



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

ANELISE FRANCIOSI

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANALGÉSICO E  
ANTINFLAMATÓRIO DAS MARESINAS EM MODELOS  
EXPERIMENTAIS DE ATRITE E COLITE ULCERATIVA**

---

Londrina  
2022

ANELISE FRANCIOSI

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANALGÉSICO E  
ANTINFLAMATÓRIO DAS MARESINAS EM MODELOS  
EXPERIMENTAIS DE ATRITE E COLITE ULCERATIVA**

Tese apresentada ao programa de pós-graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora r em Patologia Experimental.

Orientador: Prof. Drº Waldiceu Aparecido Verri Júnior

Londrina  
2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

F817a Franciosi, Anelise.  
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANALGÉSICO E ANTINFLAMATÓRIO DAS MARESINAS EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE ATRITE E COLITE ULCERATIVA / Anelise Franciosi. - Londrina, 2022.  
121 f. : il.

Orientador: Waldiceu Aparecido Verri Junior.  
Tese (Doutorado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2022.  
Inclui bibliografia.

1. Avaliação do potencial analgésico e anti-inflamatório das maresinas. - Tese.  
2. Avaliação do processo inflamatório crônico por meio da artrite induzida por dióxido de titânio. - Tese. 3. Avaliação do processo inflamatório agudo por meio da colite ulcerativa induzida por ácido acético. - Tese. I. Aparecido Verri Junior, Waldiceu. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. III. Título.

CDU 616

ANELISE FRANCIOSI

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANALGÉSICO E  
ANTINFLAMATÓRIO DAS MARESINAS EM MODELOS  
EXPERIMENTAIS DE ATRITE E COLITE ULCERATIVA**

Tese apresentada ao programa de pós-graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Patologia Experimental

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verri  
Júnior  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dr. Fábio Henrique Kwasniewski  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dr. Sérgio Borghi  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dra. Ana Carolina Rossaneis  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dra. Cássia Calixto de Campos  
Faculdade de Apucarana – FAP

Londrina, 25 de outubro de 2022.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, e Maria Santíssima por passar à frente de todo e qualquer obstáculo, por trilhar cada pedra deste caminho.

Agradeço a minha família, meus pais José Luiz e Maria de Fátima que nunca mediram esforços para que eu e minha irmã Lidiane tivéssemos toda a educação que eles não tiveram. Agradeço a minha irmã por muitas vezes abdicar de necessidades dela para que as minhas fossem mantidas, por todos os finais de semana e noites que me levava ou buscava na UEL, para que eu pudesse participar dos experimentos, pelas noites em claro, por companhia, para que eu conseguisse estudar ou escrever. As minhas primas Angela, Luana, Adriana e Amanda que me ajudaram, sempre com muita paciência e amor.

Agradeço ao meu orientador, professor Waldiceu, por ter compartilhado parte do seu conhecimento comigo durante esses quatro anos. Por ter aceitado me orientar em um momento difícil e delicado, sem objeções em relação ao meu trabalho. Por ter me acolhido, por todo empenho com a pesquisa e com o laboratório. Obrigada pela oportunidade de poder aprender tanto! Estendo estes agradecimentos aos meus colegas de laboratório, que foram peças importantes para que este trabalho fosse feito, que tornaram os dias mais leves, que compartilharam seu conhecimento comigo, e que viveram e auxiliaram a cada experimento. As IC's, Geovana e Gabriele, e as atualmente mestrandas Jéssica e Thaila, por serem sempre parceiras e muito dedicadas. Que privilégio foi dividir o LADINC com cada um de vocês!

Em especial, gostaria de agradecer pelas amizades formadas e fortalecidas durante este curto espaço de tempo. Obrigada Nayara Anitelli, Thacyana, Júlia, Amanda, Ketlem, Marília, Fernanda, Carol, Cássia, Soraia, Nayara Rampazzo, Kamila, Mariana S, Mayara e Matheus por terem feito tudo valer a pena. Que possamos aproveitar desta amizade por muitos e muitos anos.

Agradeço a Rosana, que muitas vezes foi mais do que ela precisava ser em cada momento que compartilhou comigo. Que me ajudou em muitas das minhas tarefas no laboratório, sempre de bom grado e muitas vezes me fazia ver toda a dificuldade com outros olhos.

A UEL e ao programa de Patologia Experimental, pela oportunidade de viver a pós graduação, e por cumprir com excelência a missão de formar bons profissionais.

Agradeço as minhas amigas, presentes de UEL Ana Paula e Rafaela pela cumplicidade, amizade e parceria durante todos esses anos.

Aos membros da banca, por disporem do seu tempo para contribuir com minha formação e trabalho.

As minhas amigas de infância Larissa, Beatriz, Lara e Ana Paula, por cada minuto que compartilhamos, pelo incentivo e por compreenderem a minha ausência. Obrigada por serem meu lar, por me mostrarem que temos pra onde voltar, e que sempre estaremos aqui uma pelas outras.

Aos meus amigos Mayara, Amanda Pereira, Carolina, Daiane, Natália, Amanda Ávila, Gustavo, Robson, Thayná e Karen, que acompanharam minha trajetória de estudos antes mesmo da graduação, que se fizeram presentes em momentos bons e ruins, que me ajudaram a persistir e me mostraram o valor de nossa amizade. E principalmente ao Gabriel, amigo fiel, refúgio poderoso, um porto seguro, que se alegra mais com minhas conquistas do que eu mesma, nossa amizade é assim, formada por duas pessoas que se orgulham uma da outra. Você sabe que foi fundamental para que tudo isso acontecesse, mas aprendi com você que mesmo assim, é importante dizer, então, muito obrigada mesmo por tudo! Estarei sempre aqui pra você, como você sempre está por mim.

Aos frutos da UniFil em minha vida:

As minhas amigas Marianny, Isabela, Geisica e Amanda Quintino, presentes da biomedicina que me fizeram mais fortes, que se tornaram minha família, mesmo estando do outro lado do mundo. Amigo não precisa estar, precisa ser! Dividimos as dificuldades, buscamos o mesmo objetivo e compartilhamos nosso sucesso!

Aos meus professores da graduação que se tornaram meus amigos, Tacito, Fabiana e Juliana, vocês sempre desempenharam seus papéis com muito amor e se fizeram os exemplos de profissionais que almejo me tornar. Obrigada Tacito, por tudo que você me ensinou e proporcionou, sou extremamente grata por todos os finais de semana sobre os livros, por muitas vezes esquecer de algo seu para me ajudar, acalmar, incentivar, estou aqui hoje por mim e por você. Agradeço também minha amiga Nathália, que me acolheu desde sempre em sua casa, se fez presente, se fez minha família, me ensinou com quem eu posso sempre contar, independentemente de onde estivermos! Obrigada por tanto!

À minha amiga Bruna, que é muito mais que minha caloura. Tenho muito orgulho da pessoa e profissional que se tornou, obrigada por dividir sua vida comigo!

À minha amiga e sócia Carolina Ariza, que com sua calma, humildade, e generosidade me fez ver o lado bom de todas as adversidades que passamos. Te admiro tanto Carol, você me mostra todos os dias que podemos mais. Obrigada por estar ao meu lado desde os momentos difíceis do mestrado. Por muitas vezes discutir um resultado comigo, mesmo não sendo da área de conhecimento que você seguiu, obrigada pela parceria em todas as empreitadas que pensamos e sonhamos juntas.

Ao meu amigo Thiago Salem, que com seu jeito leve, mostrou-me que não se carrega o fardo sozinho, que juntos, podemos muito. Ensinou-me a ouvir mais, e sempre me fez ser ouvida. Me fez ser uma pessoa melhor, uma biomédica melhor, uma professora melhor. Obrigada por sempre acreditar em mim, obrigada por me fazer persistir, por me fazer rir e por cuidar das coisas que nem sabemos que precisamos.

Ao colegiado da Biomedicina UniFil, pois aprendi muito com cada um de vocês. Aprendi que é importante ter espelhos na vida, que o nosso esforço é percebido e recompensado. Muito do mérito de chegar até aqui é também de vocês. Hoje entendo o quanto é gratificante colher os frutos de um aluno ao lado dele. Tenho muito orgulho de ser biomedUniFil ao lado de vocês.

*“A ciência serve para nos dar uma ideia de  
quão extensa é a nossa ignorância”  
Félicité Robert de Lamennais*

## RESUMO

FRANCIOSI, Anelise. **Avaliação do potencial analgésico e anti-inflamatório das maresinas em modelos experimentais de artrite colite ulcerativa**. 2022. 118 f. Tese (Doutorado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

A dor é uma experiência sensorial e emocional desagradável, produto do processo inflamatório que pode acometer indivíduos em diversas situações, sendo na maioria delas um agente incapacitante. O processo inflamatório e dor foram avaliados através dos modelos experimentais de artrite induzida por dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>) e modelo de colite ulcerativa (CU) induzida por ácido acético. Para investigar o objetivo de avaliação do potencial analgésico e anti-inflamatório, foram utilizados mediadores lipídicos pró resolução, as maresinas 1 (MaR1) e 2 (MaR2), como abordagem terapêutica. A artrite foi induzida em camundongos com Titânio (TiO<sub>2</sub>) intra-articular (i.a) (3mg/articulação). Após 24 horas, os animais foram tratados com MaR1 (1, 3 e 10ng – intraperitoneal i.p), e os tratamentos seguiram até o 30º dia pós indução. Ao longo dos 30 dias, a dose-resposta da droga foi avaliada pela realização de testes comportamentais (hiperalgesia mecânica e térmica, avaliação de incapacitação estática). Foi escolhida a dose de 10ng para o tratamento devido sua eficácia pelo período de 72 horas. A avaliação da ativação de neurônios do gânglio da raiz dorsal (DRG) por imageamento de cálcio foi realizado no segundo dia (48 hr) pós indução. Outros parâmetros inflamatórios foram avaliados como o edema, o recrutamento de leucócitos no lavado articular foram avaliados durante os 30 dias, e após a eutanásia respectivamente. Parâmetros histológicos como o recrutamento celular, hiperplasia sinovial, neovascularização e degradação da cartilagem, demonstraram a capacidade anti-inflamatória da MaR1. A MaR1 mostrou-se uma excelente abordagem terapêutica, já que não confere toxicidade gástrica, hepática ou renal, atuando ainda na modulação de hiperalgesia e inflamação. A CU foi desencadeada em camundongos com ácido acético (AAC) intraperitoneal (i.p) (na concentração de 6%). Os camundongos foram tratados com MaR2 (300pg e 3ng/animal) antes e após a indução da inflamação com ácido acético via intrarectal. Para observar o potencial analgésico e anti-inflamatório por meio da droga-resposta, foram avaliados a hiperalgesia mecânica visceral, e atividade da mieloperoxidase (MPO). Devido a sua eficácia, escolheu-se a dose de 3 ng, e assim o efeito anti-inflamatório foi avaliado por parâmetros histológicos como a destruição das células caliciformes, a atrofia das criptas, distanciamento das camadas musculares e mucosa, o recrutamento de leucócitos e mastócitos. Foi avaliada população de macrófagos no tecido colônico por meio de imunomarcagem de F4/80 para macrófagos, e iNOS para células produtoras de óxido nítrico sintase induzível (iNOS). A MaR2 age como analgésica reduzindo a hiperalgesia mecânica visceral, e anti-inflamatória diminuindo o recrutamento celular e os demais parâmetros histológicos, bem como a quantidade de macrófagos positivos para iNOS no tecido colônico. Conclui-se que as Maresinas são potenciais alternativas terapêuticas, tanto na inflamação aguda causada pela colite induzida por ácido acético, quanto na inflamação crônica, produto da artrite induzida pelo TiO<sub>2</sub>.

**Palavras-chave:** artrite; colite; dor; inflamação; maresinas.

## ABSTRACT

FRANCIOSI, Anelise **Evaluation of the analgesics and anti-inflammatory potential of maresinas in experimental models of arthritis and ulcerative colitis.** 2022. 118 p. Thesis (Doctorate in Experimental Pathology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022

Pain is an unpleasant sensory and emotional experience, a product of the inflammatory process that can affect individuals in various situations, most of which are a disabling agent. The inflammatory process and pain were evaluated through the experimental models of titanium dioxide-induced arthritis (TiO<sub>2</sub>) and ulcerative colitis (UC) model induced by acetic acid. To investigate the objective of evaluating analgesic and anti-inflammatory potential, pro-resolution lipid mediators were used, maresins 1 (MaR1) and 2 (MaR2), as a therapeutic approach. Arthritis was induced in mice with intra-articular Titanium (TiO<sub>2</sub>) (i.a.) (3mg/joint). After 24 hours, the animals were treated with MaR1 (1, 3 and 10ng – intraperitoneal i.p), and the treatments continued until the 30th day after induction. Over the course of 30 days, the dose-response of the drug was evaluated by conducting behavioral tests (mechanical and thermal hyperalgesia, evaluation of static disability). The dose of 10ng was chosen for treatment due to its efficacy for a period of 72 hours. The evaluation of dorsal root ganglion neuron (DRG) activation by calcium imaging was performed on the second day (48 hr) after induction. Other inflammatory parameters were evaluated as edema, recruitment of leukocytes in the joint washes were evaluated during the 30 days, and after euthanasia, respectively. Histological parameters such as cell recruitment, synovial hyperplasia, neovascularization and cartilage degradation demonstrated the anti-inflammatory capacity of MaR1. MaR1 proved to be an excellent therapeutic approach, since it does not confer gastric, hepatic or renal toxicity, still acting in the modulation of hyperalgesia and inflammation. UC was triggered in mice with intraperitoneal acetic acid (AAC) (i.p. (at a concentration of 6%). The mice were treated with MaR2 (300pg and 3ng/animal) before and after induction of inflammation with acetic acid intrarectally. To observe analgesic and anti-inflammatory potential through the drug-response, visceral mechanical hyperalgesia and myeloperoxidase (MPO) activity were evaluated. Due to its efficacy, the dose of 3 ng was chosen, and thus the anti-inflammatory effect was evaluated by histological parameters such as the destruction of calliform cells, atrophy of the crypts, distancing of muscle and mucosal layers, recruitment of leukocytes and mast cells. A macrophage population in colonic tissue was evaluated by immunostagging f4/80 for macrophages, and iNOS for nitric oxide-producing cells inducible synthase (iNOS). MaR2 acts as analgesics reducing visceral mechanical hyperalgesia, and anti-inflammatory, decreasing cell recruitment and other histological parameters, as well as the amount of iNOS-positive macrophages in colonic tissue. It is concluded that Maresinas are therapeutic alternative potentials, both in acute inflammation caused by acetic acid-induced colitis and in chronic inflammation, a product of TiO<sub>2</sub>-induced arthritis.

**Keywords:** artite; colitis; pain; inflammation; maresinas.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Representação dos sinais cardinais da inflamação.....	17
<b>Figura 2</b> – Sistema ântero-lateral e Sistema da coluna dorsal. ....	27
<b>Figura 3</b> – Fenótipos da colite ulcerativa pela classificação de Montreal .....	39
<b>Figura 4</b> – A biossíntese da produção dos mediadores lipídicos pró resolução.....	42

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAC	Ácido Acético
Ach	Acetilcolina
ACKR1	Receptor atípico de quimiocina
AITC	Alil isotiocianato
ALT	Alanina aminotransferase
ALXR/FPR220	Receptor de peptídeo formilado humano
ATP	Trifosfato de adenosina
ASICs	Canais Iônicos Sensíveis a ácido
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
COX-2	Ciclooxigenase-2
CU	Colite Ulcerativa
DAMPs	Padrões Moleculares associados aos danos
DC	Doença de Crohn
DHA	Ácido docosahexaenóico
DII	Doença Inflamatória Intestinal
DMARDs	Drogas antirreumáticas modificadoras da doença
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DRG	Glânglio da raiz dorsal
DSS	Sulfato de dextrano de sódio
EDTA	Sal dissódico do ácido etilenodiaminotetracético
EPA	Ácido eicosapentaenoico
ERNs	Espécies Reativas de Nitrogênio
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
I.a	Injeção Intra-articular
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular
IFN- $\gamma$	Interferon $\gamma$
ILCs	Células linfoides inatas
IL-1R1	Receptor de interleucina 1 do tipo 1
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 $\beta$

IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL- 6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-9	Interleucina 9
IL-10	Interleucina 10
IL-13	IL-13 - Interleucina 13
IL-17A	Interleucina 17A
IL-22	Interleucina 22
IL23R	Receptor da interleucina 23
IL-33	Interleucina 33
I.p	Intraperitoneal
LPS	Lipopolissacarídeo
LTB4	Leucotrieno B4
LxA4	Lipoxina A4
MaR1	Maresina 1
MaR2	Maresina 2
MCP-5	Proteína quimioatraente de monócitos
MG	Micróglia
MIP-1 $\alpha$ /MIP-1 $\gamma$	Proteínas inflamatórias derivadas de macrófagos
MPO	Mieloperoxidase
NaCl	Cloreto de Sódio – solução salina 0,9%
NaV	Canais de Sódio dependentes de voltagem
NF- $\kappa$ B	Fator nuclear $\kappa$ B
NGF	Fator de crescimento nervoso
NLR	Receptores do tipo NOD
NK	Célula Natural Killer
PAF	Fator ativador de plaquetas
PGE2	Prostaglandina E2
PGs	Prostaglandinas
PKC $\epsilon$	Proteína quinase C $\epsilon$
PPAR- $\gamma$	Receptor gamma ativado pelo proliferador de peroxissomo
PRRs	Receptores de Reconhecimento Padrão

