo para a realização das análises bioquímicas.

☐ PARTE I – EXPLORAÇÃO E ANSIEDADE.



☐ PARTE II – MEMÓRIA.

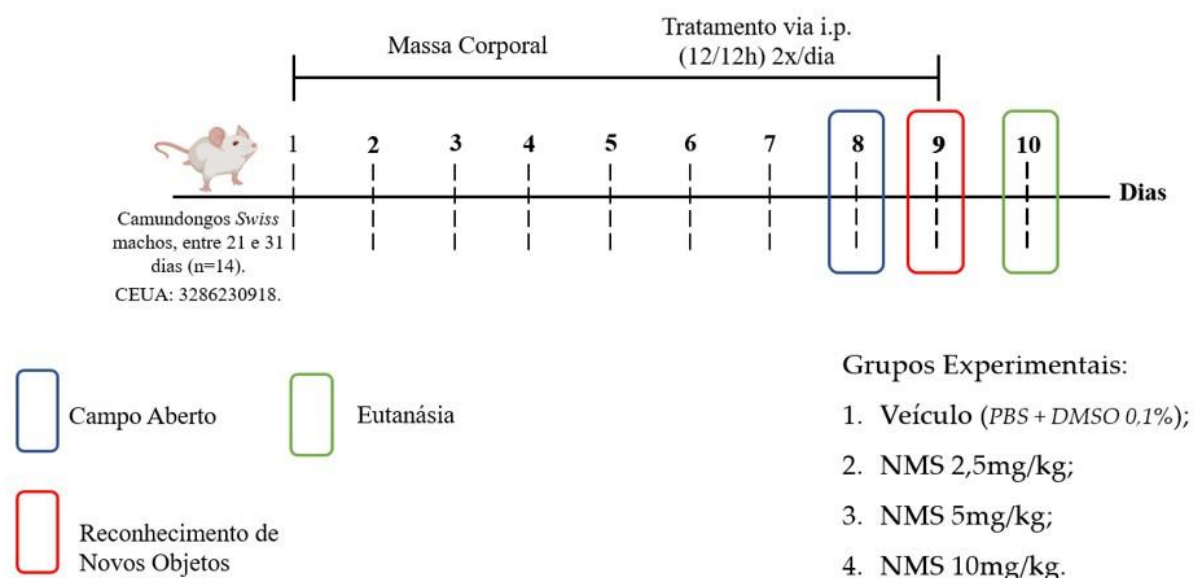


Figura 2: Representação esquemática do delineamento experimental. Parte I -Exploração e Ansiedade. Parte II – Memória.

3.4 ENSAIOS COMPORTAMENTAIS

a) Teste do Campo Aberto (TCA)

O teste do campo aberto (TCA) é uma importante ferramenta para análise da atividade locomotora e exploratória em modelos animais, no qual o comportamento de ratos e camundongos é avaliado por meio de padrões comportamentais, considerados indicativos de emocionalidade que correspondem ao comportamento do tipo-ansioso, semelhante ao observado em humanos. Na Parte I do experimento, o teste foi realizado no 3º e 5º dia de tratamento. Na Parte II, o ensaio foi feito no 8º dia de tratamento, como fase de habituação do teste de Reconhecimento de Novos Objetos (RNO). Em ambas as partes, o teste foi realizado 2 horas após a primeira administração diária.

O aparato de teste consiste em uma arena quadrangular (30 x 30 x 40 cm) feito de acrílico, com as paredes na cor cinza e fundo transparente. O aparato utilizado possui quatro arenas o que possibilita a realização simultânea de quatro testes (Figura 3). Além disso, o chão do aparato foi dividido em 16 quadrados menores e o número de quadrados cruzados (deslocamento horizontal) por cada animal foi quantificado, bem como, o deslocamento vertical (quando o animal se posicionava sobre as patas traseiras). Durante as sessões de teste, cada camundongo foi gentilmente colocado no centro de cada arena e, a exploração dos animais foi registrada com uma câmera de vídeo posicionada acima do aparato, durante um intervalo de tempo de 5 minutos. Após cada sessão, o aparato foi limpo com álcool a 10% para eliminar possíveis pistas olfatórias.

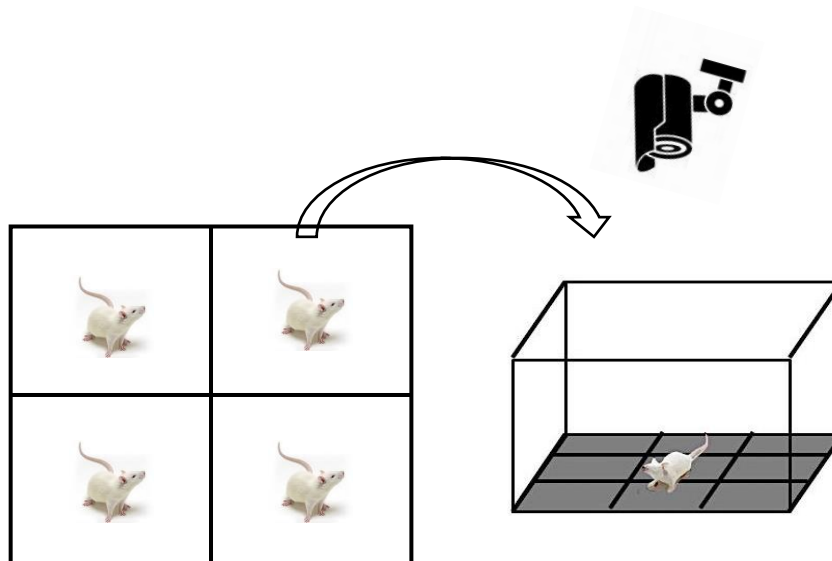


Figura 3: Representação ilustrativa do Teste de Campo Aberto.

b) Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

O teste do labirinto em cruz elevado (LCE) é um instrumento muito valioso para o estudo da ansiedade em animais. Ao avaliar o conflito entre a tendência natural dos animais em explorar um ambiente novo e em evitar situações que sejam potencialmente perigosas ou aversivas (conflito de aproximação/esquiva), o LCE permite estimar o padrão de resposta dos animais a uma droga, bem como, avaliar seus efeitos e estudar seus mecanismos de ação (HALLER; ALICKI, 2012). O teste do LCE foi realizado na Parte I do experimento, ao 7º dia de tratamento, 2 horas após a primeira aplicação do dia.

O aparato do LCE consiste em dois braços abertos e dois braços fechados opostos entre si. Os braços fechados possuem paredes laterais com 40 cm de altura, e estendem-se de um quadrado central tomando a forma de uma cruz, angulados em 90°, junto com os braços abertos (Figura 4). O aparato fica elevado a 40 cm do chão. Cada animal foi gentilmente colocado no centro do labirinto, com a cabeça voltada para um dos braços fechados, e podiam explorar livremente todo o aparato durante cinco minutos. Entre um animal e outro, era realizada a limpeza do labirinto com algodão e álcool a 10%. Foram mensurados e analisados os seguintes parâmetros comportamentais: (1) número de entradas nos braços abertos e fechados; (2) comportamentos estereotipados (3) tempo de permanência nos braços abertos e (4) tempo de permanência nos braços fechados.

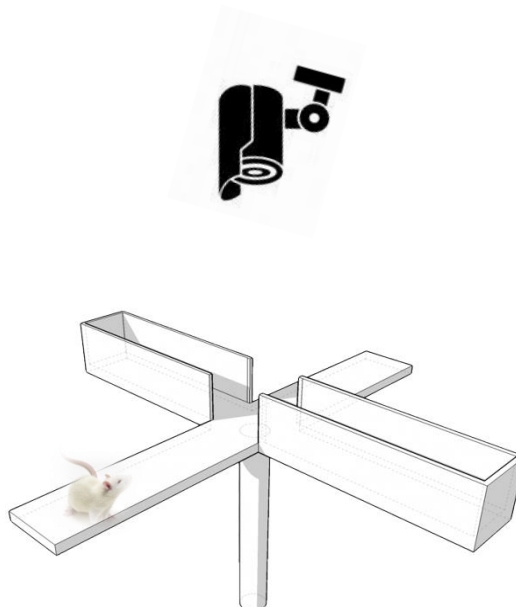


Figura 4: Representação esquemática do Labirinto em Cruz Elevado.

c) Teste claro-escuro

O teste claro-escuro assim como o LCE, também foi realizado na Parte I, e se baseia, no paradigma da novidade e é comumente utilizado em neurociência comportamental para o estudo do medo e ansiedade. Em geral, o teste se ancora na aversividade de roedores à lugares excessivamente claros e potencialmente perigosos. Tal comportamento está associado à menor exposição dos animais ao compartimento claro da caixa e ao menor número de transições entre as câmaras. Fármacos ansiolíticos aumentam o tempo que o animal permanece no compartimento claro, enquanto que drogas ansiogênicas diminuem o tempo gasto no mesmo compartimento. O teste foi realizado no último dia de tratamento dos animais (9º dia), 2h após a primeira administração.

O aparato consiste de uma caixa de plástico com chão transparente (21 x 42 x 25 cm), o qual foi dividido em duas câmaras de tamanhos iguais, por uma divisória com uma porta que conecta as duas áreas (Figura 5). Uma das câmaras possuía paredes brancas (câmara clara), e a outra, paredes escuras (câmara escura). Os camundongos foram gentilmente colocados no centro da câmara clara e permitidos se mover livremente entre as câmaras por 5 minutos. O tempo gasto em cada uma das câmaras e o número de transições entre elas foram registrados por uma câmera de vídeo posicionada acima do aparato.

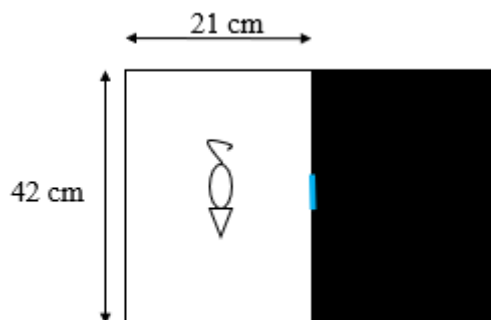


Figura 5: Representação esquemática da Caixa Claro-Escuro.

d) Teste de Reconhecimento de Novos Objetos (RNO)

O teste de reconhecimento de novos objetos (RNO) consiste na tendência natural do animal em explorar muito mais um objeto novo em detrimento de um objeto familiar (“habitual”), num contexto conhecido. O teste é muito utilizado para estudar a memória de curto e de longo prazo, por meio da manipulação do intervalo de tempo entre a fase de treino e a fase de teste (TAGLIALATELA et al., 2009). O ensaio experimental foi realizado somente na Parte II do experimento, com o mesmo aparato de campo aberto quadrangular utilizado na Parte I. Empregamos como objetos dois cones idênticos pequenos, na cor branca, e feitos de porcelana. Após cada tentativa, o aparato e os objetos foram, cuidadosamente, limpos com álcool a 10% para remoção de possíveis pistas olfativas.