STAT6	Transdutor de sinal e ativador de transcrição 6
SPMs	Mediadores Lipídicos Pró-resolução
TGF- $\beta$	Fator de transformação do crescimento $\beta$
TiO <sub>2</sub>	Dióxido de Titânio
TLR	Receptores do tipo Toll
TLR2	Receptor do tipo Toll 2
TLR4	Receptor do tipo Toll 4
TNBS	Ácido 2,4,6-trinitrobenzenossulfônico
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral $\alpha$
TNFR1	Receptor de fator de necrose tumoral alfa
TRPA1	Receptor de potencial transitório anquirina 1
TRPV1	Receptor de potencial transitório vanilóide 1
UTP	Uridina trifosfato
VGCCs	Canais de cálcio dependentes de voltagem
VGEF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
5-ASA	Ácido 5-aminossalicílico
5-HT	5-hidróxitriptamina (Serotonina)

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	16
2.1	INFLAMAÇÃO .....	16
2.2	RESOLUÇÃO .....	19
2.3	DOR .....	21
2.3.1	Mecanismos de Dor .....	25
2.4	RELAÇÃO ENTRE A NOCICEPÇÃO E SISTEMA IMUNOLÓGICO .....	30
2.5	ARTRITE .....	33
2.5.1	Modelo de Artrite Induzida por Dióxido de Titânio .....	35
2.6	COLITE ULCERATIVA.....	36
2.6.1	Modelo de Colite Induzida por Ácido Acético .....	41
2.7	MARESINAS .....	42
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	45
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS – modelo TiO<sub>2</sub></b> .....	46
<b>5</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS – modelo colite</b> .....	52
<b>6</b>	<b>Maresin 1 reduces pain, inflammation and articular pathology in titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>)-induced arthritis</b> .....	56
<b>7</b>	<b>Maresin 2 reduces pain and inflammation in acetic acid-induced colitis</b> .....	77
	<b>CONCLUSÃO</b> .....	95
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	96
	<b>APÊNDICES</b> .....	115
	APÊNDICE A – parecer do comitê de ética modelo de TiO <sub>2</sub> .....	116

APÊNDICE B – parecer do comitê de ética modelo de Colite .....	117
APÊNDICE C – Artigo de colaboração .....	118

## 1. INTRODUÇÃO

A dor é um dos principais fatores que leva o indivíduo à procura por cuidados em saúde, responsável por aproximadamente 50% das consultas na saúde primária, sendo que 20% destas representam as consultas por motivo de dor crônica (FMUL, 2011).

Por vezes, a dor não se estende apenas ao físico e não está ligada apenas a lesão em si, uma vez que é possível a progressão da dor mesmo com o cessar do estímulo doloroso ou após a erradicação da lesão. Por este motivo, a dor passou a ser entendida como uma doença e não somente como um sintoma, demonstrando a necessidade de seu tratamento.

O processo de dor pode ser classificado de várias formas, dificultando muitas vezes o seu diagnóstico e, por conseguinte, o tratamento. As lesões articulares por exemplo, podem ser causadas por uma série de fatores, e independente deles, a inflamação no local irá evoluir para um processo crônico, sendo seguida pela evolução da dor.

O mesmo se dá em relação às doenças inflamatórias intestinais que englobam a inflamação de parte do intestino grosso, chamada de colite ulcerativa. Nesses casos, há inflamação progressiva e dolorosa, que depende de intervenção medicamentosa para conter a evolução da lesão.

Ainda que existam medicamentos direcionados para diminuir a dor independente da sua classificação, seja ela fisiológica, patológica, aguda, crônica ou neuropática, os medicamentos em questão ainda apresentam efeitos adversos que dificultam o tratamento, ou levam a progressão da doença e da dor.

É preciso que o controle da dor e da inflamação seja encarado como uma prioridade na saúde primária, que deve ser identificada e monitorada para garantir a qualidade de vida dos pacientes. Por esse motivo, a dor se enquadra na vasta lista de problemas de saúde pública, já que pode levar a incapacidades, quando não controlada adequadamente.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Inflamação

Há relatos da antiguidade, advindos da civilização suméria, que desde IV milênio antes de Cristo (2700 a.C.) ilustram o processo inflamatório em hieróglifos. Por volta do primeiro século depois de Cristo, Celsus descreveu a inflamação e, até então, seus quatro sinais cardinais (figura 1), sendo eles o rubor (vermelhidão), o calor, o tumor (inchaço, posteriormente chamado de edema) e a dor (ROCHA E SILVA, 1994). Os sinais cardinais citados acima originam a resposta inflamatória. Isso se dá devido ao aumento da permeabilidade vascular e do fluxo sanguíneo, que conseqüentemente promovem o edema. Além dessas alterações, as células envolvidas no processo são recrutadas para o local da infecção, promovendo a produção e liberação de mediadores pró-inflamatórios que perpetuam a resposta (FREIRE e VAN DYKE, 2013).

Com isso, pode-se observar a importância do processo inflamatório para a sobrevivência, pois são utilizados diversos recursos do organismo frente infecções ou lesão tecidual causada por um agente nocivo para desencadear a inflamação (MEDZHITOV, 2008).

O processo inflamatório normalmente é bem coordenado e esses sinais cardinais trabalham de modo harmonioso para orquestrar a reação do organismo. Porém, em condições de desequilíbrio entre os sinais cardinais da inflamação, a resposta inflamatória pode se tornar persistente, promovendo danos ao tecido onde a mesma ocorre. Devido a isso, o quinto sinal cardinal da inflamação, denominado perda de função foi relatado pelo médico Rudolf Virchow e adicionado como mais uma característica inflamatória (FREIRE e VAN DYKE, 2013).

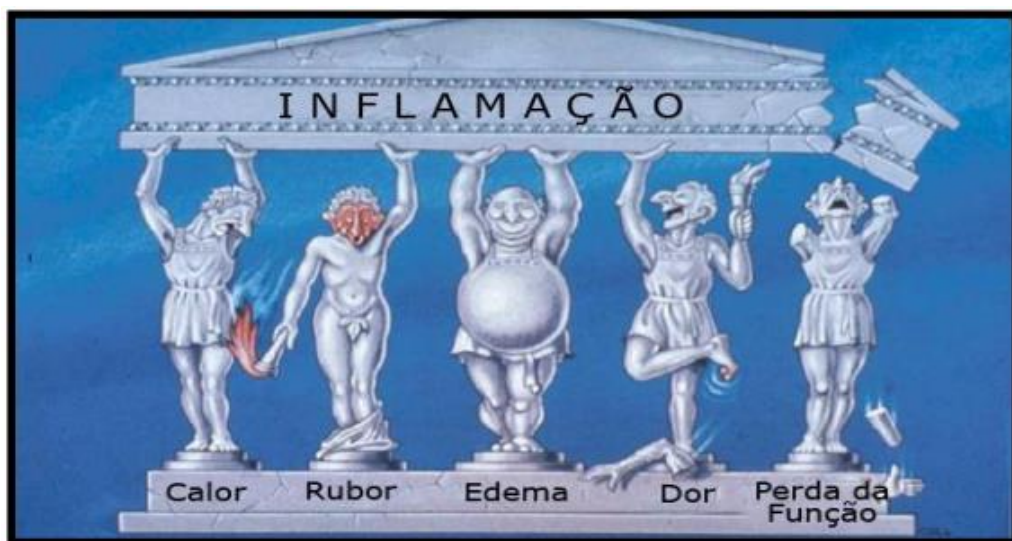


Figura 1: Representação dos sinais cardinais da inflamação (adaptado de LAWRENCE *et al.*, 2002).

A inflamação é resultado desse processo e é dividida de acordo com a sua duração em dois grupos, inflamação aguda e crônica. A inflamação aguda é relativamente rápida, sendo de curta duração e ocorre com o auxílio de células como os fagócitos, que não possuem a capacidade de gerar memória imunológica (MURAKAMI e HIRANO, 2012; ABDULKHALEQ *et al.*, 2018).

A resposta inflamatória aguda é um dos processos vitais mais dinâmicos já vistos (SERHAN, 2014), que têm como objetivo proteger o hospedeiro contra infecções ou lesões causadas por uma grande diversidade de antígenos. É um processo localizado que opera para a eliminação autolimitada dos agentes etiológicos com a finalidade de remover os tecidos danificados e restaurar a homeostase (SERHAN, 2017).

No local, a inflamação aguda é caracterizada por promover dilatação e aumento da permeabilidade vascular, acompanhada do aumento do fluxo sanguíneo, resultando no recrutamento de leucócitos, incluindo neutrófilos, monócitos, macrófagos e linfócitos (MAJNO & JORIS, 2004).

Esta resposta se inicia no momento em que o agente nocivo atravessa a barreira primária. Sua presença desencadeia o reconhecimento dos patógenos através dos padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) e receptores de reconhecimento padrão (PRRs), como os receptores do tipo toll (TLR) ou receptores do tipo NOD (NLR) (MEDZHITOV, 2008; TAKEUCHI; AKIRA, 2010).

Uma vez ativados, os PRRs promovem a ativação de vias de sinalização que, por sua vez, originam a ativação de fatores de transcrição e

produção de mediadores como citocinas e lipídeos pró-inflamatórios, ou ainda a produção de moléculas denominadas de padrões moleculares associados aos danos (DAMPs). Em relação aos fatores de transcrição, tem-se a ativação do fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) que induz a produção de diversas citocinas inflamatórias como fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina 1- $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e 6 (IL-6) (MEDZHITOV, 2008; TAKEUCHI; AKIRA, 2010).

A partir desta ativação, a porta para a produção de outros mediadores inflamatórios está aberta, e com isso, as aminas vasoativas, as quimiocinas, o leucotrieno B4 (LTB4) e prostaglandina E2 (PGE2) começam a ser produzidos, o que leva a uma perpetuação da resposta inflamatória (VERRI; CUNHA; PARADA; POOLE *et al.*, 2006).

Todo o tecido a redor do foco inflamatório sofre com esse processo, há aumento no calibre dos vasos, possibilitando o aumento do fluxo sanguíneo local, e por vezes, o aumento da permeabilidade vascular também. Com isso há um extravasamento de líquido rico em proteínas que contribui para a formação do edema. As alterações vasculares e do fluxo hemodinâmico favorecem a marginalização dos leucócitos como um preparo para a migração, principalmente de neutrófilos (THEOHARIDES; KEMPURAJ; TAGEN; CONTI *et al.*, 2007).

Com a produção e secreção de citocinas pró-inflamatórias no tecido inflamado, as células epiteliais são ativadas e também passam a produzir citocina, contribuindo para a quimiotaxia de neutrófilos para o local (WOODFIN; VOISIN; IMHOF; DEJANA *et al.*, 2009). Um dos eventos envolvido na migração celular é a junção do TNF- $\alpha$  com seu receptor, que promove a produção das quimiocinas CXCL1 e CXCL2 em sequência, mesmo que por tipos celulares diferentes. A CXCL1 é produzida pelo endotélio e é responsável pela forte adesão e movimentação das células pelo lúmen endotelial, mas para que ocorra a transmigração das células por junções endoteliais é necessária a liberação da CXCL2 por neutrófilos. Essa quimiocina se liga ao receptor atípico de quimiocina (ACKR1) mantendo sua exposição em células endoteliais, o que permite a interação de CXCL2/CXCR2 entre a célula endotelial e o neutrófilo (GIRBL; LENN; PEREZ; ROLAS *et al.*, 2018).

Durante as primeiras horas (6 a 24 horas) do processo inflamatório, as células predominantes no local são os neutrófilos, isso se deve ao fato de estarem presentes em grande quantidade na corrente sanguínea e serem responsivos às quimiocinas que orquestram a sua migração pelo endotélio vascular

(MOCSAI; WALZOG; LOWELL, 2015). Com o passar do tempo (24 a 48 horas), o monócito passa a ser o tipo celular predominante e, através da passagem pelo endotélio vascular em direção ao tecido por diapedese, se diferenciara em macrófago, que dependendo da fase inflamatória possuirá fenótipos diferentes. Na fase inicial por exemplo, são macrófagos do tipo M1, que possuem um perfil mais pró-inflamatório e microbicida, enquanto que na fase resolutive são do tipo M2, um perfil mais anti-inflamatório e resolutive (MOSSER e EDWARDS, 2008; MARTINEZ; HELMING; GORDON, 2009).

Outras moléculas, como as espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs), possuem um papel importante na inflamação, já que a produção dessas espécies reativas pode potencializar o processo inflamatório. O acúmulo de tais moléculas leva a ativação de vias de sinalização, como é caso da via do NF- $\kappa$ B, uma via redox sensível. Outras vias podem ativar fatores de transcrição e promover danos a biomoléculas, como as proteínas, a membrana lipídica e até mesmo o material genético (TORRES; FORMAN, 2003; GLOIRE; PIETTE, 2009; ZHANG; WANG; VIKASH; YE *et al.*, 2016; CUMPSTEY; FEELISCH, 2017).

A inflamação crônica é uma promotora clássica de várias doenças humanas, como a osteoporose (MUNDY, 2007), a artrite (SIMMONDS & FOXWELL, 2008) e as doenças inflamatórias intestinais (ARITA, *et al.*, 2005). Este processo resulta em um dano tecidual ainda maior, remodelação tecidual ineficiente e cicatrização tecidual inadequada, exemplificada pela deposição excessiva de matriz extracelular. A perpetuação da inflamação acontece devida a produção tardia, insuficiente ou até mesmo inexistente dos mediadores lipídicos pró-resolução (SPMs), que dificulta a resolução do processo inflamatório (revisado por SERHAN *et al.*, 2015).

## **2.2 Resolução**

Tradicionalmente, o processo resolutive, responsável por findar a inflamação, foi caracterizado como passivo (BUCKLEY, *et al.*, 2013; BUCKLEY, *et al.*, 2014), por meio de sinais que em conjunto contribuem para reverter o acúmulo de granulócitos no sítio inflamatório e reprogramar o tecido nos níveis celular e molecular, levando a um estado de “homeostase adaptada” (revisado por FULLERTON e GILROY, 2016).

Porém, atualmente, alguns estudos demonstraram que a resolução

é um processo ativo, sendo este caracterizado por uma sequência de eventos que são induzidas e coordenadas pelos SPMs. Esses lipídeos possuem a propriedade de controlar os eventos celulares para promover a limpeza do local da infecção ou lesão, removendo as células inflamatórias atuantes e restabelecendo a homeostase e função tecidual (SERHAN, *et al.*, 2014).

Os SPMs são advindos da transformação dos ácidos graxos essenciais ômega-6 e ômega-3, como ácido araquidônico, ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosaexaenóico (DHA). Eles são subdivididos nas famílias das lipoxinas (única proveniente do ômega-6), resolvinas (Rv), protectinas e maresinas (MaR). E assim como desempenham um papel importantíssimo na resolução do processo inflamatório, também estão envolvidos na defesa do hospedeiro contra microrganismos e lesões teciduais, bem como no remodelamento tecidual (SERHAN, 2014).

SPMs promovem a ativação de mecanismos específicos envolvidos na resolução da inflamação, como por exemplo, a regulação negativa de citocinas pró-inflamatórias; supressão das vias intracelulares que levam à inflamação; remoção e limpeza de detritos de células inflamatórias (SERHAN *et al.*, 2015).

O processo de resolução tem início quando as vias de sinalização são ativadas para o reconhecimento do antígeno, e assim que as vias pró-inflamatórias, ou algumas das moléculas envolvidas são atenuadas, o antígeno é eliminado. E então, a resolução da inflamação avança para uma nova fase. Isso ocorre devido a tentativa de amenizar a produção de citocinas pró-inflamatórias e outras moléculas, afim de evitar a cronicidade (FEEHAN e GILROY, 2019). Nesta fase, por exemplo, a PGE2 é oxidada com o objetivo de diminuir o recrutamento de neutrófilos, já que a sinalização PGE2 sobre os neutrófilos induz a expressão da enzima 15-lipoxigenase, promovendo a mudança de classe dos lipídeos inflamatórios para SPMs, como a lipoxina (LxA4) (LEVY; CLISH; SCHMIDT; GRONERT *et al.*, 2001).

A redução do recrutamento de leucócitos para o local da inflamação também promove a retirada dos neutrófilos da superfície endotelial, além de induzir a apoptose dessas células para posterior remoção dos corpos apoptóticos por macrófagos não recrutados para o tecido por meio da inflamação, bem como a retirada de debris inflamatórios e infecciosos. Por meio deste processo, a quantidade de citocinas pró-inflamatórias é reduzida, promovendo a regulação da homeostase

tecidual (SERHAN, 2014). Os macrófagos envolvidos na eferocitose podem se retirar do local de inflamação via vasos linfáticos, ou por apoptose (GILROY, *et al.*, 2003).

O número de neutrófilos no local da inflamação durante a resolução não é reduzido apenas pela diminuição do recrutamento dos mesmos, mas também por meio da apoptose (PERRETTI; SOLITO, 2004; SCANNELL; FLANAGAN; DESTEFANI; WYNNE *et al.*, 2007). Em meio a apoptose, as células secretam sinais quimioatraentes para macrófagos não envolvidos na inflamação até o momento, como CX3CL1, trifosfato de adenosina (ATP) e uridina trifosfato (UTP) (LAUBER *et al.*, 2003; GUDE *et al.*, 2008; TRUMAN *et al.*, 2008). Além de possuírem moléculas na superfície da membrana celular que funcionam como sinais de morte mediando a eferocitose (HE; KUBO; MORIMOTO; FUJINO *et al.*, 2011; RAVICHANDRAN, 2011). Após a eferocitose, o perfil inflamatório dos macrófagos produtores de moléculas pró inflamatórias, como TNF- $\alpha$  e LTB<sub>4</sub>, é alterado para o perfil resolutivo, e passam a produzir o fator de transformação do crescimento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), interleucina 10 (IL-10) e LXA<sub>4</sub> (ORTEGA-GOMEZ; PERRETTI; SOEHNLEIN, 2013), o que é de grande valia para o estabelecimento da homeostase e reparo tecidual.

### 2.3 Dor

O conceito de dor foi descrito primeiramente em 1986 pela associação internacional de estudo da dor (*International Association for the Study of Pain – IASP*), como uma experiência sensorial e emocional desagradável, que está fortemente associada a uma lesão propriamente dita ou mesmo a uma lesão em potencial (OTIS; FLOR e TURK, 2013). É considerada o quinto sinal vital em conjunto a função respiratória e térmica (LUNA, 2006), sendo também um sinal marcante presente entre os sinais cardinais da inflamação.

Para se referir a dor, também pode ser o utilizado o termo nocicepção, que está relacionado diretamente com o reconhecimento de sinais dolorosos envolvendo o sistema nervoso por meio da comunicação entre neurônios, chamados de nociceptores. Essa interação entre eles resulta em informações relacionadas as lesões (HELLEBREKERS, 2002).

Tendo como foco o papel da dor como sinal vital, quando qualquer parte do corpo (externa e/ou internamente) é exposto a qualquer agente com potencial nocivo, é iniciado o estímulo que induz a sensações desagradáveis. É

assim que o indivíduo é avisado sobre o possível agente agressor e, este sinal tem a intenção de diminuir os danos que possam ser causados. O estímulo nocivo precisa ser interpretado pelo organismo, e a informação resultante desta interpretação pode ser dividida em dor fisiológica ou patológica (FANTONI e MASTROCINQUE, 2002; ALMEIDA *et al.*, 2006).

A dor por ser dividida em nociceptiva e não nociceptiva. Dentro dessas categorias ainda se encontram subcategorias, onde a dor nociceptiva é subdividida em visceral ou somática; e a dor não nociceptiva em neuropática e simpática (JANEIRO, 2017).

A dor nociceptiva ocorre a partir de estímulos específicos relacionados diretamente a receptores de dor, podendo ser receptores relacionados à temperatura, distensão, vibração, e a substâncias químicas que podem ser liberadas por células que foram danificadas (KLAUMANN; WOUK e SILLAS, 2008; MOFFAT e RAE, 2011).

Nesta categoria se encontra a dor visceral, que acomete órgãos internos, e geralmente é precursora de algum processo patológico como por exemplo infecções, inflamações, neoplasias, alterações na motilidade ou na transmissão de sensações viscerais propagadas por nervos transmissores, ou ainda a isquemia. Este tipo de dor é frequentemente associada aos efeitos provocadas pelo sistema nervoso autônomo, como por exemplo a sudorese, palidez, náuseas, alguns distúrbios gastrointestinais, mudança da temperatura corpórea, ou alterações na pressão arterial e frequência cardíaca. É caracterizada como uma dor prolongada, subjetiva que se faz sentir como espasmos ou câibras (KLAUMANN; WOUK e SILLAS, 2008).

Já a dor nociceptiva smática é resultado de lesões que acometem a pele, músculos, articulações, ossos ou ligamentos, e pode ainda ser subdividida em dor superficial (também conhecida como dor cutânea) que se apresenta de maneira aguda e imediata e acomete principalmente a pele ou regiões de mucosa; ou profunda que normalmente é silenciosa, e causada por fissuras, fraturas, lesões musculares, de ligamento ou tendões, ou que comprometem os vasos sanguíneos (KLAUMANN; WOUK e SILLAS, 2008).

Ambos os processos de dor comentados anteriormente se iniciam por estímulos inevitáveis, aqueles que chegam até o córtex para serem interpretados. Com isso, são desenvolvidas respostas adaptativas específicas a

eles, e geralmente independentes (FANTONI e MASTROCINQUE, 2002; HELLEBREKERS, 2002).

Dentro da dor nociceptiva, estudam-se ainda a dor fisiológica, aquela responsável por induzir respostas de caráter protetor, como por exemplo a reação de fuga (reflexo de retirada), desenvolvido a fim de interromper a exposição ao estímulo considerado nocivo. E a dor patológica que está relacionada a estímulos dolorosos que se mantêm por longos períodos de tempo, e sendo responsáveis por estimular neurônios nociceptivos (que respondem a estímulos de dor) aferentes, potencializando os efeitos da dor (FANTONI e MASTROCINQUE, 2002; HELLEBREKERS, 2002).

E por outro lado se tem a dor não nociceptiva, esta dor não está associada a receptores específicos, é produzida por disfunções em células nervosas. A dor não nociceptiva se manifesta a partir do sistema nervoso periférico, e é classificada em neuropática ou simpática (MOULIN, *et al.*, 2007; HAANPÄÄ, *et al.*, 2011).

A dor neuropática é causada por uma disfunção ou lesão no nervo, ou por alguma doença que acometa o sistema nervoso somatossensorial. A lesão causadora da dor por ser parcial ou total, e pode ser localizada em qualquer região do sistema nervoso, sendo central ou periférico (BALLANTYNE, 2010; JENSEN, *et al.*, 2011). Entretanto, é um tanto difícil promover um diagnóstico assertivo, já que este processo patológico possui uma etiologia variável, multifatorial. E é pela complexidade desta dor e pela dificuldade de avaliar a verdadeira origem das lesões em vias sensitivas que os diagnósticos são por muitas vezes errôneos (MOULIN, *et al.*, 2007; POWELL, *et al.*, 2010; HAANPÄÄ, *et al.*, 2011).

É frequentemente associada a sintomas neurológicos capazes de reduzir a sensação ou promover a anestesia completa, ou ainda causar a hiperexcitabilidade. As sensações relacionadas a essa dor são descritas como formigamento ou dormência, e podem gerar grande impacto no dia a dia do paciente, alterando movimentos, levando a perturbação do sono, dificultando a concentração, promovendo até mesmo o avanço de doenças que são relacionadas a qualidade de vida, como a depressão (MOULIN, *et al.*, 2007; POWELL, *et al.*, 2010).

Em comparação, a dor simpática é causada pela hiperatividade proveniente da parte simpática do sistema nervoso vegetativo, responsável pelo controle do fluxo sanguíneo que irriga os tecidos. A dor simpática é de caráter

nervoso, chamada frequentemente de neuropatia, nevralgia, neurite, e ocorre em sua maioria após fratura ou lesões de tecido mole, o que resulta na denominada Síndrome Dolorosa Complexa Regional. Esse tipo de dor é não nociceptiva, já que não existe envolvimento de receptores específicos para dor (CASTRO-LOPES, *et al.*, 2010; POWELL, *et al.*, 2010; AZEVEDO, *et al.*, 2012).

Além do mais, quando se fala de dor, é indispensável que a dor seja discriminada de acordo com a sua duração, podendo então ser chamada de aguda, quando identificada no início, com um curto período de duração e que pode ter sua causa identificada com clareza. Em muitos casos, a dor aguda é benéfica, pois pode funcionar como um sinal de alerta, no entanto, quando não controlada pode retardar a cura, aumentar o risco de morbidade e evoluir para um quadro de dor crônica (GUYTON e HALL, 2011).

A dor crônica atinge cerca de 19% da população, possui um longo período de duração, entre 3 a 6 meses, ou superior a isso (BREIVIK, *et al.*, 2006; RISKOWSKI, 2014; NAHIN, 2015). Está diretamente ligada a destruição tecidual, embora seja de causa multifatorial, e por consequência, pode levar a diversos estados patológicos (Direção-Geral da Saúde. Plano Nacional de Luta Contra a Dor, 2001; Direção-Geral da Saúde. Programa Nacional de Controlo da Dor, 2008; GUYTON e HALL, 2011; CHERUBINO, *et al.*, 2012).

A dor crônica reflete diretamente na vida do paciente desde o estado psicológico, bem como um aumento da suscetibilidade a infecções, já que as consequências a dor são de caráter múltiplo e prejudicam funções fisiológicas, deprimindo o sistema imunológico (HELLEBREKERS, 2002).

Vale lembrar que entre a maioria das causas de dores crônicas estão as doenças osteoarticulares, desde um trauma, até a osteoporose, osteoartrite e artrite reumatoide, e além dessas, a cefaleia também tem seu destaque como etiologia da dor crônica (CASTRO-LOPES, 2010).

Por outro lado, a dor inflamatória é responsável por induzir a hipersensibilidade mecânica e térmica na ausência de estímulos nocivos. A dor pode ser exacerbada pela sensibilização de nociceptores, promovendo um estado conhecido como hiperalgesia, ou seja, uma resposta da dor aumentada por um estímulo doloroso (VERRI *et al.*, 2006), ou alodinia que se refere a resposta nociceptiva os estímulos não dolorosos (FERREIRA; FERRARI; CUNHA; NASCIMENTO *et al.*, 2009). Essa excitabilidade do neurônio sensorial primário

acontece pela ação do TNF- $\alpha$  e da IL-1 $\beta$  através ligação das mesmas em seus receptores (receptor de fator de necrose tumoral alfa (TNFR1) e receptor de interleucina 1 do tipo 1 (IL-1R1) respectivamente), presentes no neurônio periférico aferente primário (CUNHA; POOLE; LORENZETTI; FERREIRA, 1992; SORKIN; DOOM, 2000; CUNHA; VERRI; SILVA; POOLE *et al.*, 2005; JIN; GEREAU, 2006; EBBINGHAUS; UHLIG; RICHTER; VON BANCHET *et al.*, 2012; GUDES; BARKAI; CASPI; KATZ *et al.*, 2015).

A resposta a dor inflamatória é um tanto quanto complexa, e quando há interação entre o TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  e seus receptores, há a ativação de map quinases, como por exemplo a p38, capaz de promover a fosforilação de canais como Nav1.8. Essa fosforilação garante o aumento significativo de potenciais de ação e excitabilidade neuronal (CUNHA; VERRI; SILVA; POOLE *et al.*, 2005; GUDES; BARKAI; CASPI; KATZ *et al.*, 2015).

A sensibilização da dor inflamatória é mediada por outros mediadores inflamatórios na periferia, como a PGE2, a histamina e algumas citocinas que podem ser liberadas por mastócitos, macrófagos e neutrófilos presentes no meio (FATTORI, HOHMANN, *et al.*, 2017; PINHO-RIBEIRO, VERRI, & CHIU, 2017). Esses leucócitos que podem ser residentes teciduais ou recrutados para o local da lesão são de extrema importância para a manutenção da dor inflamatória devido ao fato de produzirem os mediadores inflamatórios para perpetuação a inflamação (CUNHA; VERRI; SCHIVO; NAPIMOGA *et al.*, 2008; OLD; NADKARNI; GRIST; GENTRY *et al.*, 2014; SCHUH; PIERRE; WEIGERT; WEICHAND *et al.*, 2014; AICH; AFRIN; GUPTA, 2015). Por outro lado, na medula espinhal a excitação é mediada por citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento que são produzidas e liberadas por células da glia, pela micróglia, astrócitos e oligodendrócitos (SCHOLZ & WOOLF, 2007; ZARPELON *et al.*, 2016; FATTORI, BORGHI, *et al.*, 2017).

### **2.3.1 Mecanismo de Dor**

O mecanismo de dor é um fenômeno neurológico enredado, que acontece mediante a comunicação entre neurônios aferentes primários capazes de conduzir os estímulos nociceptivos. Esses neurônios sensoriais são chamados de nociceptores e são unidades primárias da dor. São neurônios cujos corpos celulares estão agrupados na raiz dorsal ou nos gânglios trigeminais (BARROT, 2012), e que

possuem a função de manter a homeostase tecidual reconhecendo uma injúria real ou em potencial. Podem mediar a dor e inervar densamente os tecidos periféricos, incluindo as articulações, a pele, o trato gastrointestinal e as vias respiratórias (MORAES, *et al.*, 2013; PINHO-RIBEIRO, VERRI e CHIU, 2017).

A condução de sinais dolorosos é bastante responsiva a modulação entre outros neurônios produtores e secretores de neurotransmissores inibitórios ou excitatórios (TRESGUERRES, *et al.*, 2005; KLAUMANN, WOUK e SILLAS, 2008; GUYTON e HALL, 2011; MORAES, *et al.*, 2013).

A nocicepção é o componente fisiológico da dor, o processo neural de codificação de estímulos nocivos, e é composto por três processos bases, transdução, transmissão e percepção. A transdução transforma a energia do estímulo em potenciais de ação pelo receptor, enquanto a transmissão dispara os sinais pelo sistema nervoso. E a percepção promove a modulação dos sinais nervosos formados em resposta a um estímulo externo considerado nocivo (MESSLINGER, 1997; TRANQUILLI, 2004; TRESGUERRES, *et al.*, 2005; GUYTON e HALL, 2011; ROBINSON, 2012; WIDMAIER, *et al.*, 2013).

A passagem de sinal acontece basicamente pela conexão entre três neurônios, sendo eles o neurônio de primeira ordem gerado na periferia e que se projeta até a medula espinal, já o neurônio de segunda ordem ascende pela medula espinal e o de terceira ordem se alonga para o córtex cerebral (MESSLINGER, 1997; TRANQUILLI, 2004). Se a informação que estes neurônios estão traduzindo encontra a consciência, é chamada de sensação, e quando a mesma é percebida pelo organismo recebe o nome de percepção (TRESGUERRES, *et al.*, 2005; KLAUMANN, WOUK e SILLAS, 2008; GUYTON e HALL, 2011; MORAES, *et al.*, 2013).

Os nociceptores respondem a três estímulos capazes de excitar os receptores relacionados ao processo de dor, estes estímulos são de natureza mecânica, química e/ou térmica. Estes neurônios se utilizam de uma via para a propagação da dor aguda e outra para a dor crônica. Isso só é possível devido as fibras, componentes neuronais intimamente ligados a transdução de sinal (TRESGUERRES, *et al.*, 2005; KLAUMANN, WOUK e SILLAS, 2008; GUYTON e HALL, 2011; MOFFAT e RAE, 2011).

As vias utilizadas pelos nociceptores são organizadas pela na medula espinal e encéfalo, e são chamadas de via ascendente ântero-lateral ou

espino-talâmica, utilizada para a condução da dor rápida, e a via da coluna dorsal, que pode também ser denominada porção de substância branca é responsável pela condução da dor lenta (figura 2) (WIDMAIER, *et al.*, 2013).

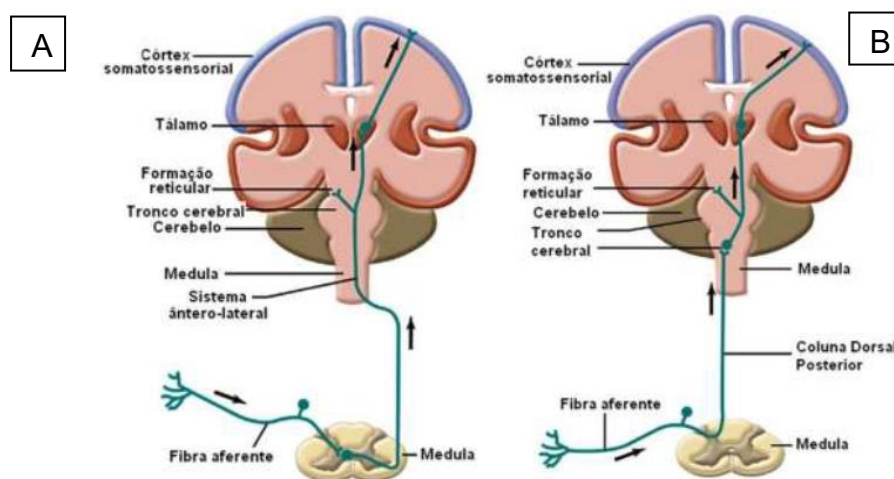


Figura 2: Sistema ântero-lateral (A) e Sistema da coluna dorsal (B). Adaptado de Widmaier EP, Raff H, Strang KT. Vander, Sherman & Luciano - Fisiologia Humana: Os Mecanismos das Funções Corporais. 12a. Guanabara, editor. 2013. 197-213 p.

As fibras são classificadas em relação ao seu diâmetro, grau de mielinização e sua velocidade de condução. As fibras A $\beta$  são mielinizadas, de diâmetros maiores que 10  $\mu\text{m}$ , com capacidade de condução rápida e responsáveis por sensações inócuas. Já as A $\delta$  possuem diâmetro intermediário de 2 a 6  $\mu\text{m}$ , são mielinizadas, conduzem a informação com velocidade intermediária, e estão ligadas a primeira fase da dor, aquela mais aguda. As fibras C são de diâmetro pequeno, de 0,4 a 1,2  $\mu\text{m}$ , não possuem mielina, e por esse motivo, a velocidade de condução é lenta. Essas fibras são responsáveis pela dor difusa (MESSLINGER, 1997; LAMONT e TRANQUILLI, 2000; MUIR III *et al.*, 2001).