O procedimento de teste foi baseado no protocolo publicado por Bevins e Besheer, 2006 (BEVINS; BESHEER, 2006) O teste de RNO consistiu de três fases: habituação, treino e teste. A primeira fase (habituação) ocorreu no 8º dia após início do tratamento, em que foi permitido aos animais explorarem o aparato livremente na ausência dos objetos durante cinco minutos. Vinte e quatro horas após a sessão de habituação, os animais foram submetidos à sessão de treino com intervalo de duração de 5 minutos cada, contendo os dois objetos iguais (cones de porcelana). Após a sessão de treino, cada animal foi devolvido à sua gaiola de origem. Posteriormente, após um intervalo de retenção de 30 minutos, os animais foram recolocados nas arenas contendo agora um objeto familiar (idêntico ao apresentado na sessão de treino) e um objeto novo. Aos animais foi permitido explorar livremente o aparato por um intervalo de 5 minutos, durante o qual foram mensurados o tempo de exploração de cada objeto. O teste foi registrado por uma câmera de vídeo posicionada acima do aparato. A Figura 6 apresenta o protocolo experimental do teste RNO.

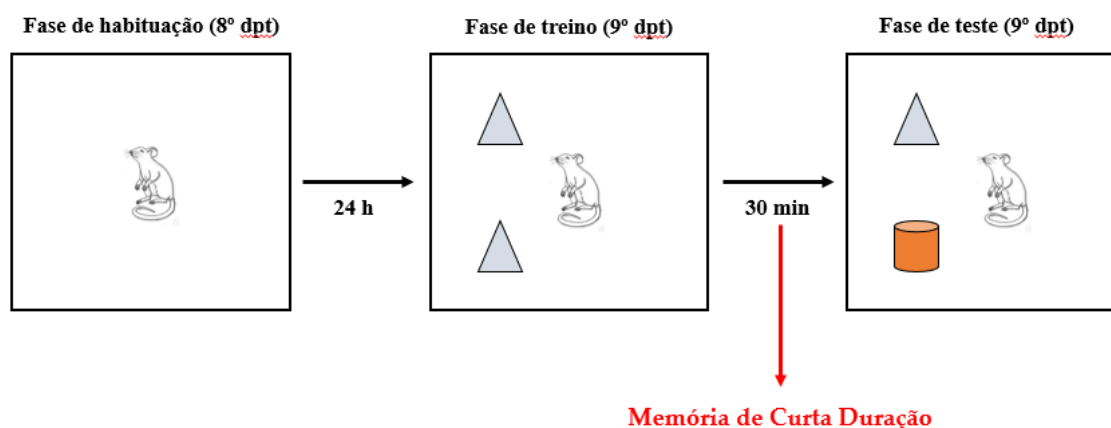


Figura 6: Representação esquemática do Teste de Reconhecimento de Novos Objetos.

3.5 ENSAIOS BIOQUÍMICOS

Após os 9 dias de tratamento com o inibidor NMS, no 10º dia, os animais foram eutanasiados por meio do deslocamento cervical. Em seguida, todo o encéfalo foi removido, e posteriormente, separado as áreas: córtex (Cx) e hipocampo (Hc). Logo após, foi preparado um homogenato de cada uma das áreas separadamente com solução salina (NaCl 0,9%). A seguir, os homogenatos foram centrifugados a 4000 rpm durante 2 minutos a 4°C para a obtenção dos sobrenadantes, os quais foram coletados e armazenados para a realização dos ensaios bioquímicos em cada uma das áreas cerebrais.

a) Ensaio de peroxidação lipídica

Para a determinação da lipoperoxidação, primeiramente se calculou a concentração de proteínas no homogeneizado de cada uma das áreas cerebrais separadamente, por meio do método de Bradford, o qual utiliza como padrão solução de albumina bovina, cujos resultados foram obtidos por espectrofotometria e expressos em mg/mL.

A avaliação quantitativa da peroxidação lipídica nas duas áreas dissecadas (Cx e Hc) foi realizada conforme descrito previamente por Winterbourn (WINTERBOURN; GUTTERIDGE; HALLIWELL, 1985). O malondialdeído (MDA) é um produto secundário da peroxidação lipídica e tem sido amplamente utilizado como um biomarcador desse processo. A concentração dos níveis de MDA foi determinado pelo método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), e a absorbância foi lida em um espectrofotômetro Spectra mas plus 384-Molecular Devices Brasil, com

comprimento de onda de 532 nm. Os resultados foram expressos como nano mol de MDA por miligrama de proteína (nmol/mg proteína).

b) Quantificação de nitrito (NO₂⁻)

Nitrito é um indicador da produção de Óxido Nítrico (NO). NO é uma molécula de sinalização intracelular com várias ações neuromodulatórias no Sistema Nervoso Central. A concentração de nitrito no sobrenadante foi determinada por ensaio colorimétrico utilizando reagente de Greiss [0,1% de dicloridrato de N- (1-naftil) etilenodiamina, 1% de sulfanilamida e 2,5% de ácido fosfórico] conforme descrito previamente por Green (GREEN et al., 1982). Volumes iguais do sobrenadante e do reagente de Greiss (50 µL) foram adicionados e misturados em uma placa e incubados por 10 minutos em temperatura ambiente, protegidos da luminosidade. Logo após, a absorvância foi lida em um espectrofotômetro, modelo Spectra mas plus 384-Molecular Devices Brasil, com comprimento de onda de 550 nm.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística baseou-se sobre a Análise de Variância (ANOVA) com um e dois critérios, seguidas de pós-teste de Turkey ou Bonferroni, aplicada, utilizando o software Graph Prism, com nível de significância considerado de 95% ($p \leq 0,05$). Todos os dados foram expressos como média e erro padrão da média (EPM).

4. RESULTADOS

4.1 MASSA CORPORAL

Ao longo de todo o experimento os animais foram pesados, diariamente, a fim de avaliar a variação de massa entre os grupos experimentais. Nossos resultados demonstraram que não houve diferença estatística significativa entre os grupos tratados ($p>0,05$), e nem entre os tratados em relação ao grupo veículo ao longo dos 9 dias de experimento; o aumento de massa entre os animais ocorreu de modo proporcional, indicando que as três doses do inibidor administrada (NMS 2,5mg/kg, NMS 5mg/kg e NMS 10mg/kg) não interfere no aumento de massa fisiológico apresentado no período infantil desses animais. A Figura 7 mostra o aumento de massa dos animais ao longo dos dias de experimento.

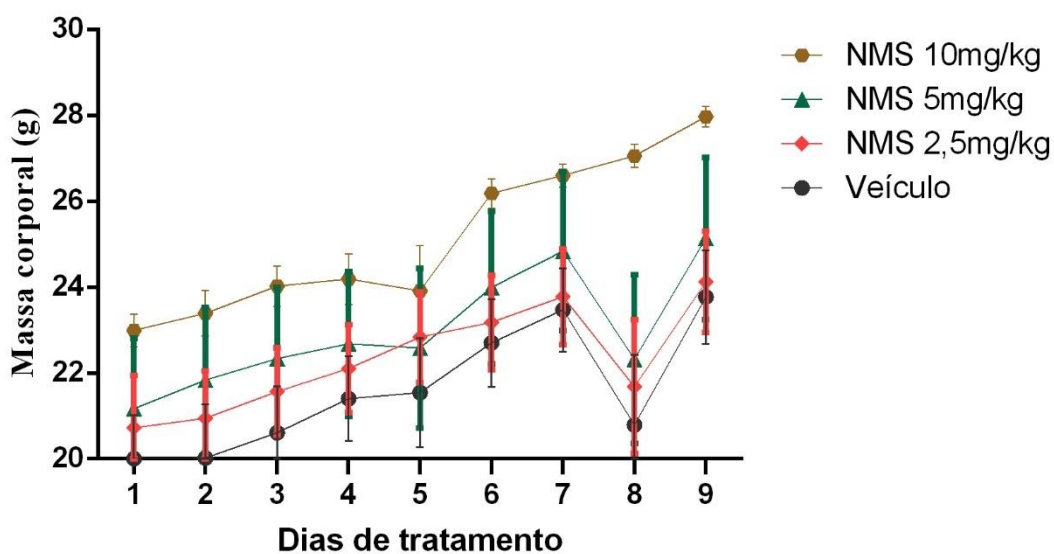
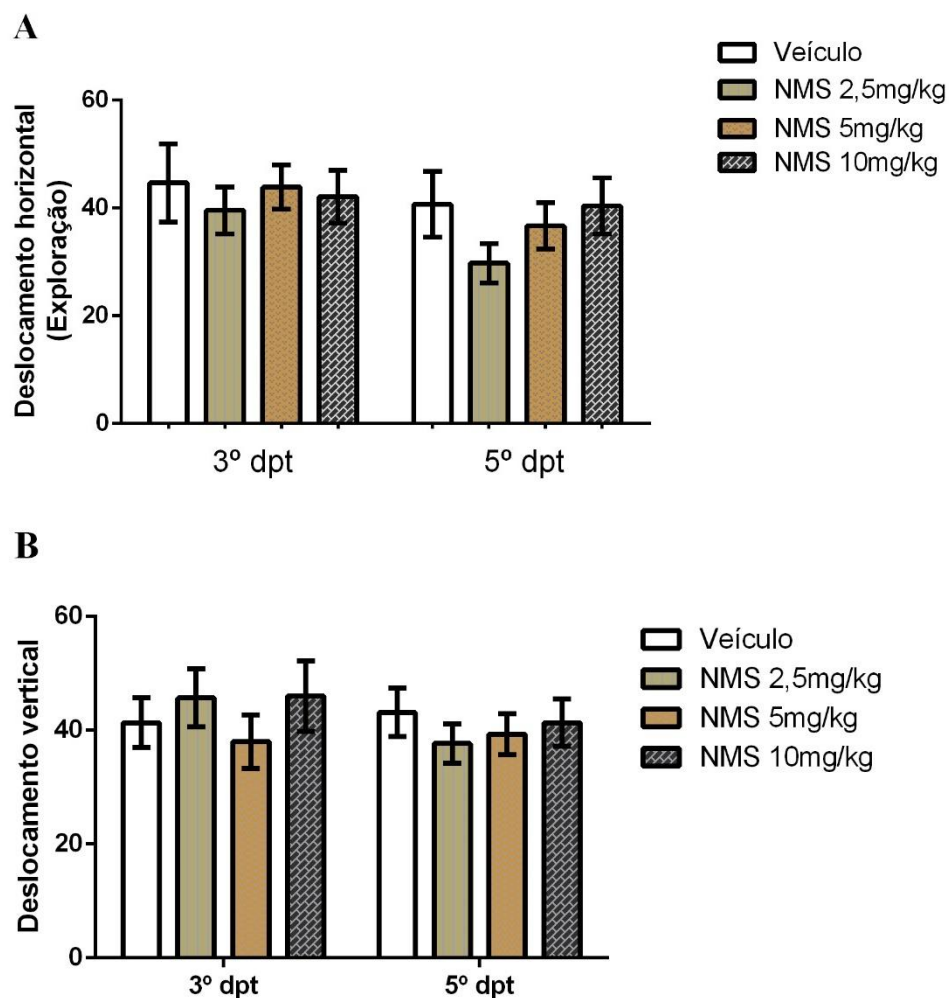


Figura 7: Efeitos da inibição de COX-2 sobre a massa corporal. Os valores são representados como média \pm erro padrão da média (EPM). ANOVA de duas vias seguida pelo teste post hoc de Bonferroni; $p>0,05$; $n=9$ por grupo.