A transmissão do sinal nociceptivo ocorre tanto pelas fibras C, quanto pelas fibras A $\delta$ , que se encontram presentes na pele, vasos sanguíneos, na região peritoneal, pleura, tendões, cápsula articular, fibras do músculo esquelético, entre outras localidades (MESSLINGER, 1997; LAMONT e TRANQUILLI, 2000; MUIR III *et al.*, 2001). As duas acima são do tipo aferente primárias, e terminam no corno superior da medula, de onde vários feixes se ramificam em direção ao córtex

cerebral, sistema límbico e hipotálamo (TRESGUERRES, *et al.*, 2005; KLAUMANN, WOUK e SILLAS, 2008; GUYTON e HALL, 2011; MOFFAT e RAE, 2011).

Os sinais dolorosos pontuais rápidos que desencadeiam a dor aguda são provocados por estímulos mecânicos ou térmicos, e transmitidos pelos nervos periféricos em direção a medula espinal através de fibras A $\delta$ . Por outro lado, a dor crônica é produzida em grande maioria por estímulos dolorosos do tipo químico, e algumas vezes mecânicos ou térmicos persistentes. Este tipo de dor é transmitido para a medula espinal por fibras do tipo C (TRESGUERRES, *et al.*, 2005; KLAUMANN, WOUK e SILLAS, 2008; GUYTON e HALL, 2011; MOFFAT e RAE, 2011).

Para que toda essa propagação de informação aconteça, as fibras aferentes de primeira ordem promovem conexões diretas ou indiretas com neurônios do corno dorsal da medula, os interneurônios excitatórios e inibitórios, os neurônios proprioespinais, estendidos por diversos segmentos espinhais que se encontram envolvidos com a atividade reflexa. E por fim, os neurônios de projeção ligados a transmissão rostral por meio da medula espinal até o mesencéfalo e córtex. A interação entre essas três populações neuronais são essenciais para a percepção da informação nociceptiva, e facilitam a produção de uma resposta organizada à dor (MILLAN, 1999; LAMONT e TRANQUILLI, 2000; DREWES, 2006).

A interação entre os neurônios ocorrem por meio de mediadores químicos, chamados de neurotransmissores, que consistem em aminoácidos excitatórios ou inibitórios, e neuropéptídeos que são produzidos, armazenados e secretados tanto nas terminações dos nervos aferentes como em neurônios do corno dorsal. Os neurotransmissores excitatórios comumente envolvidos no processo são o glutamato e o aspartato, toda via, em fibras C também são encontrados a substância P, a neurotensina, o peptídeo intestinal vasoativo (VIP), o peptídeo relacionado com o gene da calcitonina (CGRP) e colecistocinina (LAMONT e TRANQUILLI, 2000; RYGH *et al.*, 2005).

Os eventos que originam o fenômeno sensitivo doloroso se iniciam na transformação dos estímulos ambientais físicos ou químicos em potenciais de ação, que serão transmitidas a partir das fibras nervosas periféricas até o sistema nervoso central (SNC). Isto é possível devido aos receptores nociceptivos, que se encontram em terminações nervosas livres, que constituem as fibras mielínicas finas (A $\delta$ ) e amielínicas (C). Estes receptores são classificados de acordo com os

estímulos que chegam até eles, como termomecânicos, químicos e aqueles que são provenientes de lesões teciduais inespecíficas são chamados de polimodais inespecíficos (TEIXEIRA, 1990; WAISBROD, 1984).

A propagação do estímulo pode acontecer a partir da ativação em processos inflamatórios, quando os receptores se encontram em condições normais, e neste estado recebem o nome de silenciosos e normalmente estão relacionados as fibras C. E podem acontecer também em intensidades diferentes, caracterizando então os diversos eventos relacionados a percepção do estímulo. Neste caso, quando os receptores são sensibilizados por substâncias químicas (substâncias algioênicas) como a bradicinina, a acetilcolina (ACh), prostaglandinas (PGs), tromboxano, histamina, serotonina (5-HT), íons de potássio, entre outros, que são liberadas em grandes concentrações em tecidos lesionados por alguns tipos celulares como mastócitos. Essas substâncias são responsáveis pela hiperalgesia térmica/mecânica primária, e outros efeitos como por exemplo a vasodilatação proveniente de lesões isquêmicas, traumáticas ou inflamatórias (TEIXEIRA, 2001; MARQUEZ, 2004).

Os canais iônicos, são sensíveis aos estímulos nocivos. Quando os canais iônicos sensíveis ao ácido (ASICs) e o receptor de potencial transitório vanilóide 1 (TRPV1) presentes em nociceptores são ativados, promovem o influxo de cálcio para o terminal pré-sináptico (SMITH E LEWIN, 2009; BARON; BINDER; WASNER, 2010).

Contribuindo para excitabilidade da membrana dos nervos nociceptivos, promovendo a despolarização do nociceptor envolvido, gerando um potencial receptor. Se este possui a intensidade suficiente para atingir o limiar de ativação dos canais para sódio ( $\text{Na}^+$ ) dependente de voltagem ( $\text{NaV}$ ), ele irá promover o potencial de ação e a transmissão de um sinal de dor para a medula espinal (DUBIN E PATAPOUTIAN, 2010; REICHLING, GREEN E LEVINE, 2013; HUANG, *et al.*, 2021).

E vale lembrar que o TRPV1 é expresso no cérebro em nociceptores de fibra C, presentes no gânglio da raiz dorsal (DRG) e sua hiperativação pode facilitar a inflamação (PARK, *et al.*, 2011; HUANG, *et al.*, 2021).

## 2.4 Interação entre a nocicepção e sistema imunológico

Sabe-se que o sistema imunológico pode alterar o processamento sensorial e emocional e desempenha um papel fundamental no desenvolvimento e manutenção da dor persistente (VERMA; SHEIKH e AHMED, 2015).

A comunicação entre o sistema imune e o sistema nervoso somatossensorial periférico é possível devido aos receptores para neuropeptídeos, neurotransmissores e moléculas indutoras da inflamação expressos em células imunes (GODINHO-SILVA; CARDOSO; VEIGA-FERNANDES, 2019). A IL-1, é um pirogênio e induz a transcrição da ciclooxigenase-2 (COX-2), o que provoca o aumento da produção de PGE2. Por outro lado, o TNF- $\alpha$  está envolvido a ativação de inflamassomas (revisto por SINGHAL, *et al.*, 2014).

Algumas dessas moléculas como PGs, bradicinina, serotonina, histamina, tromboxanos, fator ativador de plaquetas (PAF), purinas e seus derivados (BURNSTOCK, 2009), radicais livres (MILLER, *et al.*, 2009), e neurotrofinas, especialmente fator de crescimento nervoso (NGF) podem ativar nociceptores diretamente (WATSON; ALLEN e DAWBARN, 2008). A relação dos mediadores com as células residentes, como macrófagos e mastócitos, e células recrutadas como queratinócitos e fibroblastos podem recrutar células a nível sistêmico, levando a sensibilização periférica (VERMA; SHEIKH e AHMED, 2015).

Os mastócitos são os primeiros respondedores da inflamação periférica e desempenham um papel crucial no estabelecimento da dor (CHATTERJEA e MARTINOV, 2015). Os nervos danificados liberam TNF- $\alpha$  (SHUBAYEV, 2006) e IL-15 (GÓMEZ-NICOLA), promovendo o recrutamento de macrófagos e infiltração de células T. Algumas citocinas, ATP, bradicinina, NGF e PGE2 estimulam os nervos periféricos A $\delta$  e C. Promovendo à liberação de neuropeptídeos, substância P, CGRP, PGs e glutamato, o que agrava a inflamação. Como esses eventos são causados pela participação ativa dos nervos periféricos, é conhecida como inflamação neurogênica (RICHARDSON e VASKO, 2002). Assim, nervos e células imunes envolvem-se em um ciclo vicioso com mecanismo de avanço, estimulando-se mutuamente e propagando tanto a inflamação quanto a nocicepção (VERMA; SHEIKH e AHMED, 2015).

O sistema nervoso somatossensorial é responsável pela percepção de estímulos provenientes do ambiente e os internos do hospedeiro. Os corpos dos

neurônios envolvidos no processo de percepção se encontram nos DRGs e no gânglio trigêmeo, e são eles os responsáveis pelas percepções de estímulos térmicos, ao toque, cinestesia, coceira e dor; e no caso de estímulos nocivos, térmicos, mecânicos e inflamatórios, a percepção é captada pelo neurônio primário, o nociceptor (BASBAUM; BAUTISTA; SCHERRER; JULIUS, 2009).

Os canais de cálcio dependentes de voltagem (VGCCs), além dos receptores TRPV1 e do TRP anquirina 1 (TRPA1), também contribuem para excitação excessiva de neurônios aferentes primários envolvidos na inflamação neurogênica (SEKIGUCHI e KAWABATA, 2013; PIETROBON, 2013; CORRIGAN, et al., 2016; ROCA-LAPIROT, 2018).

Este neurônio possui vesículas densas repletas de neuropeptídeos que se localizam nas terminações nervosa central e periférica. Isto diz muito sobre o modo com o nociceptor responde a lesão, por exemplo, frente a uma lesão periférica o nociceptor responde liberando neuropeptídeos por meio do terminal nervoso central, propagando o estímulo doloroso para o sistema nervoso central, do corpo celular do neurônio para a porção terminal do axônio (denominado sentido ortodrômico). Ou ainda através do reflexo axonal liberando neuropeptídios no terminal nervoso periférico, de modo contrário ao sentido normal (impulso antidrômico) controlando a resposta inflamatória contra o antígeno (PINHO-RIBEIRO; VERRI; CHIU, 2017).

Os neuropeptídeos secretados pelos nociceptores promovem a modulação da resposta inflamatória, o controle das células imunes, causam inflamação neurogênica na periferia, e pode causar neuroinflamação por meio da ativação de células da glia residentes da medula espinal (CHIU; VON HEHN; WOOLF, 2012; XANTHOS; SANDKUHLER, 2014; PINHO-RIBEIRO; VERRI; CHIU, 2017; CHU; ARTIS; CHIU, 2020).

A micróglia (MG) é derivada de macrófagos e possui um papel importante na imunidade do sistema nervoso (GINHOUX, 2013). O aumento da densidade da MG (microgliose) é um achado comum em casos de lesão nervosa, neuropatias e outras condições dolorosas (CALVO, *et al.*, 2010). Os nervos aferentes primários envolvidos liberam neuregulina-1, que ao se ligar aos receptores erbB2 na MG, contribui para a hipersensibilidade e alodinia. E ainda, a suprarregulação da matriz metaloproteinase-9 (MMP-9) nestes nervos causa aumento da expressão da fosforilação das proteínas quinases ativadas por

mitógenos CD11b e P38 (p38MAPK) em MG. Este fato tem sido associado à hipersensibilidade mecânica associada (KAWASAKI, *et al.*, 2008). A liberação de CCL21 pela micróglia durante o evento nocivo leva à regulação positiva do receptor purinérgico P2X4, que está associada à alodinia (THALAKOTI, *et al.*, 2007), enquanto que a liberação de CCL2 nos nervos durante a dor causa migração de monócitos no SNC (ZHANG, *et al.*, 2007).

Esta inflamação neurogênica mediada pelos neuropeptídeos atua sob o leito vascular, sobre as células endoteliais e musculatura vascular lisa. Neuropeptídeos como o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e a substância P, quando liberados, podem modular a resposta inflamatória local (SARIA, 1984; BRAIN; WILLIAMS, 1989; MCCORMACK; MAK; COUPE; BARNES, 1989; CHIU; VON HEHN; WOOLF, 2012). CGRP promove a vasodilatação e substância P impulsiona o aumento da permeabilidade vascular, contribuindo para a promoção dos sinais inflamatórios, como o extravasamento do líquido plasmático e, conseqüentemente, o edema tecidual (SARIA, 1984; BRAIN; WILLIAMS, 1989; MCCORMACK; MAK; COUPE; BARNES, 1989).

A IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 influenciam a nocicepção a nível central. A IL-6 circulante, liberada durante a inflamação periférica, induz a liberação de PGE2 através da via COX-2 das células endoteliais no SNC (OKA, *et al.*, 2007). Com isso há uma remodelação da arquitetura neuronal após o início da dor aguda persistente, o que promove à transição de uma dor aguda para um estado de dor crônica. Os neurônios relacionados a dor sensibilizados reagem mais intensamente aos estímulos e desenvolvem mais conexões com neurônios de segunda ordem dentro do SNC (WEI, *et al.*, 2008). Este fenômeno é chamado de neuroplasticidade, e é crucial no prognóstico de qualquer condição dolorosa como a resolução ou a cronificação (VERMA; SHEIKH e AHMED, 2015).

É possível observar o estado de dor crônica durante a neuroinflamação, onde há um aumento na excitabilidade do nociceptor, promovendo o aumento da entrada de informação dolorosa no corno dorsal da medula espinal (JI; XU; GAO, 2014; XANTHOS; SANDKUHLER, 2014). Portanto, a modulação da atividade das células da glia é realizada pelos neuropeptídeos, sendo de grande valia, já que, são as células da glia que desempenham um importante papel na manutenção da sensibilização central na dor crônica, bem como o papel imune na medula espinal (XANTHOS; SANDKUHLER, 2014; PINHO-RIBEIRO; VERRI; CHIU,

2017; JI; NACKLEY; HUH; TERRANDO *et al.*, 2018).

## 2.5 Artrite

A etiologia da doença ainda é pouco compreendida, mas ao que se sabe, há o envolvimento de componentes genéticos e fatores ambientais que desempenham um papel importante na indução, e progressão de doenças articulares (VAN DER HELM-VAN MIL; WESOLY e HUIZINGA, 2005; KLARESKOG; PADYUKOV e ALFREDSSON, 2007). As infecções bacterianas também estão associadas ao desenvolvimento de inflamação das articulações, devido ao ambiente infeccioso (VOJDANI, 2014).

Viu-se que os receptores do tipo toll, constituintes de uma família de proteínas transmembranares, caracterizadas por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) codificados por linha germinativa, expressos em vários tipos celulares, como células imunes e neurônios (AKIRA e TAKEDA, 2004; TAKEUCHI e AKIRA, 2010; LEE, LEE, CHO e LEE, 2013), também se encontram expressos na membrana sinovial de pacientes com artrite, o que demonstra a possibilidade de novos mecanismos de indução da doença (OSPELT, *et al.*, 2004; RADSTAKE, *et al.*, 2004; COR, 2005; TAMAKI, *et al.*, 2011).

O processo inflamatório pode atingir os espaços articulares, promovendo inflamação e degeneração progressiva destes tecidos, o que resulta em distúrbios articulares, fortemente marcados pela dor articular. Este processo de dor é caracterizado não só por uma dor espontânea, perceptível mesmo em repouso, mas também por um aumento significativo da sensibilidade à dor, denominado clinicamente como hiperalgesia (SCHAIBLE, *et al.*, 2009). Neste caso, a hiperalgesia articular, que é mediada por um mecanismo que envolve a produção e secreção de citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , interleucina 33 (IL-33) (FATTORI, AMARAL e VERRI, 2016), e quimiocinas atuantes na via de sinalização de TLR2/MyD88 (GUERRERO, *et al.*, 2012), bem como o processo de necrose, podem ainda agravar a dor e o estado da doença (FATTORI, AMARAL e VERRI, 2016).

Estudos recentes sugerem que a formação de imunocomplexo podem ativar nociceptores que ao atuar em receptores Fc $\gamma$ RI e Fc $\gamma$ RIIb que se encontram expressos em neurônios TRPV1<sup>+</sup> de camundongos podem induzir a liberação de neuropeptídeos e promover a ativação de nociceptores, produzindo a dor (BERSELLINI FARINOTTI *et al.*, 2019).

As diferentes formas da artrite são doenças crônicas, e deste modo, é necessário que o tratamento seja realizado também ao longo da vida para controlar o processo inflamatório e prevenir a possível destruição da cartilagem e do osso. Para tanto, tem-se utilizado drogas antirreumáticas modificadoras da doença (DMARDs) isoladas ou de maneira combinadas a outros medicamentos para o tratamento de diferentes tipos de artrite (SINGH, *et al.*, 2016; KOLASINSKI, *et al.*, 2020).

Muitos pacientes adquirem o controle da doença com o uso das DMARDs, porém uma parte dos pacientes continua sentindo a dor de maneira significativa mesmo no caso de baixa atividade da doença (WELSING, *et al.*, 2005; LEE, *et al.*, 2014) ou em processo de remissão (LEE, *et al.*, 2011). Mesmo que a doença seja controlada, as DMARDs promovem efeitos colaterais típicos, assim como todos os outros medicamentos, porém, neste caso, apresentam-se como o aumento da suscetibilidade a infecções, desenvolvimento de imunidade adaptativa contra os agentes biológicos (FATTORI, AMARAL e VERRI, 2016; SINGH, *et al.*, 2016; KOLASINSKI, *et al.*, 2020), remissão da doença para fase ativa e o aumento de dores articulares (SCHIPPER, *et al.*, 2010).

A progressão da inflamação das articulações de maneira crônica promove alterações morfológicas caracterizadas pela destruição das superfícies de sustentação de peso das articulações, originando um quadro clínico característico de distúrbios articulares, gerando a progressão da doença e a necessidade de substituição parcial ou total das superfícies teciduais destruídas, este procedimento é denominado artroplastia (COBELLI, *et al.*, 2011).