4.2 TESTE DE CAMPO ABERTO (TCA)

Os animais foram submetidos ao TCA no 3º e 5º dia de tratamento, na Parte I do experimento. A análise do comportamento exploratório, isto é, o número de quadrados

cruzados (deslocamento horizontal, Figura 8A) por cada animal, revelou que não houve diferença estatística significativa entre os grupos avaliados em ambos os dias ($p>0,05$); do mesmo modo, o deslocamento vertical (Figura 8B) também indicou que não houve diferença estatística entre os grupos avaliados, o que nos possibilitou inferir que não houve comprometimento motor associado à atividade exploratória dos animais. Em contrapartida, apesar de não expressar significância estatística, os animais do grupo que receberam a dose de NMS 2,5mg/kg apresentaram uma tendência em diminuir o deslocamento horizontal na segunda vez em que foram submetidos ao aparato, durante a segunda sessão de teste, no quinto dia pós início do tratamento (5° dpt). Na Figura 8 são exibidos os efeitos da inibição de COX-2 sobre o deslocamento horizontal e vertical por cada grupo submetido ao TCA.



(Legenda na página seguinte)

Figura 8: Efeitos da inibição de COX-2 sobre o deslocamento horizontal e vertical em camundongos submetidos ao TCA. Os animais foram submetidos à duas sessões de testes, uma no dia 3 (3° dpt) e outra no dia 5 (5° dpt) pós início do tratamento. A) Deslocamento horizontal. B) Deslocamento vertical. Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). ANOVA de duas vias seguida pelo teste post hoc de Bonferroni; $p > 0,05$; $n = 9$ por grupo.

4.3 LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO (LCE)

A análise do comportamento tipo-ansioso no LCE foi realizada no sétimo dia pós início do tratamento (7° dpt) e uma única vez, 2h após a primeira administração diária de NMS. A Figura 9 mostra o efeito da inibição de COX-2 sobre o número de entradas em ambos os braços do aparato, bem como, os comportamentos estereotipados apresentados pelos animais submetidos ao LCE. Nossos resultados não revelaram diferença estatística significativa em relação ao grupo veículo quando comparados o número de entradas nos braços abertos ou fechados (Figura 9A). Entretanto, numa comparação intragrupo, os dados sugerem que os animais tratados com as maiores doses do inibidor NMS (5 e 10mg/kg), realizaram, em média, um maior número de entradas nos braços fechados em relação aos braços abertos do aparato (Figura 9A), o que pode ser tomado como um comportamento ansiogênico, uma vez que os animais se expõem menos ao ambiente externo, considerado um ambiente potencialmente aversivo.

No LCE outros comportamentos podem ser avaliados para mensurar a avaliação de risco (“*risk assessment*”) e o comportamento defensivo do animal, a saber: *Stretched* (espreitas), *Head Dippings* (exploração com a cabeça abaixo do chão dos braços abertos) e *Grooming* (autolimpeza). Dessa forma, nossos resultados demonstraram que os animais dos grupos NMS 2,5mg/kg e NMS 5mg/kg apresentaram um aumento no número de espreitas (*Stretched*) quando comparados ao grupo veículo (Figura 9B). Por outro lado, os grupos NMS 5mg/kg e NMS 10mg/kg apresentaram uma diminuição no número de *Head Dippings* em comparação com os grupos veículo e o NMS 2,5mg/kg. Não houve diferença estatística significativa no número de *Grooming* entre os grupos avaliados. A Figura 9B exhibe as análises de tais comportamentos.

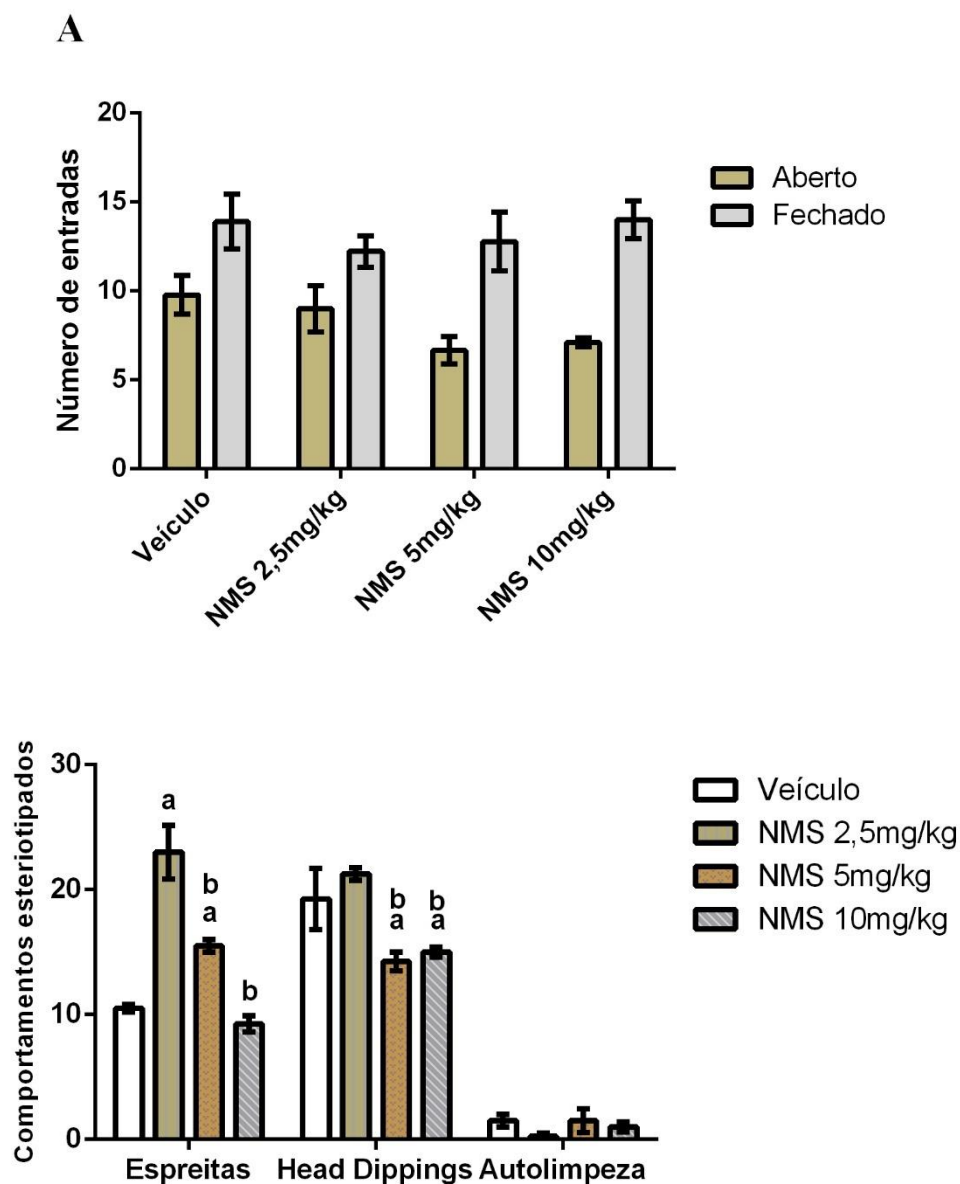


Figura 9: Efeitos da inibição de COX-2 sobre o número de entradas aos braços abertos e fechados e os comportamentos estereotipados por animais expostos ao LCE. A) Número de entradas aos braços abertos e fechados do LCE. B) Comportamentos estereotipados. Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). ANOVA de duas vias seguida pelo teste post hoc de Tukey; (a) indica $p < 0,05$ em comparação com o grupo veículo; (b) indica $p < 0,05$ em comparação com o grupo NMS 2,5 mg/kg; $n = 9$ por grupo.

A Figura 10 representa o tempo de permanência de cada grupo exposto aos braços abertos e fechados do LCE. Nossos resultados indicaram que os animais que receberam as duas maiores doses do inibidor NMS (5mg/kg e 10mg/kg, respectivamente) permaneceram por menos tempo nos braços abertos em comparação com o grupo veículo (Figura 10A) ($p < 0,05$). Além disso, quando avaliado o tempo gasto no braço fechado, o grupo que recebeu a dose de NMS 10mg/kg passou mais tempo nos braços fechados quando comparado com o grupo veículo (Figura 10B). Tais resultados complementam os resultados anteriores (Figura 9B) e refletem o comportamento defensivo apresentado por roedores expostos a ambientes novos e potencialmente perigosos, em permanecer em áreas fechadas e seguras, bem como, um possível efeito ansiogênico induzido pela inibição de COX-2.

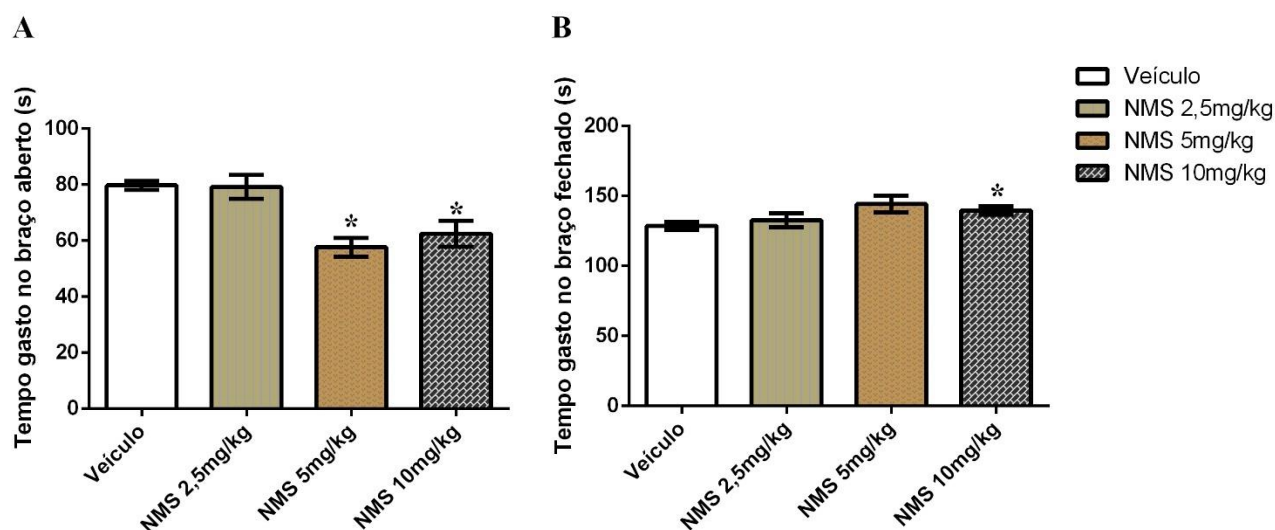
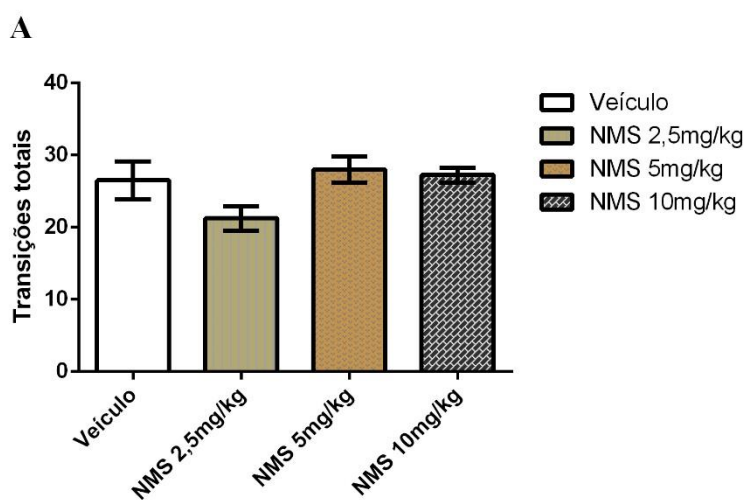


Figura 10: Efeitos da inibição de COX-2 sobre o tempo gasto nos braços abertos e fechados do LCE. A) Tempo gasto nos braços abertos. B) Tempo gasto nos braços fechados. Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). ANOVA de uma via seguida pelo teste post hoc de Tukey; (*) indica $p < 0,05$, em comparação ao grupo veículo; $n = 9$ por grupo.

4.4 TESTE CLARO/ESCURO

A Figura 11 mostra o resultado do efeito da inibição de COX-2 sobre os níveis de ansiedade em animais submetidos ao teste da caixa claro/escuro. O número de transições totais, a latência para sair do compartimento escuro e entrar no claro (latência para a segunda transição), bem como o tempo de permanência em cada compartimento, foram mensurados e comparados entre os grupos.

Nossos resultados revelaram que o número de transições totais entre os compartimentos claro-escuro, não evidenciaram efeitos significativos nas três doses de NMS entre os grupos, indicando que, em média, todos os animais exibiram um número similar de transições entre os compartimentos, e portanto, não houve diferença na exploração (Figura 11A), semelhante ao observado no TCA. Em contrapartida, o parâmetro da latência de segunda transição (escuro para o claro) revelou que os animais do grupo NMS 10mg/kg exibiram uma diminuição significativa em comparação ao grupo veículo, e também, em comparação ao grupo NMS 5mg/kg (Figura 11B). Não houve diferença no tempo de permanência em ambos os compartimentos nos animais tratados com o inibidor quando comparados com o grupo veículo (Figura 11C).



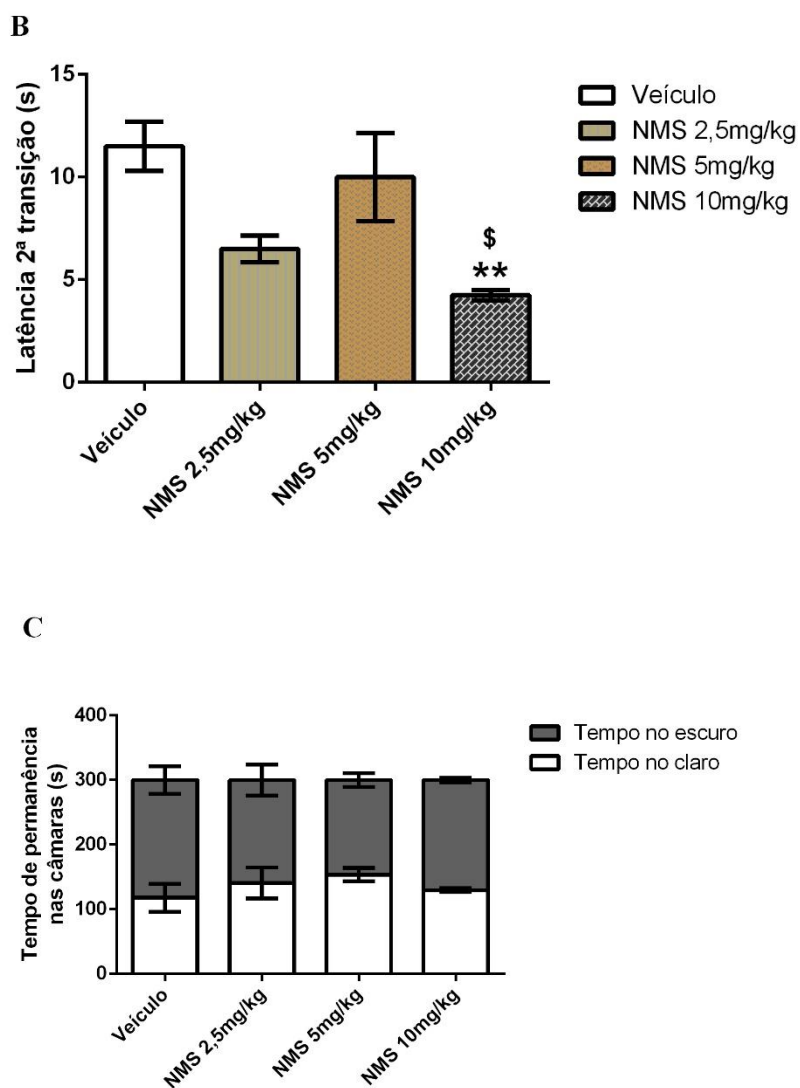
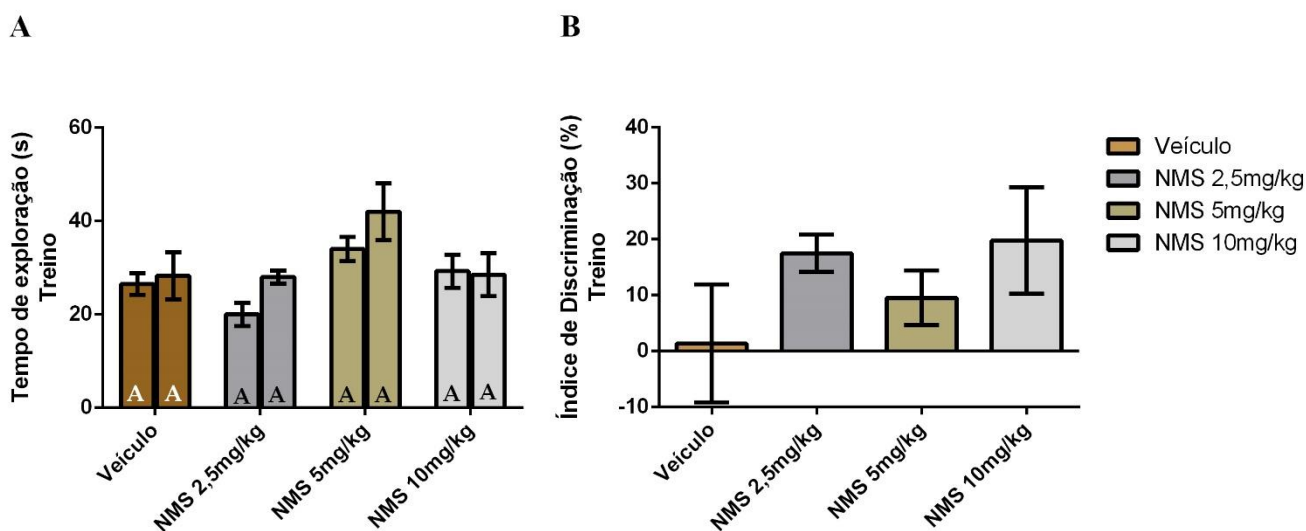


Figura 11: Efeitos da inibição de COX-2 sobre o comportamento tipo-ansioso em animais submetidos ao teste da caixa claro-escuro. A) Número absoluto de transições totais entre os compartimentos claro e escuro; B) Latência de segunda transição (do escuro para o claro); C) Comparação do tempo de permanência na zona clara e escura do aparato. Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM); (**) indica $p < 0,01$, em comparação ao grupo veículo e (\$) indica $p < 0,05$ em comparação com o grupo NMS 5 mg/kg; $n = 4$ por grupo.

4.5 TESTE DE RECONHECIMENTO DE NOVOS OBJETOS (RNO)

No RNO, na fase de treino, todos os grupos gastaram tempo semelhante explorando os dois objetos iguais (Figura 12A) e não houve diferença significativa no índice de discriminação (ID) entre eles (Figura 12B). No entanto, na fase de teste, todos os animais exploraram por mais tempo o objeto novo (Figura 12C), indicando que todos reconheceram que havia um novo objeto. Conforme mostrado na Figura 12D, os animais do grupo 3, tratados com o inibidor na dose de 5mg/kg tiveram uma diminuição no ID quando comparados ao grupo NMS 2,5mg/kg; não houve diferença em comparação ao grupo veículo ($p>0,05$).



(Legenda na página seguinte)

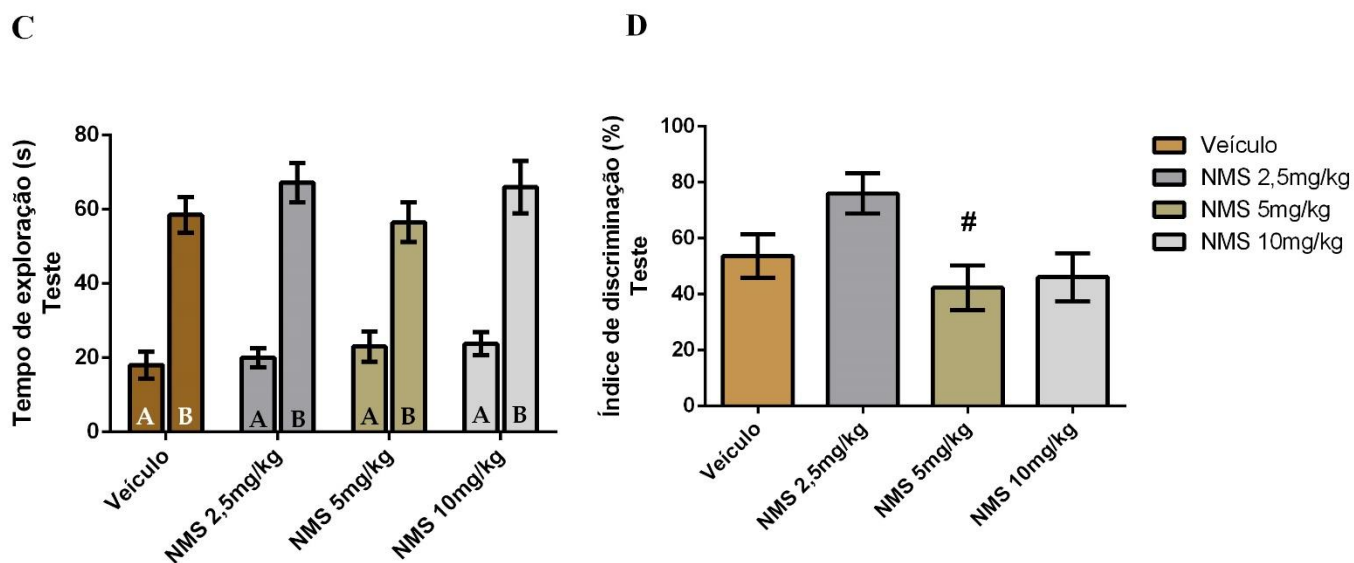
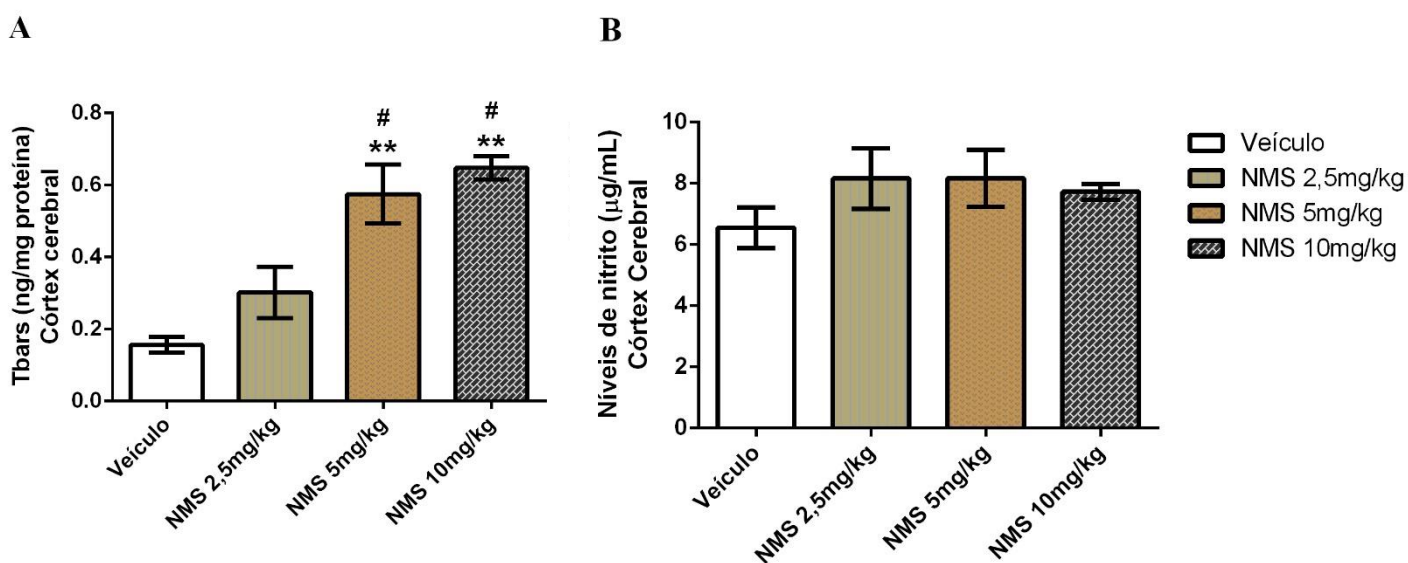