O uso prolongado de medicamentos promove efeitos deletérios profundos na função do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e no osso, levando à osteoporose, fraturas e necrose da cabeça do fêmur, desencadeando um quadro onde a artroplastia faz-se necessária (LAEV e SALAKHUTDINOV, 2015). Por este lado, o procedimento de artroplastia tem sua importância, e é bem-sucedida para o alívio da dor artrítica, e para restauração da mobilidade, melhorando a qualidade de vida dos pacientes. Entretanto, nem sempre este procedimento é satisfatório, e quando falha, resulta em infecções ou a perda de fixação óssea (denominada soltura asséptica) devido à osteólise nos tecidos peri-protéticos (ULRICH, *et al.*, 2008; COBELLI, *et al.*, 2011).

### 2.5.1 Modelo de Artrite induzida por Dióxido de Titânio

O dióxido de titânio ( $\text{TiO}_2$ ) é uma substância em estado sólido, inodoro, de cor branca e que se encontra entre os nanomateriais mais utilizados, devido à sua alta estabilidade, seu potencial anticorrosivo, e atividade de superfície e propriedades fotocatalíticas (GURR, *et al.*, 2005; LAPAS, 2015). O  $\text{TiO}_2$  é utilizado em diversos ramos, como na cosmética, em produtos farmacêuticos e próteses ortopédicas (GURR, *et al.*, 2005), sendo um dos biomateriais utilizados no processo de artroplastia (WOOLEY, *et al.*, 2002; COBELLI, *et al.*, 2011).

O acúmulo de titânio em tecidos humanos é caracterizado pela deposição de um pigmento preto, seguido por um processo fibroso, necrose ou reações granulomatosas (MORAN; MULLICK; ISHAK; JOHNSON *et al.*, 1991). O  $\text{TiO}_2$  é um composto que interage facilmente com o ácido desoxirribonucleico (DNA), devido a sua capacidade de penetrar a barreira epitelial induzindo dano oxidativo do DNA (DUNFORD, *et al.*, 1997). Também é caracterizado por promover danos teciduais de graus variados por permanecer preso em tecidos e órgãos (CHE, *et al.*, 2009; WANG, *et al.*, 2009).

O dano tecidual ocorre por meio de algumas partículas de titânio que se desprendem das próteses devido ao processo de desgaste. Essas partículas induzem a ativação da resposta imunológica, ativando as células imunes residentes no local, como por exemplo os macrófagos, que promovem a fagocitose desses resíduos do desgaste (ST PIERRE, *et al.*, 2010).

Com a ativação das células imunes residentes e a capacidade que essas células têm de produzir mediadores químicos, como receptor ativador do NF- $\kappa$ B (RANKL), citocinas pró-inflamatórias, incluindo o TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, e também espécies reativas de oxigênio, assim, a resposta inflamatória asséptica no local da prótese é perpetuada (WOOLEY, *et al.*, 2002; WANG, *et al.*, 2010; COBELLI, *et al.*, 2011).

Essa inflamação instalada no local leva a produção de novos osteoclastos e a ativação dos osteoclastos residentes, de maneira dependente ou independente do receptor ativador do NF- $\kappa$ B (RANK), este processo contribui para a reabsorção óssea e aumentando o processo de lise óssea (WOOLEY, *et al.*, 2002; COBELLI, *et al.*, 2011; O'BRIEN; FISSEL; MAEDA; YAN *et al.*, 2016). Devido a todo

esse quadro de resposta imunológica, a prótese de titânio é rejeitada pelo organismo e há a necessidade de uma nova cirurgia para a remoção ou substituição da prótese (BORGHI, *et al.*, 2017).

E ainda, o TiO<sub>2</sub> induz a resposta inflamatória broncoalveolar, afetando diversos órgãos e influenciando na extensão da resposta inflamatória gerada no trato respiratório (SILVA, *et al.*, 2013; BAISH, *et al.*, 2014).

## 2.6 Colite Ulcerativa

A colite ulcerativa (CU) faz parte de um grupo de doenças denominado doenças inflamatórias intestinais (DII). É uma doença inflamatória crônica, de etiologia idiopática, e sua manifestação é mais comum em adultos por volta dos 30 a 40 anos, resultando na incapacidade em realizar algumas tarefas (TORRES, *et al.*, 2012; HØIVIK, *et al.*, 2013). A inflamação que acomete a mucosa do colón é recorrente e remitante, de afeta apenas o cólon forma difusa e não transmural, e pode afetar ambos os sexos (BAUMGART e SANDBORN, 2007; UNGARO, *et al.*, 2017), se apresenta por meio de diarreia, muitas vezes sanguinolenta e com presença de muco (RUFO, 2006; DIGNASS, *et al.*, 2012).

Embora a etiologia precisa da CU não seja clara, é bem reconhecido que o aumento da produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  e IL-33, são responsáveis pela inflamação da mucosa intestinal (MCGUCKIN, *et al.*, 2009).

Os pacientes diagnosticados com CU podem apresentar sintomas que incluem urgência, e incontinência fecal, fadiga, aumento da frequência de evacuações, defecações noturnas e cólicas abdominais, e dor abdominal, embora menor em comparação com a doença de Crohn (DC) (BAUMGART e SANDBORN, 2007). Além do mais, sintomas como febre e perda de peso podem apresentar-se na doença na forma grave (SILVERBERG, *et al.*, 2005).

Muitos estudos são realizados acerca da causa da doença, e sabe-se que de 8 a 14% dos pacientes diagnosticados com colite ulcerativa possuem histórico familiar de doença inflamatória intestinal, sendo que os parentes de primeiro grau têm quatro vezes o risco de desenvolver a doença (HALME, *et al.*, 2006; MOLLER, *et al.*, 2015). Em relação à etnias, estudos dizem que as populações judaicas possuem taxas mais altas de pacientes com colite ulcerativa do que outras

(BERNSTEIN, *et al.*, 2006; ANANTHAKRISHNAN, 2015).

A respeito das características genéticas da doença, alguns estudos identificaram cerca de 200 *locus* de risco para doença inflamatória intestinal, e a maioria dos genes contribuem para os fenótipos da colite ulcerativa e doença de Crohn. No caso da CU, têm-se como exemplo o antígeno leucocitário humano e genes associados à função de barreira, como HNF4A e CDH1 (BARRETT, *et al.*, 2009; JOSTINS, *et al.*, 2012).

Dentre os fatores de risco está o hábito de fumar, e sabe-se que os ex-fumantes são mais propensos ao desenvolvimento da doença, enquanto os fumantes ativos são menos propensos em comparação aos ex-fumantes e não fumantes. E ainda, fumantes ativos desenvolvem um curso mais leve da doença (ODES, *et al.*, 2001; BEAUGERIE, *et al.*, 2001; BIRRENBACH e BÖCKER, 2004; MAHID, *et al.*, 2006; ANANTHAKRISHNAN, 2015). Além do fumo, os fatores de risco são diversos, com o uso de medicamentos como os contraceptivos orais, terapia de reposição hormonal e anti-inflamatórios não esteroides (CORNISH, *et al.*, 2008; HVIID, SVANSTRÖM e FRISCH, 2011; ANANTHAKRISHNAN, *et al.*, 2012; KHALILI, *et al.*, 2012; UNGARO, *et al.*, 2014; NG, *et al.*, 2015; KO, *et al.*, 2015).

Quanto a patogênese da doença, estão envolvidas alterações nos colonócitos, células epiteliais do cólon, onde a expressão do receptor gamma ativado pelo proliferador de peroxissomo (PPAR- $\gamma$ ), conhecido como um regulador negativo da inflamação dependente de NF- $\kappa$ B é reduzida em pacientes com CU, bem como estimular defeitos na barreira da mucosa e epitelial (JIANG, TING e SEED, 1998; DUBUQUOY, *et al.*, 2003).

A lesão na mucosa provoca a produção de uma família de proteínas derivadas de células caliciformes (os fatores de trevo). Proteínas essas que contribuem para a integridade da barreira da mucosa (PODOLSKY e ISSELBACHER, 1984; MASHIMO, *et al.*, 1996). Em pacientes diagnosticados com CU na forma ativa da doença é possível observar células caliciformes colônicas diminuídas, ou até mesmo esgotadas, e por consequência, uma barreira permeável constituída de muco (JOHANSSON, *et al.*, 2014).

Embora não esteja totalmente esclarecido como os receptores do tipo Toll estão envolvidos na patogênese da doença, alguns estudos demonstraram que a expressão dos receptores do tipo Toll 2 (TLR2) e TLR4 estão aumentados nos colonócitos e na lâmina própria na CU ativa (HAUSMANN, *et al.*, 2000). Além disso,

células ativadas como neutrófilos se acumulam no sangue e no colón de pacientes com CU na forma ativa em comparação com voluntários normais, e a expressão de moléculas coestimuladoras encontram-se aumentadas, o que aparentemente tende a ser uma resposta a quebra da integridade da barreira intestinal (HART, *et al.*, 2005).

As células linfoides inatas (ILCs), como as ILC3 são as principais mediadoras da inflamação intestinal crônica (BUONOCORE, *et al.*, 2010). Quando isoladas de pacientes com CU ativa, estas células apresentam expressão gênica aumentada das principais citocinas produzidas por ILC3, como a interleucina 17A (IL-17A) e interleucina 22 (IL-22), bem como fatores de transcrição (RORC e AHR) e receptores de citocinas, como o receptor da interleucina 23 (IL23R) (GEREMIA, *et al.*, 2011).

A colite ulcerativa é caracterizada como uma doença de padrão Th2, onde células T do tipo Th2 produtoras de interleucina 5 (IL-5) se encontram na lâmina própria do cólon (FUSS, *et al.*, 1996). Os níveis de mRNA de interleucina 4 (IL-4) e interleucina 13 (IL-13) se encontram consideravelmente aumentados em biópsias retais de pacientes com CU em comparação com pacientes considerados livres da doença (INOUE, *et al.*, 1999). Além disso, a IL-13, advinda de células natural killer (NK) não clássicas é tida como um mediadora da citotoxicidade epitelial e disfunção da barreira na doença (FUSS, *et al.*, 2004; HELLER, *et al.*, 2005).

Experimentalmente, o TGF- $\beta$  adicionado a cultura de células pode reprogramar a diferenciação de células de TCD4<sup>+</sup> naive para o padrão Th2, em outro fenótipo. Sendo este produtor de IL-9, IL-10 e IL-21 (GOSWAMI e KAPLAN, 2011).

Entretanto, as células Th2 não são as únicas envolvidas no processo inflamatório da CU, estudos recentes demonstraram que uma nova população de células TCD4<sup>+</sup>, produtoras de interleucina 9 (IL-9), são identificadas pelo fator de transcrição PU.1 que permite a ligação da enzima RNA polimerase como o DNA, e contribuem para a desenvolvimento doença (GERLACH, *et al.*, 2014).

As células Th9 se desenvolvem após a diferenciação de células Th0, por meio do reconhecimento do antígeno apresentado via MHC de classe II, na presença das citocinas como a IL-4 e o TGF- $\beta$ . A sinalização destes mediadores através de transdutor de sinal e ativador de transcrição 6 (STAT6), e dos fatores de transcrição PU.1, IRF4, GATA3 e BATF são essenciais para o processo (KAPLAN, HUFFORD e OLSON, 2015; KAPLAN, 2017). Em estudo conduzido por Kim e

Chung (2013) que utilizou o modelo experimental de colite induzido por DSS demonstrou que as células Th9 foram capazes de iniciar e exacerbar a doença.

As células epiteliais intestinais envolvidas na DII demonstram expressão exacerbada de receptores para IL-9, e a interação da mesma com seu receptor pode inibir a proliferação e reparação celular na barreira intestinal, e ainda pode elevar significativamente as concentrações de TNF- $\alpha$  no tecido (SCHMITT, et al., 1994; HUFFORD e KAPLAN, 2014; UNGARO, et al., 2017).

Quanto a apresentação clínica que pode variar, a CU é classificada pela extensão das lesão no tecido colônico (figura 3) (SILVERBERG, et al., 2005). Alguns pacientes apresentam proctite, uma inflamação da mucosa retal que pode ser assintomática ou extremamente dolorosa, estes pacientes podem apresentar predominantemente urgência fecal e a sensação de evacuação incompleta, denominada tenesmo. Enquanto na pancolite (que representa a consequência da indução promovida nesta tese), onde o cólon inteiro já está comprometido, os sintomas mais proeminentes são diarreia sanguinolenta e dor abdominal (UNGARO, et al., 2017).

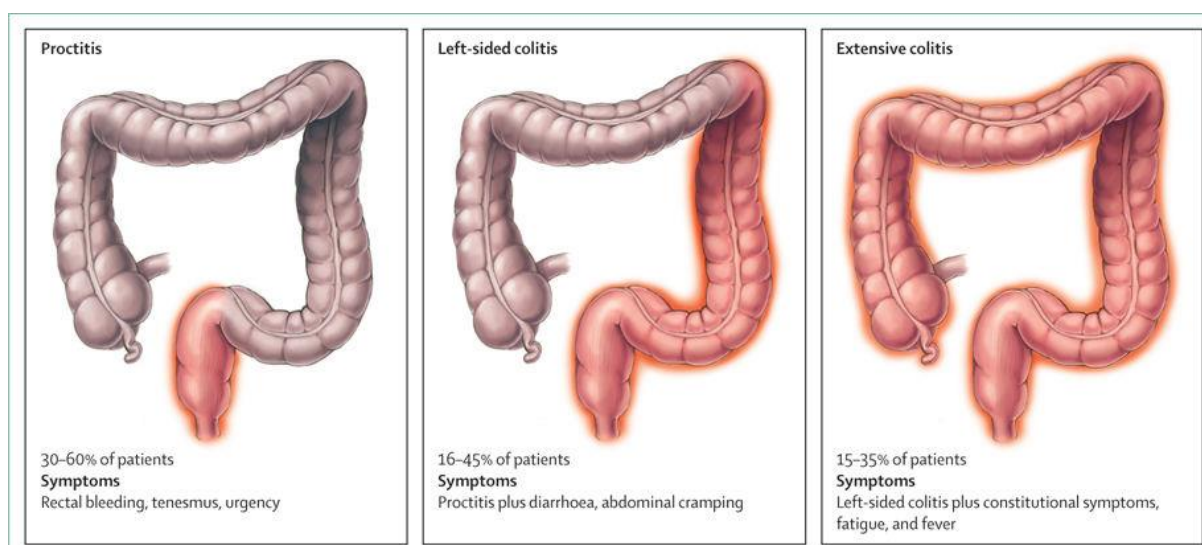


Figura 3: Fenótipos da colite ulcerativa pela classificação de Montreal (SILVERBERG, et al., 2005). Symptoms and treatment strategy can differ based on extent of disease. Ilustração por Jill Gregory.

Ao exame físico, os pacientes podem apresentar anemia, sensibilidade abdominal e sangue ao toque retal. A distensão abdominal e o timpanismo (som referido à ausculta de vísceras ocas) à percussão podem indicar

dilatação do cólon (ANANTHAKRISHNAN, MCGINLEY e BINION, 2008; NGUYEN, *et al.*, 2008).

Assim como os sintomas, é importante também conhecer a gravidade e a extensão da doença para delimitar o melhor tratamento ao paciente, visto isso, a doença pode ser classificada como leve, moderada ou grave. Para tal classificação podem ser utilizados diversos scores diferentes – clínicos, endoscópicos e histológicos, onde os clínicos e endoscópicos mais comuns são o score de Mayo, o escore de Lichtiger e o Índice de Atividade da Colite Clínica Simples (SCHROEDER, TREMAINE e ILSTRUP, 1987; LICHTIGER, *et al.*, 1994; WALMSLEY, *et al.*, 1998; DIGNASS, *et al.*, 2012; TRAVIS, *et al.*, 2012). Já em relação ao dano histológico, a doença é caracterizada por meio dos scores de índice de histopatologia de Robarts ou o índice de Nancy (MOSLI, *et al.*, 2017; MARCHAL-BRESSENOT, *et al.*, 2017).

Porém, os escores que abordam a gravidade e extensão da CU consideram a atividade da doença em determinado ponto de tempo, portanto, não promovem a comparação entre os estágios, não levam em consideração o efeito total da doença. Por esse motivo, outros estudos estão em processo de desenvolvimento para uma redefinição da gravidade da doença, considerando critérios como o efeito da doença quanto a qualidade de vida dos pacientes, a mensuração da carga inflamatória por meio de marcadores específicos que delimitem a atividade e extensão da doença, e por fim o curso da doença, seus prováveis danos estruturais e manifestações extraintestinais (SIEGEL, *et al.*, 2018).

Nos últimos anos, uma grande variedade de abordagens terapêuticas tem sido aplicada para o tratamento da CU, como os aminosalicilatos derivados do ácido 5-aminossalicílico (5-ASA), que são a principal escolha de tratamento para a doença no estágio leve ou moderada. Já esteroides tópicos e sistêmicos são utilizados para amenizar os efeitos de crises promovidos pela doença, ao passo que os imunossupressores e medicamentos biológicos são escolhas em casos considerados de moderado a grave.

A terapia objetiva a indução de um processo de remissão clínico (PEYRIN-BIROULET, *et al.*, 2015). Aminosalicilatos são a principal escolha de tratamento para colite ulcerativa leve a moderada, esteróides tópicos e sistêmicos podem ser usados para tratar crises de colite ulcerativa, enquanto imunossupressores e medicamentos biológicos são usados em doença moderada a

grave (UNGARO, *et al.*, 2017).