Figura 12: Efeitos da inibição de COX-2 sobre a memória de reconhecimento em animais submetidos ao teste de RNO. **A)** Tempo de exploração de cada objeto na fase de treino. **(A)** representa objeto familiar. **(A^a)** representa objeto familiar. **(B)** Índice de Discriminação na fase de treino. **C)** Tempo de exploração de cada objeto na fase de teste. **(B)** representa objeto novo. **D)** Índice de Discriminação na fase de teste. Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). (*) indica $p=0,05$ em comparação ao grupo Veículo; (#) indica $p<0,05$ em comparação com o grupo NMS 2,5mg/kg; n= 4 por grupo.

4.6 ENSAIOS BIOQUÍMICOS

A inibição de COX-2 via administração de NMS revelou diferenças significativas nos níveis de peroxidação lipídica (TBARs) e nitrito (NO_2^-), em diferentes áreas cerebrais avaliadas (Figura 13). No córtex cerebral (Cx), o tratamento com as duas maiores doses



de NMS (5mg/kg e 10mg/kg, respectivamente) induziu um aumento na peroxidação lipídica conforme demonstrado pelo aumento significativo dos níveis de TBARs comparado ao grupo veículo ($p < 0,05$) (Figura 13A). Contudo, no que se refere aos níveis de nitrito no Cx, não foi observado nenhuma significância entre os grupos (Figura 13B). Na região do hipocampo (Hc), a inibição de COX-2 induziu um aumento na peroxidação lipídica, revelado pela elevação nos níveis de TBARs (Figura 13C), e também, nos níveis de nitrito em comparação ao grupo veículo ($p < 0,05$) (Figura 13D). Esses resultados nos sugerem que a inibição de COX-2 pode modular o perfil oxidativo do encéfalo em diferentes regiões cerebrais.

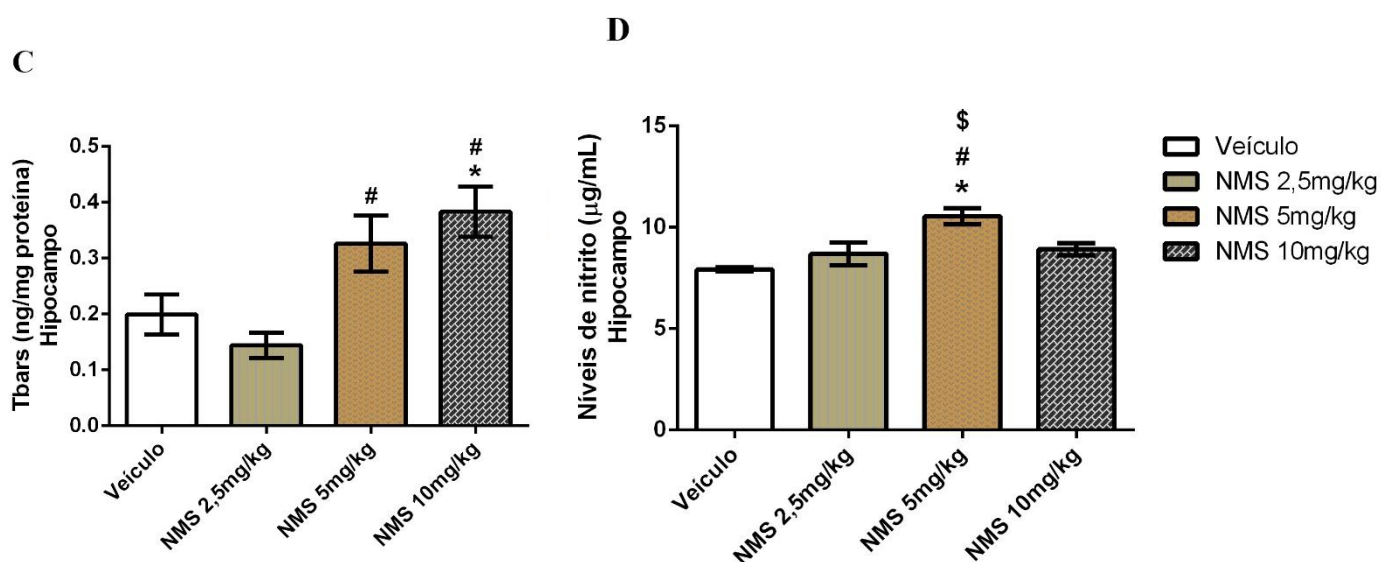


Figura 13: Efeitos da inibição de COX-2 sobre o perfil oxidativo cortical e hipocampal. **A)** Níveis de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARs) aumentados no Córtex (Cx) de animais infantis. **B)** Níveis de nitrito no Córtex de animais infantis. **C)** Níveis de TBARs aumentados no hipocampo (Hip). **D)** Níveis de nitrito aumentados no hipocampo de animais em período infantil. Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). (*) indica $p=0,05$ em comparação ao grupo Veículo; (#) indica $p<0,05$ em comparação com o grupo NMS 2,5mg/kg; (\$) indica $p < 0,05$ em comparação ao grupo NMS10 mg/kg; n= 9 por grupo.

5. DISCUSSÃO

Os AINEs constituem a classe de medicamentos mais prescritos na pediatria e alguns deles são isentos de prescrição médica, favorecendo o uso “*off label*” (FERREIRA; LOPES, 2016). Além do mais, alguns são proibidos para uso em pacientes com idades inferior a 12 anos. As enzimas COXs sobre as quais esses medicamentos atuam (Figura 1), participam de processos que incluem a modulação da atividade e expressão de genes inflamatórios, desenvolvimento, formação de memória, cognição e comportamento. Entretanto, em sujeitos não inflamados e infantis, os efeitos centrais da inibição de COX-2 são poucos explorados.

Diante disso, o presente estudo, buscou avaliar os efeitos da inibição de COX-2 em relação ao comportamento, a atividade exploratória e o estresse oxidativo em camundongos *Swiss* infantis saudáveis.

Em primeiro lugar, nossos resultados sobre o ganho de massa dos animais demonstraram que a inibição de COX-2 não alterou significativamente o aumento de massa corporal apresentado durante o período de infância em camundongos (CHORILLI; MICHELIN; SALGADO, 2007; DUTTA; SENGUPTA, 2016) (Figura 7). Contudo, estudos em roedores demonstraram que ratos submetidos ao estresse crônico leve imprevisível (CUMS) e tratados com meloxicam (inibidor de COX-2), apresentam um aumento no peso corporal maior em comparação à animais que não receberam o tratamento (LUO et al., 2017). É sabido que o tecido adiposo além de promover proteção mecânica e atuar como isolante térmico, também atua como reservatório energético. Estudos apontam o potencial terapêutico do tecido adiposo bege no tratamento da obesidade e outros distúrbios metabólicos (HARMS; SEALE, 2013). Zhang e colaboradores (2018) relataram que as PGs mediadas pela COX-2 são essenciais para o *browning* (escurecimento) do tecido adiposo branco em camundongos deficientes de Raptor. Além disso, os autores observaram também que a ativação da sinalização COX-2/PG protege contra a obesidade induzida pela dieta (ZHANG et al., 2018), evidenciando o potencial terapêutico daquele tecido em distúrbios metabólicos e a participação direta da via de sinalização mediada pela COX-2. Essas alterações metabólicas, impactam significativamente a saúde mental de diversos indivíduos, incluindo os menores. Estudos realizados com seres humanos constataram que crianças acima do peso são mais propensas a sofrer de ansiedade e depressão em comparação com crianças com peso

normal. Realizado na Suécia, Linderberg e colaboradores (2020) mostraram que a obesidade é um fator de risco significativo para ansiedade e depressão em crianças e adolescentes, com maior propensão das meninas em comparação aos meninos (LINDBERG et al., 2020).

Em segundo lugar, a atividade exploratória e locomotora, representada pelo deslocamento horizontal no TCA, não apresentou diferença estatística significativa entre os grupos avaliados (Figura 8A), sugerindo que a inibição de COX-2 não compromete o comportamento exploratório e locomotor em animais infantis saudáveis. Nossos resultados diferem dos resultados obtidos por Wang e colaboradores (2018), conduzidos em camundongos modelos de transtorno do estresse pós traumático, cujos resultados mostraram que a inibição de COX-2 induziu um aumento na atividade exploratória, em teste de campo aberto, além de promover um efeito neuroprotetor observado pelos níveis reduzidos de citocinas próinflamatórias (WANG et al., 2018). Em contrapartida, nossos resultados foram obtidos em animais saudáveis, não inflamados e sem a indução de nenhum modelo, o que nos permitiu inferir que a inibição de COX-2 constitutiva não influencia o comportamento exploratório e locomotor.

Interessantemente, um estudo realizado por AM e colaboradores (2016) também em camundongos, associaram o aumento observado na atividade exploratória (deslocamento horizontal) no TCA com uma melhora no aprendizado e na memória espacial (AM et al., 2016). Além do mais, sob condições de estresse induzido pela administração crônica de corticosterona, o tratamento agudo e repetitivo com um inibidor seletivo de COX-2 reduz o comportamento tipo-ansioso em comparação com camundongos naive adultos (MORGAN et al., 2019a). Esses achados suportam a ideia de que a COX-2, sob condições patológicas, promove alterações na atividade exploratória, na memória e tem um papel importante na fisiopatogênese da ansiedade.