No entanto, efeitos benéficos limitados ou efeitos adversos ainda existiam nessas abordagens terapêuticas, terapias mais eficazes e não tóxicas são urgentemente necessárias. E a colectomia (retirada cirúrgica de parte do cólon) é necessária em até 15% dos casos (MAGRO, *et al.*, 2012).

Ainda assim, faz necessário uma evolução no conhecimento acerca da doença e das possibilidades terapêuticas.

### 2.6.1 Modelo de colite induzido por ácido acético

O modelo de indução por ácido acético integra uma categoria denominada colite química (MILLAR, *et al.*, 1996; HAGAR, *et al.*, 2007; MOUSAVIZADEH, *et al.*, 2009; AL-REJAIE, *et al.*, 2013). É um modelo bastante utilizado por ser simples, facilmente induzível (MACPHERSON e PFEIFFER, 1978; NOA, *et al.*, 2000; SASAKI, *et al.*, 2000) e de alta reprodutibilidade (GUAZELLI, *et al.*, 2021). Além disso, reproduz satisfatoriamente a CU humana quanto a patogênese, perfil de mediador inflamatório e características histopatológicas (ELSON, *et al.*, 1995; GONZALEZ, *et al.*, 1999; GORGULU, *et al.*, 2006; NAKHAI, *et al.*, 2007; BITIREN, *et al.*, 2010; HARTMANN, *et al.*, 2012; GUAZELLI, *et al.*, 2021).

A patogênese é bem reproduzida devida a via de administração intrarretal de solução de ácido acético diluída em salina tamponada 0,9% responsável por causar inflamação não transmural, caracterizada pelo aumento da infiltração de neutrófilos no tecido intestinal devida a dilatação vascular, edema e ulceração as camada submucosa e necrose das camadas mucosa e submucosa (CLOSA e FOLCH-PUY, 2004; JURJUS, KHOURY e REIMUND, 2004; NAKHAI, *et al.*, 2007; DANESHMAND, *et al.*, 2009; HARTMANN, *et al.*, 2012).

Este modelo de indução é considerado um fator de desequilíbrio entre substâncias oxidantes e antioxidantes (KESHAVARZIAN, *et al.*, 1992; DRÖGE, 2002; BITIREN, *et al.*, 2010), já que o infiltrado de neutrófilos promove a produção de ânion superóxido, bem como o início de uma cascata para a produção de várias espécies reativas. Conseqüentemente pode haver a produção de radicais hidroxila e peróxidos que contribuem para a progressão da necrose tecidual e disfunção da mucosa (GRISHAM e GRANGER, 1988; CLOSA e FOLCH-PUY, 2004;

HARTMANN, *et al.*, 2012).

## 2.7 Maresinas

Os mediadores lipídicos pró-resolução (SPMs) são divididos em quatro classes: lipoxinas, protectinas, resolvinas e maresinas, que são derivadas de ácidos graxos essenciais, o ácido araquidônico, ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA) (SERHAN, 2014), componentes importantes da membrana celular (DE CARVALHO e CARAMUJO, 2018) (figura 4). Os SPMs possuem a propriedade de reduzir o recrutamento de neutrófilos direcionado para o tecido inflamado e estimular a eferocitose, fagocitose não flogística, realizada por macrófagos sem prejuízo para a morte bacteriana (CHIANG, *et al.*, 2012; SERHAN, 2014).

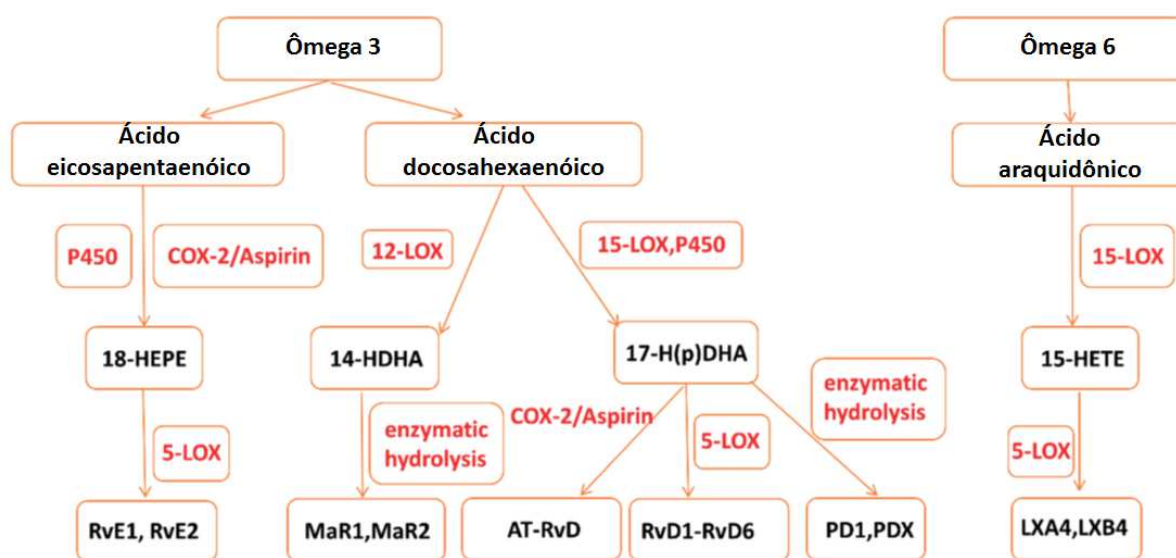


Figura 4: A biossíntese da produção dos mediadores lipídicos pró resolução. Abreviações: 5/12/15-LOX, 5/12/15-Lipoxygenase; COX-2, Cyclooxygenase-2; RvD, resolving D series; RvE, resolving E series; MaR, maresin; PD1, Protectin D1; PDX, Protectin DX; LXA4, Lipoxin A4; LXB4, Lipoxin B4 (adaptado de LI, *et al.*, 2020).

A maresina 1 (MaR1) é um mediador lipídico potente produzido de maneira endógena por macrófagos e neutrófilos, quando por exemplo, este polimorfonuclear humano interage com plaquetas a fim de elevar a produção endógena de MaR1 por meio da ação da 12-lipoxigenase (ABDULNOUR, 2014), sua produção acontece na fase de resolução do processo inflamatório (SERHAN, 2014),

é possível que a MaR1 atue em certa parte por meio do receptor de peptídeo formilado humano (ALXR/FPR220) (CEZAR, *et al.*, 2019).

Ao que diz respeito aos efeitos farmacológicos da MaR1, sabe-se por meio de um modelo inflamatório de alergia induzida por extrato de poeira, que este SPM possui a propriedade de diminuir a produção de IL-6 e interleucina 8 (IL-8), citocinas essas produzidas por células epiteliais brônquicas por meio de um mecanismo responsável por bloquear as atividades da proteína quinase  $C\epsilon$  (PKC $\epsilon$ ) e PKC $\alpha$  (NORDGREN, *et al.*, 2013).

O uso da MaR1 para tratamento também foi capaz de reduzir as DII induzida por ácido 2,4,6-trinitrobenzenossulfônico (TNBS) e sulfato de dextrano de sódio (DSS), por meio da redução de muitas citocinas pró-inflamatórias como a IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , e interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) dependendo do estágio da doença. Os efeitos anti-inflamatórios são derivados da inibição do NF- $\kappa$ B em conjunto a substituição do tipo de macrófago envolvido no processo de inflamação para um fenótipo M2 anti-inflamatório por meio de uma ativação alternativa (MARCON, *et al.*, 2013).

MaR1 é capaz de reduzir a inflamação pulmonar resultante da resposta imune inata induzida por lipopolissacarídeo (LPS), através da diminuição da produção de citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, proteína quimioatraente de monócitos (MCP-5), proteína inflamatória derivada de macrófagos (MIP-1 $\alpha$  e MIP-1 $\gamma$ ). Como consequência, ocorre a diminuição da expressão de moléculas de adesão, como por exemplo a molécula de adesão intercelular (ICAM-1) e P-selectina, diminuindo a atividade da mieloperoxidase de neutrófilos advindo por meio do recrutamento para o local de inflamação no pulmão (GONG, *et al.*, 2014).

Bem como anti-inflamatória e pró-resolutiva, a MaR1 pode atuar como analgésico através da inibição de atividades neuronais induzidas pelo potencial catiônico do receptor de potencial transitório vanilóide 1 (TRPV1), um efeito seletivo, sem atividade do canal iônico TRPA1, já que a MaR1 reduz o comportamento nociceptivo induzido por capsaicina, porém o mesmo não ocorre quando o indutor é o alil isotiocianato (AITC) (Serhan *et al.*, 2012).

Além disso, foi observado a inibição da dor neuropática induzida pela quimioterapia através da ação da MaR1 (SERHAN, *et al.*, 2012), e ainda viu-se que o efeito analgésico da MaR1 é de longa duração em um único tratamento podendo induzir a analgesia por até 5 dias (FATTORI, *et al.*, 2019).

No que se refere a MaR2, um SPM advindo de macrófagos a partir

da quebra DHA por meio da 12-lipoxigenase humana (DALLI, *et al.*, 2013; DENG, *et al.*, 2014), ainda não se tem muitos registros sobre seus efeitos, ao que se sabe, promove a redução do recrutamento de leucócitos no modelo de artrite induzida por zimosan, e também a fagocitose do indutor por macrófagos (DENG *et al.*, 2014).

Sobre seu potencial analgésico, a MaR2 segue a mesma linha da MaR1, foi demonstrado que a MaR2 reduzindo a ativação neuronal dependente de TRPV1 conforme demonstrado em dados recentes (FATTORI *et al.*, submetido ao Neuropharmacology NEUROPHARM-D-22-00210).

As propriedades proeminentes das moléculas de maresina 1 e 2 na inflamação demonstram a possibilidade do uso destes lipídeos como princípio ativo com características anti-inflamatórias/pró-resolutivas em medicamentos.

### 3. OBJETIVOS

#### a. OBJETIVO GERAL

Avaliar o papel analgésico e anti-inflamatório da maresina 1 (MaR-1) no modelo de artrite induzida pelo dióxido de titânio, e da maresina 2 (MaR-2) no modelo de colite induzida por ácido acético.

#### b. OBJETIVOS ESPECÍFICOS DO MODELO DE ARTRITE INDUZIDA POR DIÓXIDO DE TITÂNIO

Avaliar o efeito analgésico e anti-edematogênico da MaR-1 no modelo de artrite induzido por  $\text{TiO}_2$ .

Avaliar o efeito da MaR-1 sobre o infiltrado inflamatório recrutado na inflamação articular.

Avaliar o efeito da MaR-1 na hiperplasia sinovial promovida pelo  $\text{TiO}_2$ .

Avaliar o efeito da MaR-1 na degradação da cartilagem promovida pela deposição de  $\text{TiO}_2$ .

Avaliar o efeito analgésico da MaR-1 por meio do bloqueio de canais de cálcio (TRPV1).

#### c. OBJETIVOS ESPECÍFICOS DO MODELO DE COLITE INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO

Avaliar o potencial analgésico da MaR-2 no modelo de inflamação aguda causada pela colite induzida por ácido acético.

Avaliar o efeito da MaR-2 sobre o infiltrado inflamatório recrutado na inflamação intestinal.

Avaliar o efeito da MaR-2 no dano tecidual causado pela indução de ácido acético intrarectal.

Avaliar o efeito da MaR-2 na destruição de células caliciformes e diminuição da produção de muco causadas pelo ácido acético.

#### 4. MATERIAIS E MÉTODOS – MODELO TiO<sub>2</sub>

Na primeira parte dos experimentos, os animais (n = 6 por grupo de experimento) foram submetidos a uma curva de dose-resposta do tratamento com MaR1. Os animais foram estimulados com injeção intra-articular (i.a) com 3 mg de TiO<sub>2</sub> (suspenso em 10 µL de solução salina estéril 0,9%) por articulação femuro-tibial de acordo com padronização de Borghi e colaboradores, 2017. A hiperalgesia mecânica e edema foram avaliados 24 h após injeção de TiO<sub>2</sub> para avaliar a indução do modelo de artrite. Posteriormente, após 24 h, os animais foram tratados com MaR1 (1, 3, 10 ng/animal via i.p) e a hiperalgesia mecânica e o edema foi avaliado a partir de 1, 3, 5, 7 e 24 horas após o tratamento com MaR1 no primeiro dia (BORGHI e *et al.*, 2017). Depois disso, a hiperalgesia mecânica e o edema foram avaliados a cada 2 dias após o tratamento com MaR1 até o 30º dia. Imediatamente após as medidas no 30º dia, os animais foram anestesiados e eutanasiados, e lavou-se as cavidades articulares do joelho. Essas amostras foram colhidas para a avaliação da migração de leucócitos e para análises histológicas. A dose de MaR1 de 10 ng/animal foi escolhida com base nos resultados de recrutamento de leucócitos e hiperalgesia mecânica. As amostras de estômago e sangue foram coletadas para avaliar a atividade da mieloperoxidase do estômago (MPO) e o sangue foi coletado para a dosagem de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e ureia e creatinina. O influxo de cálcio foi realizado por meio da coleta de gânglios da raiz dorsal coletados no tempo de 48 horas pós indução.

#### USO DE ANIMAIS

Foram utilizados camundongos da raça Swiss machos pesando entre 20-25 g do biotério da Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil. Os animais foram alojados em gaiolas de plástico padrão com água e comida *ad libitum*, ciclo claro/escuro de 12/12h e temperatura controlada (21°C). Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Patologia da Universidade Estadual de Londrina (UEL) por pelo menos dois dias antes dos experimentos. Os métodos de manipulação e cuidado dos animais estavam de acordo com as diretrizes da Associação Internacional de Estudos sobre Dor (IASP) e foram aprovados pelo Comitê de Pesquisa e Ética da Universidade Estadual de Londrina (nº 11147.2016.40). Todos

os experimentos foram realizados duas vezes, o que foi essencial para demonstrar a reprodutibilidade e replicabilidade dos dados.

#### REAGENTES UTILIZADOS NOS TESTES

Os compostos utilizados neste estudo foram solução salina (NaCl 0,9%, Frenesius Kabi Brasil Ltda, Aquiraz, CE, Brasil), sal dissódico do ácido etilenodiaminotetracético (EDTA, Synth, Diadema, SP, Brasil), maresina 1 (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) em álcool absoluto (Dinâmica Química Contemporânea - São Paulo). O dióxido de titânio foi adquirido da Synth (Diadema, SP, Brasil) e o tamanho da partícula foi  $<1 \mu\text{m}$  com uma média de 862,2 nm, conforme determinado pela análise de distribuição de tamanho (Malvern Instruments Ltd, UK). Imediatamente antes das injeções, o  $\text{TiO}_2$  foi suspenso em solução salina estéril (10  $\mu\text{L}$ ) e a MaR1 foi diluída em solução salina estéril. A MaR1 (1, 3, 10 ng/animal) e a solução salina foram administradas por via intra-peritoneal (i.p) num volume de 100  $\mu\text{L}$  por animal.

#### SEÇÃO EXPERIMENTAL

**Avaliação da Hiperálgia Mecânica Articular:** A hiperálgia mecânica da região articular femorotibial foi avaliada como já descrito pela literatura (BORGHI et al., 2017). Resumidamente, em uma sala silenciosa, os animais foram colocados individualmente em gaiolas de acrílico (12 x 10 x 17 cm) com um piso de grade de arame, 15 a 30 minutos antes do teste de adaptação ambiental. A aplicação de força foi realizada apenas quando os animais estavam com as quatro patas na grade, não exibiam movimentos exploratórios ou defecação, e não estavam descansando sobre as patas. Um teste eletrônico de medição de pressão constituído por um transdutor de força de mão equipado com uma ponta de polipropileno (Anestesiômetro eletrônico von Frey; Insight, Ribeirão Preto, SP) foi utilizado para avaliar a nocicepção articular mecânica. Para este modelo, uma ponta grande (4,15  $\text{mm}^2$ ) foi adaptada à sonda. Uma força perpendicular crescente foi aplicada na área central da superfície plantar da pata traseira para induzir um movimento de flexão da

articulação femorotibial seguida de retirada da pata. Um espelho inclinado abaixo da grade forneceu uma visão clara da pata traseira. O aparelho eletrônico de medição de pressão registrou automaticamente a intensidade da força aplicada quando a pata foi retirada. O teste foi repetido até as medidas consistentes subsequentes (isto é, a variação entre essas medidas foi inferior a 1 g). O limiar mecânico induzido pela flexão foi expresso em gramas (g).

**Avaliação do edema articular:** O edema da articulação femorotibial foi avaliado através de medições dos diâmetros transversais utilizando um calibre (Digmatic Caliper, Mitutoyo Corporation, Kanagawa, Japão), de acordo com MAIOLI e colaboradores (2015). Os valores de espessura da articulação femorotibial foram expressos como a diferença entre os diâmetros medidos antes (valor basal) e após a injeção intra-articular  $TiO_2$  em milímetros (mm).