Seguidamente, a fim de avaliar os efeitos da inibição de COX-2 em camundongos saudáveis sobre o comportamento tipo-ansioso, os animais foram submetidos ao teste do LCE. Nossos resultados mostraram que os animais tratados com as maiores doses do inibidor NMS (5mg/kg e 10mg/kg) apresentaram um comportamento tipo-ansioso refletido pelos comportamentos de avaliação de risco (Figura 9B) e pela diminuição no tempo gasto nos braços abertos do labirinto em cruz (Figura 10A). Ainda, os animais tratados com a dose de NMS 10mg/kg permaneceram por mais tempo nos braços fechados quando comparados ao grupo veículo (Figura 10B), sugerindo um comportamento

ansio gênico. Tais achados demonstram dados, em geral, contrários aos estudos que buscam avaliar a atividade de fármacos em animais expostos ao LCE. Em tais estudos, ao serem administrados com a droga em questão, os animais tendem a explorar e a permanecer por mais tempo nos braços abertos, configurando um efeito ansiolítico do fármaco avaliado (MESFIN; ASRES; SHIBESHI, 2014; WANG et al., 2018). A propósito, a maioria desses estudos utilizam animais adultos de diferentes linhagens, enquanto nossos resultados foram obtidos em animais *Swiss* em período infantil, de acordo com a relação de Dutta e Sengupt (2016).

Curiosamente, a inibição farmacológica de COX-2 vem obtendo resultados promissores em modelos animais pré-clínicos no tratamento de comportamentos tipo-ansioso e tipo-depressivo (GAMBLE-GEORGE et al., 2016; HERMANSON et al., 2013). Nesse contexto, um estudo recente, publicado por Morgan e colaboradores em um modelo de estresse crônico induzido pela administração de corticosterona (CORT), mostrou que a inibição seletiva de COX-2 reverteu o comportamento tipo-ansioso induzido por CORT avaliado no teste do LCE, além de normalizar as correntes glutamatérgicas excitatórias dos neurônios basolaterais da amígdala anterior (MORGAN et al., 2019b). Acrescido à isso, um outro estudo demonstrou uma alteração na via de sinalização de COX-2 cortical, e que esse desequilíbrio está envolvido nos mecanismos patofisiológicos da depressão (CHEN et al., 2017).

Outro teste bastante utilizado para avaliar o comportamento tipo-ansioso em animais é o teste da caixa claro-escuro. Nossos resultados sobre esse teste revelaram que a atividade exploratória (Figura 11A), não expressou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, corroborando com os resultados observados no TCA (Figura 8A). Da mesma forma, não houve diferença no tempo gasto nos compartimentos claro/escuro do aparato (Figura 11C). Esses resultados, em conjunto, demonstram que a inibição de COX-2 em animais submetidos ao TCE não apresentam um comportamento tipo-ansiolítico e nem tipo-ansioso, e, portanto, são contrários aos resultados obtidos no LCE (Figura 9 e Figura 10), cujo comportamento, discutido anteriormente, foi de caráter ansio gênico.

Esses resultados, *a priori*, antagônicos sobre o papel da COX-2 nos diferentes testes de avaliação de ansiedade, encontram sustento em estudos iniciais com o LCE realizados na segunda metade do século XX, que interpretaram a esquiva dos animais aos braços abertos como sendo gerada pela novidade, e também, pela altura do braço aberto

em relação ao solo, concluindo, portanto, que o LCE seria um teste comportamental motivado pelo medo (HANDLEY; MITHANI, 1984).

A resposta adaptativa à ameaça é crucial para a sobrevivência. Medo e ansiedade são dois aspectos emocionais diferentes que promovem comportamentos defensivos. Desse modo, enquanto a ansiedade é provocada por uma ameaça potencial não identificável, o medo, ao contrário, é uma ameaça iminente e propicia comportamentos de fuga (DEBIEC; OLSSON, 2017). Ainda, outros estudos corroboram que o comportamento observado no LCE pode ser potencializado pelo medo, refletindo um estado de ansiedade aumentado (KORTE; BOER, 2003). Dessa forma, inferimos que o teste da caixa claro-escuro por estar no mesmo plano em relação ao solo, isto é, por não possuir áreas suspensas e abertas, tal como os braços abertos do LCE, logo, não provocaria medo e não geraria um estado de ansiedade, o que explicaria a não observação de um comportamento ansiogênico visto no LCE. Somado à isso, evidências vêm sugerindo que as prostaglandinas mediadas pela COX-2 estão envolvidas no aprendizado de medo contextual, afetando também a memória de trabalho e espacial (HEIN et al., 2007).

O aprendizado de medo social (AMS) e sobretudo o contexto social, possui um poderoso papel na regulação do medo adquirido indiretamente por meio da transmissão social, podendo ser classificado em duas formas: (I) instruído (comando verbal) e (II) observacional. O AMS observacional integra pistas visuais, auditivas e olfatórias, as quais promovem mudanças na atividade autonômica, gerando respostas comportamentais, tais como imobilidade, *freezing* e comportamentos de esquiva (DEBIEC; OLSSON, 2017).

Além da administração de um fármaco ou droga, fatores como idade e diferentes condições de teste, também podem influenciar a expressão de comportamentos relacionados à ansiedade em roedores. A fim de avaliar os impactos biológicos e ambientais sobre o desempenho de tarefas no LCE, Albani e colaboradores (2015) utilizaram ratos com três semanas ou mais de idade sobre diferentes condições teste. Os autores demonstraram que animais jovens sob condição de alta iluminação tendem a explorar mais os braços abertos do LCE, enquanto que, os animais mais velhos, tendem a explorar as áreas abertas em uma condição de baixa iluminação, além de possuírem um nível de corticosterona mais elevado (ALBANI et al., 2015). Um estudo conduzido por Shoji e Miyakawa (2018) realizado em roedores, demonstrou alterações comportamentais associadas à idade, exibidas pela diminuição da atividade exploratória e pela expressão

de comportamento tipo-ansioso em animais idosos em comparação com animais jovens e de média idade (SHOJI; MIYAKAWA, 2019). Por outro lado, estudos sobre os efeitos dos inibidores seletivos e não seletivos de COX-2 têm sido conduzidos em camundongos modelos de estresse crônico, e alguns desses, dentre eles, a nimesulida, atenuaram as alterações comportamentais e os danos oxidativos em animais modelo da doença (KUMAR; KUMARI; KUMAR, 2010).

Com relação à avaliação do estresse oxidativo nas diferentes áreas cerebrais, os resultados obtidos no presente estudo indicam que, em cada área cerebral, a inibição de COX-2 induziu variações nos níveis de marcadores do estresse oxidativo (Figura 13). É um consenso que o estresse oxidativo apresenta um papel de suma importância na patofisiologia de inúmeras doenças cognitivas e neurodegenerativas, incluindo a doença de Parkinson (DP), Alzheimer (DA) e a depressão (LINDQVIST, 2016). Esse fenômeno pode ser definido como um desequilíbrio acentuado entre a geração das ERONs e as defesas antioxidantes do organismo. Apesar dos seus efeitos deletérios, as ERONs estão envolvidas em processos fisiológicos de extração de energia das moléculas orgânicas, na defesa imune e no processo de sinalização celular (LIGUORI et al., 2018).

Consistente com relatos anteriores (WANG; MARKESBERY; LOVELL, 2006), nossos resultados sobre o perfil oxidativo nas diferentes regiões cerebrais demonstraram níveis aumentados de peroxidação lipídica no córtex cerebral e hipocampo (Figura 13). Variações regionais nos níveis de estresse oxidativo resultam de diferenças nos níveis de defesa antioxidante e nas taxas de consumo de oxigênio. Nossos resultados indicaram que, no córtex cerebral dos animais submetidos ao tratamento com o inibidor, os níveis de peroxidação lipídica aumentaram de forma dose dependente (Figura 13). Tais resultados corroboram estudos que mostram altos índices de danos oxidativos ao DNA mitocondrial nos lobos frontal, parietal e temporal, classificando o estresse oxidativo como um grande contribuinte para a patogênese e progressão de diversas doenças (ANSARI A.; SCHEFF W., 2010).

Mais ainda, o tratamento com o inibidor promoveu um aumento nos níveis dos marcadores TBARs e NO_2^- no hipocampo de camundongos quando comparados com animais veículo (Figura 13). É sabido que o hipocampo faz parte de um conjunto de estruturas subcorticais definidas como sistema límbico (SL), sendo uma região de intensa proliferação celular (neurogênica), capaz de modular o humor, a cognição, o aprendizado e a memória (JURKOWSKI et al., 2020). Estudos atestam que o processo de

envelhecimento culmina na perda progressiva das funções de órgãos e tecidos (FLATT, 2012), e essa perda é diretamente associada ao dano oxidativo ocasionado às biomoléculas (LIGUORI et al., 2018). Nesse contexto, um trabalho publicado por McGuinness e colaboradores (2017), buscou avaliar se o tratamento com indometacina (inibidor seletivo de COX-2) poderia melhorar a habilidade espacial e a neurogênese hipocampal de animais idosos. Os autores encontraram que a administração de indometacina promoveu um aumento no número e na densidade de novos neurônios hipocampais em animais idosos (MCGUINNESS et al., 2017). Em contrapartida, a peroxidação lipídica observada no hipocampo, representada pelo aumento nos níveis de TBARs (Figura 13), está envolvida em processos como câncer, doenças cardiovasculares e neurodegeneração (AYALA; MUÑOZ; ARGÜELLES, 2014).

Importantemente, estudos anteriores têm demonstrado a associação entre o estresse oxidativo e distúrbios de ansiedade, transtornos do pânico e transtorno obsessivo-compulsivo (HASSAN et al., 2014). Em concordância com esses estudos, em humanos, um relato de caso de psicose aguda induzida por medicação, foi atribuída ao uso de indometacina (TÜRKOĞLU, GOZDE; TÜRKOĞLU, SERHAT; KAYALI, SEHER; KARAHAN, 2016). Em linha com esses achados, nossos resultados demonstram que o tratamento com o inibidor seletivo NMS aumentou os níveis de peroxidação lipídica hipocampal (Figura 13), apoiando resultados anteriores que sugerem o papel prejudicial da peroxidação lipídica em fenômenos como aprendizado, memória e transtorno do pânico (ANSARI A.; SCHEFF W., 2010; LIGUORI et al., 2018). Tais dados confirmam o papel da COX-2 nos mecanismos de indução de estresse oxidativo cerebral, podendo desequilibrar diversas funções no organismo como, a manutenção da homeostase, a plasticidade sináptica e a neurogênese (ROUZER; MARNETT, 2009; STRAUSS, 2008; YANG; CHEN, 2008).

O óxido nítrico (NO) possui diversas ações neuromodulatórias à nível de SNC, sendo importante também no sistema cardiovascular e nas defesas do hospedeiro (RITTER; FRCP; FMEDSCI, [s.d.]). Desse modo, tem um importante papel na percepção da dor, e nos processos emocionais e cognitivos por exemplo o aprendizado e a memória (PAUL; EKAMBARAM, 2011). Estudos prévios têm mostrado o papel do NO em comportamento tipo-ansioso, na memória e cognição e na patofisiologia da enxaqueca (TAHERI et al., 2020). Ainda, outros achados relatam a interconexão entre COX-2 e NO na modulação da plasticidade sináptica (ALBRECHT, 2007). Dessa forma, os níveis

aumentados de nitrito (NO_2^-) observados no hipocampo (Figura 13) estão em linha com tais estudos e apoiam o envolvimento da COX-2 na modulação da atividade neural e sugerem possíveis déficits no domínio cognitivo.

Na Parte II do presente estudo, investigamos o efeito da inibição de COX-2 sobre a memória de reconhecimento em camundongos infantis expostos a uma tarefa de discriminação de objetos, submetidos ao teste comportamental de Reconhecimento de Novos Objetos (RNO). A habilidade de discriminar informações novas daquelas que já são conhecidas é realizada por meio da memória de reconhecimento. A tarefa de discriminação de novos objetos se baseia na tendência inata dos roedores em explorar e/ou responder à novos estímulos e tem sido um teste de grande valor nos estudos de avaliação da memória de reconhecimento em diferentes espécies, incluindo macacos (MISHKIN; DELACOUR, 1975) e humanos (FANTZ, 1964).

Nossos resultados demonstraram um efeito diminuído após o tratamento com o inibidor no grupo NMS 5mg/kg em comparação ao grupo NMS 2,5mg/kg (Figura 12D). Em estudos anteriores, desempenhados em camundongos adultos jovens, o uso de inibidores de COX-2, na dose de 10 e 20mg/kg, promoveu uma inibição substancial da neurogênese adulta (GONCALVES et al., 2010), mecanismo neural associado à aquisição de aprendizado e memória. Ainda, estudos em humanos relevaram um quadro de psicose aguda e comportamentos semelhantes à esquizofrenia em pacientes medicados com inibidores de COX-2 (TÜRKOĞLU, GOZDE; TÜRKOĞLU, SERHAT; KAYALI, SEHER; KARAHAN, 2016). Da mesma forma, em camundongos modelos de doença de Alzheimer, a superexpressão de COX-2 induziu um aumento na expressão de prostaglandinas, e, conseqüentemente, um aumento na produção de proteína β -amiloide, prejudicando ainda mais a capacidade de aprendizado dos animais, exacerbando o declínio cognitivo (GUAN et al., 2019).

Em contrapartida, outros achados em estudos com animais sugerem que a inibição de COX-2 previne déficits de memória e aprendizado em camundongos submetidos ao estresse crônico (LUO et al., 2017). Ainda, outros estudos demonstram uma relação entre COX-2 e a regulação da sinalização dos endocanabinóides (eCBs). Hermanson e colaboradores (2013), utilizando uma abordagem farmacológica em camundongos, relataram que a COX-2 é importante para a regulação dos eCBs *in vivo* e que a sua inibição reduz o comportamento tipo-ansioso via aumento da sinalização dos eCBs (HERMANSON et al., 2013).

Nessa conjuntura, grandes esforços têm sido empregados na tentativa de identificar o nível de expressão de COX-2 constitutiva durante o envelhecimento em indivíduos saudáveis. Estudos com marcação imuno-histoquímica têm registrados níveis diminuídos na expressão de COX-2 constitutiva hipocampal em camundongos com 24 meses pós natal em comparação com animais mais novos (JUNG et al., 2017). Ainda, em um outro estudo publicado pelos mesmos autores, os pesquisadores sugerem que a COX-2 desempenha um importante papel na plasticidade sináptica do giro denteado (DG) do hipocampo e que alterações nos níveis de sua expressão são atribuídas ao desenvolvimento pós-natal (JUNG et al., 2019). Embora seja induzida em processos inflamatórios, esses resultados confirmam estudos anteriores relatando que a COX-2 é expressa em neurônios de animais intactos (PISCOPO et al., 2008; YAMAGATA et al., 1993) e sugerem sua participação em mecanismos neurobiológicos e comportamentais.

6. CONCLUSÃO

Em conjunto, nossos resultados sugerem que a inibição de COX-2 constitutiva em camundongos infantis *in vivo* pode estar associada à expressão de comportamentos tipo-ansioso, possivelmente potencializados, pela indução de medo. Ainda, a abordagem farmacológica utilizada no estudo, induziu um aumento nos níveis de marcadores de estresse oxidativo hipocampal e cortical, assim como, participação nos mecanismos de memória de reconhecimento daqueles animais. Porém, sobre o comportamento motor e exploratório, a inibição de COX-2 constitutiva parece não exercer nenhum efeito em animais infantis não inflamados. Entretanto, mais estudos precisam ser elucidados sobre as alterações comportamentais induzidas pela inibição *in vivo* de COX-2 constitutiva e o seu papel nos mecanismos neurobiológicos e comportamentais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGENCY, E. M. European Medicines Agency. **Definitions**, n. 1901, p. 1–7, 2009.

ALBANI, S. H. et al. Behavior in the elevated plus maze is differentially affected by testing conditions in rats under and over three weeks of age. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 9, n. FEB, p. 1–10, 2015.

ALBRECHT, D. Angiotensin-(1-7)-induced plasticity changes in the lateral amygdala are mediated by COX-2 and NO. **Learning and Memory**, v. 14, n. 3, p. 177–184, 2007.

AM, A. et al. Neurodefensive Effect of *Olea europaea* L. in Alloxan-Induced Cognitive Dysfunction and Brain Tissue Oxidative Stress in Mice: Incredible Natural Nootropic. **Journal of Neurology and Neuroscience**, v. 7, p. 1–9, 2016.

ANSARI A., M.; SCHEFF W., S. Oxidative Stress in the Progression of Alzheimer Disease in the Frontal Cortex. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 69, n. 1, p. 1–25, 2010.

ARRAIS, P. S. D. et al. Prevalence of self-medication in Brazil and associated factors. **Revista de Saude Publica**, v. 50, n. supl 2, p. 1–11, 2016.

AYALA, A.; MUÑOZ, M. F.; ARGÜELLES, S. Lipid Peroxidation : Production , Metabolism , and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. v. 2014, 2014.

BARBOSA, L. F.; DE MEDEIROS, M. H. G.; AUGUSTO, O. Danos oxidativos e neurodegeneração: O quê aprendemos com animais transgênicos e nocautes? **Quimica Nova**, v. 29, n. 6, p. 1352–1360, 2006.

BASTOS, G. N. et al. Involvement of cyclooxygenase-2 in lipopolysaccharide-induced impairment of the newborn cell survival in the adult mouse dentate gyrus. **Neuroscience**, v. 155, n. 2, p. 454–462, 2008.

BEVINS, R. A.; BESHEER, J. Object recognition in rats and mice: A one-trial non-matching-to-sample learning task to study “recognition memory”. **Nature Protocols**, v. 1, n. 3, p. 1306–1311, 2006.

BEZERRA, F. J. L. et al. Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico como indicador da peroxidação lipídica em ratos tratados com sevoflurano. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 54, n. 5, p. 640–649, 2004.

- BINDU, S.; MAZUMDER, S.; BANDYOPADHYAY, U. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: A current perspective. n. January, 2020.
- BOLDRINI, M. et al. Human Hippocampal Neurogenesis Persists throughout Aging. **Cell Stem Cell**, v. 22, n. 4, p. 589- 599.e5, 2018.
- BRASIL, M. DA S. Boletim De Farmaco Vigilância: Medicamentos Isentos De Prescrição. **Boletim de Farmacovigilância nº9**, n. 9, p. 14, 2020.
- CHEN, Q. et al. Cyclooxygenase-2 Signalling Pathway in the Cortex is Involved in the Pathophysiological Mechanisms in the Rat Model of Depression. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–12, 2017.
- CHORILLI, M.; MICHELIN, D. C.; SALGADO, H. R. N. Animais de laboratório: O camundongo. **Revista de Ciencias Farmaceuticas Basica e Aplicada**, v. 28, n. 1, p. 11–23, 2007.
- COMBRINCK, M. et al. Levels of CSF prostaglandin E2, cognitive decline, and survival in Alzheimer's disease. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, v. 77, n. 1, p. 85–88, 2006.
- DEBIEC, J.; OLSSON, A. Social Fear Learning: from Animal Models to Human Function. **Trends in Cognitive Sciences**, v. 21, n. 7, p. 546–555, 2017.
- DHAMA, K. et al. Biomarkers in stress related diseases/disorders: Diagnostic, prognostic, and therapeutic values. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 6, n. October, 2019.
- DUTTA, S.; SENGUPTA, P. Men and mice: Relating their ages. **Life Sciences**, v. 152, p. 244–248, 2016.
- FANTZ, R. L. Visual experience in infants: Decreased attention to familiar patterns relative to novel ones. **Science**, v. 146, n. 3644, p. 668–670, 1964.
- FERRARI, E. A. DE M. et al. Plasticidade neural: relações com o comportamento e abordagens experimentais. **Psicologia: Teoria e Pesquisa**, v. 17, n. 2, p. 187–194, 2001.
- FERREIRA, T. R.; LOPES, L. C. Analysis of analgesic, antipyretic, and nonsteroidal anti-inflammatory drug use in pediatric prescriptions. **Jornal de Pediatria (Versão em**

Português), v. 92, n. 1, p. 81–87, 2016.

FLATT, T. A new definition of aging? **Frontiers in Genetics**, v. 3, n. AUG, p. 1–2, 2012.

GAMBLE-GEORGE, J. C. et al. Cyclooxygenase-2 inhibition reduces stress-induced affective pathology. v. 2, p. 1–20, 2016.

GONCALVES, M. B. et al. The COX-2 inhibitors, meloxicam and nimesulide, suppress neurogenesis in the adult mouse brain. **British Journal of Pharmacology**, v. 159, n. 5, p. 1118–1125, 2010.

GREEN, L. C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131–138, 1982.

GUAN, P. et al. Cyclooxygenase-2 Induced the β -Amyloid Protein Deposition and Neuronal Apoptosis Via Upregulating the Synthesis. n. 3, p. 1255–1268, 2019.

HALLER, J.; ALICKI, M. Current animal models of anxiety, anxiety disorders, and anxiolytic drugs. **Current Opinion in Psychiatry**, v. 25, n. 1, p. 59–64, 2012.

HANDLEY, S. L.; MITHANI, S. Archives of Pharmacology Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. p. 1–5, 1984.

HARMS, M.; SEALE, P. Brown and beige fat: Development, function and therapeutic potential. **Nature Medicine**, v. 19, n. 10, p. 1252–1263, 2013.

HASSAN, W. et al. Association of Oxidative Stress to the Genesis of Anxiety: Implications for Possible Therapeutic Interventions. p. 120–139, 2014.

HE, J. et al. Oxidative Stress and Neuroinflammation Potentiate Each Other to Promote Progression of Dopamine Neurodegeneration. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2020, 2020.

HEIN, A. M. et al. Prostaglandins are necessary and sufficient to induce contextual fear learning impairments after interleukin-1 beta injections into the dorsal hippocampus. **Neuroscience**, v. 150, n. 4, p. 754–763, 2007.

HERMANSON, D. J. et al. Substrate-selective COX-2 inhibition decreases anxiety via endocannabinoid activation. n. August, 2013.

HIRSCH, E. C.; HUNOT, S. Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for

neuroprotection ? v. 8, n. April, 2009a.

HIRSCH, E. C.; HUNOT, S. Neuroinflammation in Parkinson ' s disease : a target for neuroprotection ? v. 8, n. April, 2009b.