**Avaliação de Incapacitação estática (teste de distribuição do peso corpóreo):** O animal foi coacionado individualmente em um aparato de acrílico posicionado para frente com as patas dianteiras apoiadas a frente, e as patas traseiras apoiadas sobre um sensor de medida de peso (g). O teste se inicia no momento em que o animal está imóvel, a partir disso é realizada a medida de peso por 10 segundos. Ao concluir este período, tem-se a medida de peso da pata esquerda e direita, sendo a direita relativa ao estímulo. Este teste avalia a distribuição de peso entre as patas traseiras do camundongo. Enquanto o animal sem estímulo distribui o peso igualmente entre as duas patas, a razão da distribuição de peso entre a pata estimulada e a não estimulada é uma medida do nível de desconforto na pata estimulada. Por meio de medida contínua do peso suportado por cada pata, o Static Weight Bearing (BIO-SWB-TOUCH-M, Bioseb, França) permite a medida objetiva da dor espontânea por acessar o equilíbrio postural (FATTORI, *et al.*, 2020).

**Avaliação Hiperalgisia térmica articular avaliada pelo Haergreaves:** A hiperalgisia térmica da região articular femorotibial foi avaliada com o auxílio do analgesímetro Haergreaves (Insight, Ribeirão Preto, SP). Resumidamente, em uma sala silenciosa, os animais foram colocados individualmente em gaiolas de acrílico (12 x 10 x 17 cm) com um piso de vidro, 15 a 30 minutos antes do teste de adaptação ambiental. A aplicação de calor foi realizada apenas quando os animais

estavam com as quatro patas na base de vidro, não exibiam movimentos exploratórios ou defecação, e não estavam descansando sobre as patas. A pata padronizada para a medida foi a pata direita, devida a proximidade com a área de indução com o TiO<sub>2</sub>. Foi insidida a força térmica de infravermelho de 30 μ na região central da pata do animal, e analisado o tempo em que o animal continuava na mesma posição com a insicência de calor. A partir do momento em que o animal apresentava o primeiro movimento, o aparelho finalizava a medida em segundos. Só se deve fazer a inserção de calor por no máximo 20 segundos, sendo este o ponto de cut of (HARGREAVES, *et al.*, 1988).

**Avaliação da migração de leucócitos:** As contagens total e diferencial de leucócitos recrutados para o espaço intra-articular foram determinadas como descrito na literatura (ULRICH SD, *et al.*, 2008). Resumidamente, as cavidades da articulação do joelho foram lavadas com solução salina contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), que foi recuperada para avaliar a contagem de células total e diferencial. As contagens de células totais foram realizadas na câmara de Neubauer utilizando a solução Turk e as contagens de células diferenciais (100 células por campo) foram coradas com o kit panoptic (Laborclin, Pinhais, PR, Brasil) sob microscopia óptica (Olympus CX31RTSF, Tóquio, Japão). Os resultados foram expressos como leucócitos totais, células polimorfonucleares e mononucleares (células x 10<sup>3</sup>/joelho).

**Ensaio de Toxicidade no estômago (mieloperoxidase):** Realizado através da atividade de mieloperoxidase (MPO), usando um ensaio colorimétrico, considerando-se um marcador confiável da migração de neutrófilos para os tecidos. As amostras do estômago foram coletadas em tampão K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM (pH 6,0) contendo 0,5% de brometo de hexadecil trimetilamônio (HTAB) e mantidos a -86°C até o uso. As amostras congeladas foram homogeneizadas usando um tecido turrax (Tissue-Tearor 985370, BioSpec Products, Bartlesville, OK, EUA), centrifugado (2 min, 16,000g, 4°C) e o sobrenadante resultante foianalisado usando um espectrofotômetro (Multiskan GO Microplate Spectrophotometer, ThermoScientific, Vantaa, Finlândia) para determinação da atividade MPO a 450 nm. A atividade MPO das amostras foi comparada a uma curva padrão de neutrófilos. Em resumo, 15 μL de amostra foram misturados com 200 μL de tampão de fosfato 50 mM (pH 6,0),

contendo 0,167 mg / mL de dicloridrato de O-dianisidina e 0,0005% de peróxido de hidrogênio. Os resultados foram apresentados como atividade MPO (número de neutrófilos X 10<sup>6</sup>/mg de tecido).

**Ensaio de Toxicidade hepática e renal:** O sangue foi colhido em microtubos contendo 50 µL de EDTA anticoagulante (5.000 UI / mL) e centrifugados (200 g, 10 min, 4°C) e o plasma foi separado. Para determinar as atividades enzimáticas de AST e ALT como indicadores de hepatotoxicidade e níveis de ureia e creatinina como indicadores de nefrotoxicidade, as amostras de plasma foram processadas de acordo com as instruções do fabricante (Labtest Diagnóstico S. A., Brasil). Os resultados foram apresentados como U/mL (AST e ALT) ou mg/dL (ureia e creatinina) do plasma.

**Processamento Histológico:** As amostras da articulação femorotibial foram coletadas, fixadas em formalina tamponada e submetidas ao processamento histológico, para a desidratação com banhos graduados de álcool (Dinâmica Química Contemporânea - São Paulo), diafinização com banhos de xilol (Synth – Diadema - SP), impregnação em parafina (Synth – Diadema - SP). Foram realizadas secções de 7 micrômetros no micrótomo. As lâminas com os cortes foram submetidas as técnicas de coloração de hematoxilina (Laborclin – Pinhais - PR) e eosina (Laborclin - Pinhais-PR), e tricômio de Mallory – composto por um trio de corantes, sendo eles a hematoxilina (Laborclin – Pinhais - PR), vermelho de Mallory (Laborclin – Pinhais - PR), e verde Luz (Laborclin – Pinhais - PR), sendo este antecedido por um banho de ácido fosfomolibdítico (Sigma-Aldrich – Jurubatuba - SP). Através da coloração de Hematoxilina e Eosina (HE), foi possível observar o tecido, e realizar a análise por meio de um score clínico, onde foram avaliados a hiperplasia sinovial, neovascularização e o infiltrado inflamatório, sendo estes pontuados de 0 a 3, demonstrando um grau de degradação tecidual conforme o nível crescente, sendo 0 para nenhuma alteração e 3 para a alteração mais graves, podendo ser nesse caso um aumento significativo do tecido hiperplásico, de novos vasos e de infiltrado inflamatório que prejudicam o tecido. Através da coloração Tricômio de Mallory, foi possível observar a degradação da cartilagem na articulação femorotibial, já que, o tecido cartilaginoso é proveniente de células mesenquimais denominadas de condrócitos, sendo essas células facilmente coradas pelo tricômio

de Mallory. A análise foi realizada com o auxílio do programa Image J, que permitiu medir a porcentagem da degradação de cartilagem por área da tíbia e fíbula separadamente.

**Detecção do influxo de Cálcio:** Neurônios do gânglio da raiz dorsal (GRD) foram coletados segundo já descrito na literatura (CHIU *et al.*, 2013). Foram dissecados com meio Neurobasal-A (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific), dissociados em colagenase A ( $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) / dispase II ( $2.4 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$ ; RocheApplied Sciences, Indianapolis, IN, USA) em tampão saline HEPES (MilliporeSigma) por 70 minutos a  $37^\circ\text{C}$ . Após a trituração do gânglios usando pipetas Pasteur de tamanhos decrescentes, os neurônios provenientes foram centrifugados sobre um gradiente de 10% de BSA e plaqueados em placas de cultura celular revestidas com laminina. Os neurônios foram então carregados com  $1,2 \mu\text{M}$  de Fluo-4AM em meio Neurobasal-A, incubados por 30 minutos a  $37^\circ\text{C}$ , lavados com meio HBSS e fotografados em um microscópio confocal (TCS SP8, Leica Microsystems). Para avaliar a ativação do TRPV1, as placas com neurônios foram gravadas por 6 minutos, que foi dividida em 2 minutos de leitura inicial (0-s mark, baseline values), seguida pela estimulação com capsaicina por 2 minutos na marca de 102 segundos ( $1 \mu\text{M}$ , TRPV1 agonist) (Lee e Goodman SB, 2008) e KCl por 2 minutos na marca de 240 segundos ( $40 \text{ mM}$ , activates all neurons). O influx de Cálcio foi analisado pela mensuração da média da fluorescência por meio do Software LAS X (Leica Microsystems).

## 5. Materiais e Métodos – Modelo de Colite Ulcerativa

Na segunda parte dos experimentos, os animais (n = 6 por grupo de experimento, em alguns casos podendo totalizar 12 animais) foram submetidos a uma curva de dose-resposta do tratamento com MaR2. Os animais foram estimulados com o ácido acético na concentração de 6% (suspensão em solução salina estéril 0.9%), e tratados com MaR2 nas concentrações de 300 picogramas e 3 nanogramas (via i.p) antes da indução, e 12 horas após. A hiperalgesia mecânica foi avaliada 17 h após a indução. 18 horas após a indução, os animais foram eutanasiados, e amostras de 1 cm do cólon foram coletados para as análises histológicas, para imunofluorescência e para o ensaio de atividade da mieloperoxidase.

### USO DE ANIMAIS

Foram utilizados camundongos da raça Swiss machos pesando entre 20-25 g do biotério da Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil. Os animais foram alojados em gaiolas de plástico padrão com água e comida *ad libitum*, ciclo claro/escuro de 12/12h e temperatura controlada (21°C). Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Patologia da Universidade Estadual de Londrina por pelo menos dois dias antes dos experimentos. Os métodos de manipulação e cuidado dos animais estavam de acordo com as diretrizes da Associação Internacional de Estudos sobre Dor (IASP) e foram aprovados pelo Comitê de Pesquisa e Ética da Universidade Estadual de Londrina (n° 11148.2016.83). Todos os experimentos foram realizados duas vezes, o que foi essencial para demonstrar a reprodutibilidade e replicabilidade dos dados.

### REAGENTES UTILIZADOS NOS TESTES

Os compostos utilizados neste estudo foram solução salina (NaCl 0,9%, Frenesius Kabi Brasil Ltda, Aquiraz, CE, Brasil), ácido acético P.A. (EDTA, Synth, Diadema, SP, Brasil), maresina 2 (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) em álcool absoluto (EDTA, Synth, Diadema, SP, Brasil). O ácido acético foi diluído em solução

salina objetivando a concentração de 6%. Antes da indução, os animais foram acondicionados em gaiolas metabólicas por 12 horas tendo por finalidade do jejum, onde apenas foi ofertada a água. Essa medida foi tomada para a região da indução permanecesse vazia. Após o tempo de jejum, os animais são anestesiados para a limpeza do cólon com solução salina e divisão dos grupo experimentais, sendo o grupo salina, o grupo colite e o grupo tratado, e este recebeu o pré tratamento meia hora após a lavagem do cólon. A maresina 2 (300 picogramas e 3 nanogrmas) via intra-peritoneal (i.p) num volume de 100  $\mu$ L por animal. A indução da colite foi realizada através da via intrarectal meia hora após o pré tratamento, 12 horas após a indução, uma nova dose do tratamento foi administrado, e a coleta foi realizada 18 horas após o estímulo (adaptado de GUAZELLI, *et al.*, 2013; COLOMBO, *et al.*, 2018).

## SEÇÃO EXPERIMENTAL

**Avaliação da Hiperalgisia Mecânica Peritoneal:** A hiperalgisia mecânica da região peritoneal foi avaliada por meio de um teste eletrônico de medição de pressão constituído por um transdutor de força de mão equipado com uma ponta de polipropileno (Anestesiômetro eletrônico von Frey; Insight, Ribeirão Preto, SP). Em uma sala silenciosa, os animais foram colocados individualmente em gaiolas de acrílico (12 x 10 x 17 cm) com um piso de grade de arame, 15 a 30 minutos antes do teste de adaptação ambiental. A aplicação de força foi realizada apenas quando os animais estavam com as quatro patas na grade, não exibiam movimentos exploratórios ou defecação, e não estavam descansando sobre as patas. Uma força perpendicular crescente foi aplicada na área central do peritônio para induzir um movimento de flexão/contorção. Um espelho inclinado abaixo da grade forneceu uma visão clara das quatro patas. O aparelho eletrônico de medição de pressão registrou automaticamente a intensidade da força aplicada quando o animal arqueou. O teste foi repetido até as medidas consistentes subsequentes (isto é, a variação entre essas medidas foi inferior a 1 g). O limiar mecânico induzido pela flexão foi expresso em gramas (g).

**Ensaio de Toxicidade no intestino (mieloperoxidase):** Realizado através da atividade

de mieloperoxidase (MPO), usando um ensaio colorimétrico, considerando-se um marcador confiável da migração de neutrófilos para os tecidos. As amostras do intestino foram coletadas em tampão  $K_2HPO_4$  50 mM (pH 6,0) contendo 0,5% de brometo de hexadecil trimetilamônio (HTAB) e mantidos a  $-80^\circ C$  até o uso. As amostras congeladas foram homogeneizadas usando um turrax massador de tecido (Tissue-Tearor 985370, BioSpec Products, Bartlesville, OK, EUA), centrifugado (2 min, 16,000g,  $4^\circ C$ ) e o sobrenadante resultante foi analisado usando um espectrofotômetro (Multiskan GO Microplate Spectrophotometer, ThermoScientific, Vantaa, Finlândia) para determinação da atividade MPO a 450 nm. A atividade MPO das amostras foi comparada a uma curva padrão de neutrófilos. Em resumo, 15  $\mu L$  de amostra foram misturados com 400  $\mu L$  de tampão de fosfato 50 mM (pH 6,0), contendo 0,167 mg / mL de dicloridrato de O-dianisidina e 0,0005% de peróxido de hidrogênio. Os resultados foram apresentados como atividade MPO (número de neutrófilos  $\times 10^6$ /mg de tecido).

**Processamento Histológico:** As amostras de cólon foram coletadas, fixadas em PFA 4% e submetidas ao processamento histológico, para a desidratação com banhos graduados de álcool (Dinâmica Química Contemporânea - São Paulo), diafinização com banhos de xilol (Synth – Diadema - SP), e impregnação em parafina (Synth – Diadema - SP). Foram realizadas secções de 7 micrômetros através do micrótomo. As lâminas com os cortes foram submetidas as técnicas de coloração de hematoxilina (Laborclin – Pinhais - PR) e eosina (Laborclin - Pinhais-PR), azul de toluidina (Laborclin – Pinhais - PR), reativo de Schiff (PAS) (Sigma-Aldrich – Jurubatuba - SP) e azul de alcian (AB) (Sigma-Aldrich – Jurubatuba - SP). Através da coloração de Hematoxilina e Eosina (HE), foi possível observar o tecido, e realizar a análise por meio de um score clínico, onde foram avaliados a atrofia da cripta, destruição de células caliciformes, separação das camadas musculares e mucosa, e o infiltrado inflamatório, sendo estes pontuados de 0 a 3, demonstrando um grau de degradação tecidual conforme o nível crescente, sendo 0 para nenhuma alteração e 3 para a alteração grave, podendo ser nesse caso um grau significativo de atrofia da cripta, diminuição no número de células caliciformes, e até um aumento do infiltrado inflamatório que prejudicam o tecido. Através da coloração de Azul de Toluidina, foi possível observar a migração de mastócitos para o tecido inflamado, e por meio da coloração de Reativo de Schiff com contra coloração de Azul de Alcian

foi possível mensurar a quantidade de células PAS+ e AB positivas, caracterizando as células caliciformes quanto a produção de mucina ácida e mucina básica. Esta análise foi realizada com o auxílio do programa Image J, que permitiu realizar a contagem das células positivas.

**Imunofluorescência:** As amostras de cólon foram coletadas, fixadas em PFA 4% e submetidas ao processamento para o congelamento. Foram realizadas secções de 7 micrômetros através do micrótomo. As lâminas com os cortes foram submetidas a técnica de imunofluorescência, para a visualização de macrófagos presentes no tecido foi realizada a imunomarcagem com o anticorpo F4/80 (eBioscience), e através da imunomarcagem com o anticorpo iNOS (eBioscience) foi possível observar as células iNOS positivas. A análise de colocalização necessária para visualizar macrófagos iNOS positivos foi realizada através do software do microscópio confocal Leica X.

## 6. ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

O presente trabalho foi realizado no laboratório de Dor, Inflamação, Neuropatia e Câncer, da Universidade Estadual de Londrina e segue as normas da revista *Inflammation Research* ([https://www.springer.com/journal/11/submissionguidelines#Instructions%20fo%20Au%20thors\\_Types%20of%20papers](https://www.springer.com/journal/11/submissionguidelines#Instructions%20fo%20Au%20thors_Types%20of%20papers)). Os resultados parciais estão descritos no artigo intitulado “Maresin 1 reduces pain, inflammation and articular pathology in titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>)-induced arthritis”.

## Maresin 1 reduces pain, inflammation and articular pathology in titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>)-induced arthritis

Anelise Franciosi<sup>1</sup>, Nayara A. Antero<sup>1</sup>, Telma S. dos Santos<sup>1</sup>, Marília F. Manchope<sup>1</sup>, Tiago H. Zaninelli<sup>1</sup>, Mariana M. Bertozzi<sup>1</sup>, Ana C. Rossaneis<sup>1</sup>, Rúbia Casagrande<sup>2</sup> and Waldiceu A. Verri Jr<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Ciências Patológicas, Universidade Estadual de Londrina-UEL, Rod. Celso Garcia Cid, km 380, PR 445, 86057-970, Cx. Postal 10.011, Londrina, Paraná, Brazil.

<sup>2</sup>Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Londrina-UEL, Avenida Robert Koch, 60, Hospital Universitário, 86038-350, Londrina, Paraná, Brazil.