HUI, C. W. et al. Ibuprofen prevents progression of ataxia telangiectasia symptoms in ATM-deficient mice. **Journal of Neuroinflammation**, v. 15, n. 1, p. 1–19, 2018.

HUSSAIN, T. et al. Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us? **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, 2016.

IZQUIERDO, I. et al. The evidence for hippocampal long-term potentiation as a basis of memory for simple tasks. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 80, n. 1, p. 115–127, 2008.

JUNG, H. Y. et al. Age-associated alterations in constitutively expressed cyclooxygenase-2 immunoreactivity and protein levels in the hippocampus. **Molecular Medicine Reports**, v. 15, n. 6, p. 4333–4337, 2017.

JUNG, H. Y. et al. Postnatal changes in constitutive cyclooxygenase-2 expression in the mice hippocampus and its function in synaptic plasticity. **Molecular Medicine Reports**, v. 19, n. 3, p. 1996–2004, 2019.

JURKOWSKI, M. P. et al. Beyond the Hippocampus and the SVZ: Adult Neurogenesis Throughout the Brain. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 14, n. September, p. 1–36, 2020.

KAHVECI, S. G. T. Z. Cyclooxygenase-2 expression in astrocytes and microglia in human oligodendroglioma and astrocytoma. n. 2009, p. 369–377, 2010.

KAUFMANN, W. E. et al. COX-2, a synaptically induced enzyme, is expressed by excitatory neurons at postsynaptic sites in rat cerebral cortex. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 6, p. 2317–2321, 1996.

KORTE, S. M.; BOER, S. F. DE. A robust animal model of state anxiety : fear-potentiated behaviour in the elevated plus-maze. v. 463, p. 163–175, 2003.

KOTILINEK, L. A. et al. Cyclooxygenase-2 inhibition improves amyloid- β -mediated suppression of memory and synaptic plasticity. **Brain**, v. 131, n. 3, p. 651–664, 2008.

KUMAR, A.; KUMARI, B.; KUMAR, P. Protective effects of selective and non-selective cyclooxygenase inhibitors in an animal model of chronic stress. **Neuroscience Bulletin**, v. 26, n. 1, p. 17–27, 2010.

KWON, J. et al. Nimesulide-induced hepatotoxicity : A systematic review and meta-analysis. p. 1–18, 2019.

LECOURS, C. et al. Microglial Implication in Parkinson ' s Disease : Loss of Beneficial Physiological Roles or Gain of Inflammatory Functions ? v. 12, n. August, p. 1–8, 2018.

LIGUORI, I. et al. Oxidative stress, aging, and diseases. **Oxidative Stress and Diseases**, p. 757–772, 2018.

LINDBERG, L. et al. Anxiety and depression in children and adolescents with obesity: A nationwide study in Sweden. **BMC Medicine**, v. 18, n. 1, p. 1–9, 2020.

LINDQVIST, D. ET AL. Oxidative Stress, Inflammation and Treatment Response in Major Depression. **Physiology & behavior**, v. 176, n. 1, p. 100–106, 2016.

LITTLE, K. et al. Common pathways in dementia and diabetic retinopathy: understanding the mechanisms of diabetes-related cognitive decline. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 33, n. 1, p. 50–71, 2022.

LUO, Y. et al. cAMP/PKA-CREB-BDNF signaling pathway in hippocampus mediates cyclooxygenase 2-induced learning/memory deficits of rats subjected to chronic unpredictable mild stress. **Oncotarget**, v. 8, n. 22, p. 35558–35572, 2017.

MCGUINNESS, J. A. et al. Indomethacin increases neurogenesis across age groups and improves delayed probe trial difference scores in middle-aged rats. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 9, n. SEP, p. 1–23, 2017.

MESFIN, M.; ASRES, K.; SHIBESHI, W. Evaluation of anxiolytic activity of the essential oil of the aerial part of *Foeniculum vulgare* Miller in mice. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, n. 1, p. 1–7, 2014.

MISHKIN, M.; DELACOUR, J. An analysis of short-term visual memory in the monkey. **Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes**, v. 1, n. 4, p. 326–334, 1975.

MORGAN, A. et al. Cyclooxygenase-2 inhibition reduces anxiety-like behavior and

normalizes enhanced amygdala glutamatergic transmission following chronic oral corticosterone treatment. **Neurobiology of Stress**, v. 11, n. June, p. 100190, 2019a.

MORGAN, A. et al. Neurobiology of Stress Cyclooxygenase-2 inhibition reduces anxiety-like behavior and normalizes enhanced amygdala glutamatergic transmission following chronic oral corticosterone treatment. **Neurobiology of Stress**, v. 11, n. April, p. 100190, 2019b.

PAUL, V.; EKAMBARAM, P. Involvement of nitric oxide in learning & memory processes. n. May, p. 471–478, 2011.

PISCOPO, P. et al. Altered expression of cyclooxygenase-2, presenilins and oxygen radical scavenging enzymes in a rat model of global perinatal asphyxia. **Experimental Neurology**, v. 209, n. 1, p. 192–198, 2008.

RITTER, J. M.; FRCP, D.; FMEDSCI, F. Rang & Dale: Farmacologia. [s.d.].

RODRIGUES, A. C. Utilização de medicamentos isentos de prescrição e economias geradas para os sistemas de saúde: uma revisão. **Jornal Brasileiro de Economia da Saúde**, v. 9, n. 1, p. 128–136, 2017.

ROSENBLOOM, D.; CRAVEN, M. A. A Review of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs. v. 29, p. 4, 1983.

ROUZER, C. A.; MARNETT, L. J. Cyclooxygenases: Structural and functional insights. **Journal of Lipid Research**, v. 50, n. SUPPL., p. 29–34, 2009.

SALIM, S. et al. Oxidative stress : A potential recipe for anxiety , hypertension and insulin resistance. **Brain Research**, v. 1359, p. 178–185, 2010.

SCHELLACK, NATALIE; SCHELLACK, GUSTAV; FOURIE, J. A review of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **AANA Journal**, v. 83, n. 6, p. 425–433, 2015.

SETHI, R. et al. Neurobiology and Therapeutic Potential of Cyclooxygenase-2 (COX-2) Inhibitors for Inflammation in Neuropsychiatric Disorders. **Frontiers in Psychiatry**, v. 10, n. September, p. 1–21, 2019.

SHABAB, T. et al. Neuroinflammation pathways: a general review. **International Journal of Neuroscience**, v. 127, n. 7, p. 624–633, 2017.

SHOJI, H.; MIYAKAWA, T. Age-related behavioral changes from young to old age in

male mice of a C57BL/6J strain maintained under a genetic stability program. **Neuropsychopharmacology Reports**, v. 39, n. 2, p. 100–118, 2019.

SILVA, L. S. et al. Incidência da automedicação no uso indiscriminado de anti-inflamatórios esteroidais e não esteroidais entre universitários de Imperatriz-MA / Incidence of self-medication in the indiscriminate use of steroidal and non-steroidal anti-inflammatory agents am. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 2, n. 2, p. 862–887, 2019.

SMOLEN, P.; BAXTER, D. A.; BYRNE, J. H. How can memories last for days, years, or a lifetime? Proposed mechanisms for maintaining synaptic potentiation and memory. **Learning and Memory**, v. 26, n. 5, p. 133–150, 2019.

STRAUSS, K. I. Antiinflammatory and neuroprotective actions of COX2 inhibitors in the injured brain. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 22, n. 3, p. 285–298, 2008.

TAGLIALATELA, G. et al. Intermediate- and long-term recognition memory deficits in Tg2576 mice are reversed with acute calcineurin inhibition. **Behavioural Brain Research**, v. 200, n. 1, p. 95–99, 2009.

TAHERI, P. et al. Heliyon Nitric oxide role in anxiety-like behavior , memory and cognitive impairments in animal model of chronic migraine. **Heliyon**, v. 6, n. June, p. e05654, 2020.

TEELING, J. L. et al. The effect of non-steroidal anti-inflammatory agents on behavioural changes and cytokine production following systemic inflammation: Implications for a role of COX-1. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 24, n. 3, p. 409–419, 2010.

TRAVERSA, G. et al. Cohort study of hepatotoxicity associated with nimesulide and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. **British Medical Journal**, v. 327, n. 7405, p. 18–22, 2003.

TÜRKOĞLU, GOZDE; TÜRKOĞLU, SERHAT; KAYALI, SEHER; KARAHAN, A. Indomethacin-induced psychotic disorder. **Clinical Neuropharmacology**, v. 39, n. Table 1, p. 506–508, 2016.

VIJITRUTH, R. et al. Cyclooxygenase-2 mediates microglial activation and secondary dopaminergic cell death in the mouse MPTP model of Parkinson's disease. **Journal of Neuroinflammation**, v. 3, p. 1–16, 2006.

WANG, J.; MARKESBERY, W. R.; LOVELL, M. A. Increased oxidative damage in nuclear and mitochondrial DNA in mild cognitive impairment. **Journal of Neurochemistry**, v. 96, n. 3, p. 825–832, 2006.

WANG, M. et al. Effect of cyclooxygenase-2 inhibition on the development of post-traumatic stress disorder in rats. **Molecular Medicine Reports**, v. 17, n. 4, p. 4925–4932, 2018.

WARNER, T. D.; MITCHELL, J. A. Cyclooxygenases: new forms, new inhibitors, and lessons from the clinic. **The FASEB Journal**, v. 18, n. 7, p. 790–804, 2004.

WINTERBOURN, C. C.; GUTTERIDGE, J. M. C.; HALLIWELL, B. Doxorubicin-dependent lipid peroxidation at low partial pressures of O₂. **Journal of Free Radicals in Biology and Medicine**, v. 1, n. 1, p. 43–49, 1985.

WOODLING, N. S. et al. Cyclooxygenase inhibition targets neurons to prevent early behavioural decline in Alzheimer's disease model mice. **Brain**, v. 139, n. 7, p. 2063–2081, 2016.

YAMAGATA, K. et al. Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons: Regulation by synaptic activity and glucocorticoids. **Neuron**, v. 11, n. 2, p. 371–386, 1993.

YANG, H. et al. COX-2 oxidative metabolism of endocannabinoids augments hippocampal synaptic plasticity. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 37, n. 4, p. 682–695, 2008.

YANG, H.; CHEN, C. Cyclooxygenase-2 in Synaptic Signaling. **Current Pharmaceutical Design**, v. 14, n. 14, p. 1443–1451, 2008.

ZHANG, X. et al. Adipose mTORC1 Suppresses Prostaglandin Signaling and Beige Adipogenesis via the CRTC2-COX-2 Pathway. **Cell Reports**, v. 24, n. 12, p. 3180–3193, 2018.

ZHOU, L. et al. Nimesulide and 4'-Hydroxynimesulide as Bile Acid Transporters Inhibitors Are Contributory Factors for Drug-Induced Cholestasis. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 45, n. 5, p. 441–448, 2017.

ZOU, S.; KUMAR, U. Cannabinoid receptors and the endocannabinoid system: Signaling and function in the central nervous system. **International Journal of Molecular**

Sciences, v. 19, n. 3, 2018.

ZOU, Y. H. et al. Rofecoxib Attenuates the Pathogenesis of Amyotrophic Lateral Sclerosis by Alleviating Cyclooxygenase-2-Mediated Mechanisms. **Frontiers in Neuroscience**, v. 14, n. August, p. 1–16, 2020.