\*Corresponding Author

Waldiceu A. Verri Jr

Departamento de Ciências Patológicas, Universidade Estadual de Londrina-UEL, Rod. Celso Garcia Cid, km 380, PR 445, 86057-970, Cx. Postal 10.011, Londrina, Paraná, Brazil. Fax: +55 43 33714387, Tel:+55 43 33714979,

E-mail address: waldiceujr@yahoo.com.br; waverri@uel.br.

### Abstract

**Objective:** To evaluate the effect of maresin 1 (MaR1) on titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>)-induced chronic arthritis in mice, to mimic the cases of aseptic inflammation induced by prostheses and/or implants.

**Materials and Methods:** MaR1, used for the treatment, belongs to a group of pro-resolving lipids that presents powerful analgesic effect. Mice were treated every 3 days with MaR1 (10 ng/animal, i.p.) for 30 days straight, starting 24 h after intra-articular injection of TiO<sub>2</sub> (3 mg/animal). We assessed mechanical and thermal hyperalgesia, edema and static weight distribution over the course of 30 days. Joint wash was collected for evaluation of leukocytes migration and the femorotibial joint for histological analysis. Myeloperoxidase (MPO) activity, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), urea and creatinine were used as toxicity assays. For the calcium imaging, dorsal root ganglion (DRG) neurons were collected 2 days after TiO<sub>2</sub> injection.

**Results:** MaR1 inhibited mechanical hyperalgesia, edema, leukocyte recruitment and degradation of cartilage joint tissue, as well as decreased activation of TiO<sub>2</sub>-induced DRG neurons, without toxicity.

**Conclusion:** MaR1 improves TiO<sub>2</sub>-induced chronic arthritis, observed by analgesic response with inhibition of cell migration, maintenance of cartilage tissue and decreased activation of DRG neurons.

**Keywords:** Maresin · Arthritis · Implant · Arthroplasty · Pain ·

## 1. Introduction

Morphological changes in the joint region are characterized by the destruction of joint support surfaces, and may be triggered by many causes, such as autoimmune diseases, inflammatory or infectious conditions, traumatic conditions presenting bone destruction and joint involvement and large-scale body movements [1, 2]. These conditions and alterations lead to the clinical picture of various diseases, including osteoarthritis, inflammatory and rheumatoid arthritis, osteonecrosis, post traumatic arthritis and, even tumors [3], that could cause partial or total replacement of the surfaces of tissues destroyed by prostheses, a procedure called arthroplasty [2, 4].

As much as arthroplasty succeeds in relieving pain from arthritis, restoring the mobility, it may also cause local and systemic effects, due to the biomaterials that make up the prosthesis and release metal ions in contact with the physiological environment [2, 3, 5], increasing infections and inflammation in periprosthetic tissues [2, 3].

Biomaterials are usually composed by polymethylmethacrylate, polyethylene, cobalt-chromium alloys and titanium [2, 6]. Repetitive contact and friction stresses is responsible for particles releasing from the prosthesis constituents, which induce immune responses by activating cells, such as macrophages, present in periprosthetic tissue that initiates phagocytosis of wear remnants [7]. Activated macrophages produce chemical mediators and pro-inflammatory cytokines, including tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and interleukin 6 (IL-6), as well as reactive oxygen species leading to the activation of nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B), perpetuating the aseptic inflammatory response [2, 6, 8].

Titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>), despite being used for the production of orthopedic prostheses, it is used in paints, food coloring and sunscreens, because of its white color and odorless [9]. TiO<sub>2</sub> is genotoxic and is able to penetrate the skin, inducing oxidative damage to DNA [10]. If the TiO<sub>2</sub> is deposited in tissues like the lungs, skin and synovia, it becomes a black pigment, accompanied by fibrosis, necrosis and granulomatous reactions [11], with the risk of remain trapped on these tissues, promoting several degrees of damages [12, 13]. In addition, TiO<sub>2</sub> induces joint pain, knee edema, oxidative stress and the production of pro-inflammatory cytokines, such as interleukin 33 (IL-33), IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  [14]. Regarding to the clinical

relevance of TiO<sub>2</sub>-induced arthritis, a study conducted by Dörner et al. (2006), described a case of arthritis development-related to titanium-vanadium alloy prosthesis in a patient with no family history.

Due to intense pain and inflammation, medications are to improve patients quality of life; however, prolonged steroid use leads to deep deleterious effects on the hypothalamus-pituitary-adrenal axis function and bone, causing osteoporosis, fractures and femoral head necrosis, being a possible cause for arthroplasty as well [16]. Inflammatory pain induces mechanical and thermal hypersensitivity, which occurs in the absence of harmful stimuli. Therefore, it represents an important type of pain that is considered pathological if the pharmacological treatment is not carried out properly [17]. Pain exacerbation occurs due to sensitization of specialized sensory neurons and nociceptors, leading to a state called hyperalgesia [18].

Concerning to potential treatments for prosthesis pain and inflammation, the currently medications present side effects and are not effective to disrupt the disease process, suggesting that still exist a gap in the development of novel therapeutic approaches. An alternative for the use of analgesic and anti-inflammatory medications is the enhancement of inflammation resolution, known as an active process [19, 20, 21] regulated by omega-3 and omega-6 fatty acids, which are substrates for the production of specialized pro-resolution lipid mediators (SPMs) [20]. SPMs include lipoxins, protectins, resolvins and maresins. In this study we highlight maresin 1 (MaR1), found in human synovial fluids from patients with arthritis. Besides, the levels of MaR1 were negatively correlated with the disease activity [22].

MaR1 is a SPM derived from docosahexaenoic acid (DHA) produced by macrophages with anti-inflammatory activity mainly related to inhibition of neutrophil recruitment and stimulation of the removal of dead cells by macrophages [23, 20, 24, 21]. SPMs have the property of reducing the recruitment of neutrophils towards the inflamed tissue and stimulating efferocytosis, non-phlogistic phagocytosis, carried out by macrophages without prejudice to bacterial death [48, 49]. Therefore, the aim of this study is to evaluate the analgesic potential of MaR1 in TiO<sub>2</sub>-induced arthritis.

## **2. Materials and methods**

### **2.1 Animals**

Male Swiss mice weighing between 20-25 g from the animal facility of the State University of Londrina, Paraná, Brazil, were used. The animals were housed in standard plastic cages with free access to food and water, light/dark cycle (12/12h) and controlled temperature (21°C). They were kept in the animal facility at the Pathology Department of the State University of Londrina for at least two days before the experiments. The methods of manipulation and animal care were in accordance with the guidelines of the International Association of Studies on Pain (IASP) and were approved by the Research and Ethics Committee from State University of Londrina (CEUA nº 11147.2016.40).

## **2.2 Drugs**

The compounds used in this study were saline solution (NaCl 0.9%, Frenesius Kabi Brasil Ltda, Aquiraz, CE, Brazil), acetaminophen (EMS, Hortolandia, SP, Brazil), potassium diclofenac (EMS, Hortolandia, SP, Brazil), indomethacin (Aspen Pharma, Serra, ES, Brazil), and MaR1 (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA). TiO<sub>2</sub> was acquired from Synth (Diadema, SP, Brazil) and the particle size was <1 µm with an average of 862.2 nm, as determined by size distribution analysis (Malvern Instruments Ltd, UK). Immediately before injections, TiO<sub>2</sub> was suspended in sterile saline solution (10 µL) and MAR1 resuspended in absolute alcohol was mixed with 100 µL of sterile saline solution (0.09%). MaR1 (1, 3, 10 ng/animal) and saline were administered intraperitoneally (i.p. in a volume of 100 µL per animal).

## **2.3 Experimental procedures**

Mice were stimulated with 3 mg/animal of TiO<sub>2</sub> with intra-articular (i.a.) injection by femorotibial joint according to Borghi et al. [14], as well as a saline group was used as negative control. Mechanical hyperalgesia was assessed 24 h after TiO<sub>2</sub> injection and, at this time point, mice were treated intraperitoneally (i.p.) with MaR1 (1, 3 and 10 ng/animal) or vehicle (saline solution 0.9%) for dose response determination. Then, mechanical hyperalgesia was assessed at 1, 3, 5, 7 and 24 h after the treatment with MaR1 at the first day [15] and, posteriorly, every 2 days for 30 days straight. During this period, mice were treated with MaR1 every 3 days. Based on the results from mechanical hyperalgesia, the dose of 10 ng/animal of MaR1 was chosen for the selected experiments. Thermal hyperalgesia, edema and static weight distribution were evaluated over the course of 30 days with TiO<sub>2</sub> (3 mg/animal, i.a.)

stimulus and following the protocol for MaR1 treatment established from the dose response (10 ng/animal, i.p., every 3 days). At the 30<sup>th</sup> day, animals were anesthetized and euthanized (inhaled isoflurane) for collection of joint wash from the joint cavity to evaluate leukocytes migration and the femorotibial joint was collected for histological analysis. Myeloperoxidase (MPO) activity was measured using stomach samples. In addition, blood samples were collected for the aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), urea and creatinine assays. For the calcium imaging, dorsal root ganglion (DRG) neurons were collected 2 days after TiO<sub>2</sub> injection and, for this experiment, mice were treated only 24 h after stimulation with MaR1.

**2.4 Evaluation of Mechanical Hyperalgesia:** Joint mechanical hyperalgesia was assessed in the femorotibial joint as previously described at the literature [25]. Briefly, the animals were placed individually in acrylic cages (12 x 10 x 17 cm) with a stainless steel grid floor, 15 to 30 minutes before the test for environmental adaptation. The application of force was performed as soon as the animals were with four legs on the grid, without exhibiting exploratory movements or defecation, and no resting over their paws. An electronic pressure measurement test which consist in a hand force transducer, equipped with a polypropylene tip (von Frey electronic anesthesiometer; Insight, Ribeirão Preto, SP), was used to assess mechanical joint nociception. For this model, a large tip (4.15 mm<sup>2</sup>) was adapted to the probe. An increasing perpendicular force was applied to the central area of plantar surface at hind paw to induce a flexion movement from the femorotibial joint, followed by paw flinch. A mirror tilted below the grille was used to provide a clear view of the hind paw. The electronic pressure measuring device automatically recorded the intensity of the force applied when the paw was removed. The test was repeated until subsequent consistent measurements (i.e., the variation between these measurements was less than 1 g). The mechanical threshold induced by flexion was expressed in grams (g).

**2.5 Articular thermal hyperalgesia evaluation:** Thermal hyperalgesia of the femorotibial articular region was evaluated with the aid of the Haergraves algesimeter (Insight, Ribeirão Preto, SP). Briefly, in a quiet room, the animals were placed individually in acrylic cages (12 x 10 x 17 cm) with a glass floor, 15 to 30

minutes before the test for environmental adaptation. The heat application was performed when the animals had four legs at the base of glass, without exhibiting exploratory movements or defecation, and no resting over their paws. The standardized paw for the measurement was the right paw, due to the proximity to the induction area with TiO<sub>2</sub>. An infrared thermal force of 30  $\mu$  was applied in the central region of the paw and was analysed the time (seconds) which the animal stays in the same position without any movement during heat incidence. The cut point for heat incidence is 20 seconds to avoid injuries [26].

**2.6 Static Weight Bearing:** The animal was individually conditioned in an acrylic device positioned forward, with the front paws supported to the front and the hind paws supported on a weight measurement sensor (g). The test starts with the animal immobile and the measurement of right and left hind paws were performed for 10 seconds. This test is used to assess the weight distribution between the hind paws by continuous measurement of the weight supported by each one. The Static Weight Bearing (Bioseb) allows the objective measurement of spontaneous pain by accessing postural balance. The ratio of weight distribution between the stimulated and unstimulated paw is measured by the discomfort level in the stimulated paw.

**2.7 Calcium imaging:** DRG neurons were performed as previously described [27]. DRGs were dissected into Neurobasal-A medium (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific), dissociated in collagenase A (1 mg·ml<sup>-1</sup>)/dispase II (2.4 U·ml<sup>-1</sup>; RocheApplied Sciences, Indianapolis, IN, USA) in HEPES-buffered saline (MilliporeSigma) for 70 min at 37°C. After trituration with glass Pasteur pipettes of decreasing size, DRG cells were centrifuged over a 10% BSA gradient, plated on laminin-coated cell culture dishes. DRGs were then loaded with 1.2  $\mu$ M of Fluo-4AM in Neurobasal-A medium, incubated for 30 min 37°C, washed with HBSS, and imaged in a Confocal Microscope (TCS SP8, Leica Microsystems). To assess TRPV1 activation, DRG plates were recorded for 6 min, which was divided in 2 min of initial reading (0-s mark, baseline values), following by stimulation with capsaicin for 2 min at the 120-s mark (1  $\mu$ M, TRPV1 agonist) [28] and KCl for 2 min at the 240-s mark (40 mM, activates all neurons). Calcium flux was analyzed from the mean fluorescence measured with the LAS X Software (Leica Microsystems).

**2.8 Evaluation of joint edema:** Articular edema of the femorotibial joint was assessed by measurements of the transverse diameters using a gauge (Digimatic Caliper, Mitutoyo Corporation, Kanagawa, Japan). The thickness values of the femorotibial joint were expressed as the difference between the diameters measured before (baseline value) and after intra-articular TiO<sub>2</sub> injection in millimeters (mm).

**2.9 Evaluation of leukocyte migration:** The total and differential counts of leukocytes recruited into the intra-articular space were determined as described at the literature [28]. The femorotibial joint cavities were washed with saline solution containing ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), which was recovered to total and differential cell count. Total cell count was performed in the Neubauer chamber using Turk solution and the differential cell count (100 cells per field) was carried out with slides previously dyed with panoptic kit (Laborclin, Pinhais, PR, Brazil), under an optical microscopy (Olympus CX31RTSF, Tokyo, Japan). The results were expressed as total leukocytes, polymorphonuclear and mononuclear cells (x 10<sup>3</sup> cells/femorotibial joint).

**2.10 Histological processing:** Femorotibial joint samples were collected, fixed in buffered formalin and submitted to histological processing, with dehydration using graduated alcohol baths (Contemporary Chemical Dynamics - São Paulo), diaphrel with xylol baths (Synth - Diadema - SP), paraffin impregnation (Synth - Diadema - SP). Sections of 7 micrometers were performed in the microtome. The slides with the cuts were submitted to staining techniques of hematoxylin and eosin (Laborclin - Pinhais-PR), and mallory staining, composed for three dyes, which are hematoxylin, Mallory red and Luz green (Laborclin - Pinhais - PR). The staining techniques were anticipated by a bath of phosphomobilytic acid (Sigma-Aldrich - Jurubatuba - SP). Through hematoxylin and Eosin (HE) staining, it was possible to observe the tissue and perform the analysis by clinical score, where synovial hyperplasia, neovascularization and inflammatory infiltrate were evaluated and scored from 0 to 3, demonstrating a degree of tissue degradation according to the increasing level. For the clinical score, 0 is used for no alteration and 3 for the most severe alteration and, in this case, there may be a significant increase in hyperplastic tissue, new vessels formation and inflammatory infiltrate responsible for tissue harm. Through Mallory's staining, it was possible to observe the degradation of cartilage in

the femorotibial joint, since the cartilage tissue comes from mesenchymal cells called chondrocytes and these cells are easily stained by Mallory's trichrome. The analysis was performed by Image J program, which allowed measuring the percentage of cartilage degradation by area separately.

**2.11 Gastric toxicity by MPO activity assay:** MPO activity, considered a reliable marker of neutrophil migration to tissues, was analyzed by a colorimetric assay. Stomach samples were collected in  $\text{H}_2\text{PO}_4$  50 mM buffer (pH 6.0) containing 0.5% trimethylammonium hexadecyl bromide (HTAB) and kept at  $-80^\circ\text{C}$  until use. The frozen samples were homogenized using a turrax (Tissue-Tearor 985370, BioSpec Products, Bartlesville, OK, USA) and centrifuged (2 min, 16,000g,  $4^\circ\text{C}$ ) to obtain the supernatant. The analysis was performed in a spectrophotometer (Multiskan GO Microplate Spectrophotometer, ThermoScientific, Vantaa, Finland) with wavelength at 450 nm. The MPO activity from the samples was compared to a neutrophil standard curve. In summary, samples were mixed with phosphate buffer 50 mM (pH 6.0), containing 0.167 mg / mL of O-dianiside dihydrochloride and 0.0005% of hydrogen peroxide. The results were presented as MPO activity (number of neutrophils  $\times 10^6$ /mg of tissue). Indomethacin (2.5 mg/kg, i.p., diluted in tris/HCl buffer, for 7 days) was used as positive control for gastric toxicity [54].

**2.12 Liver and renal toxicity assay:** Blood was collected in microtubes containing the anticoagulant EDTA (5,000 IU/mL) and centrifuged (200 g, 10 min,  $4^\circ\text{C}$ ) for plasma separation. AST and ALT enzymatic activities were used as hepatotoxicity markers, while urea and creatinine levels as nephrotoxicity markers. To perform these assays, plasma samples were processed according to the manufacturer's instructions (Labtest Diagnóstico S. A., Brazil). The results were presented as U/mL for AST and ALT and mg/dL for urea and creatinine in the plasma. Acetaminophen (3 g/kg, orally, suspended in saline, 200 mg/mL, once) and diclofenac (200 mg/kg, orally, diluted corn oil, once) were used as positive control for liver and renal toxicity, respectively [54].

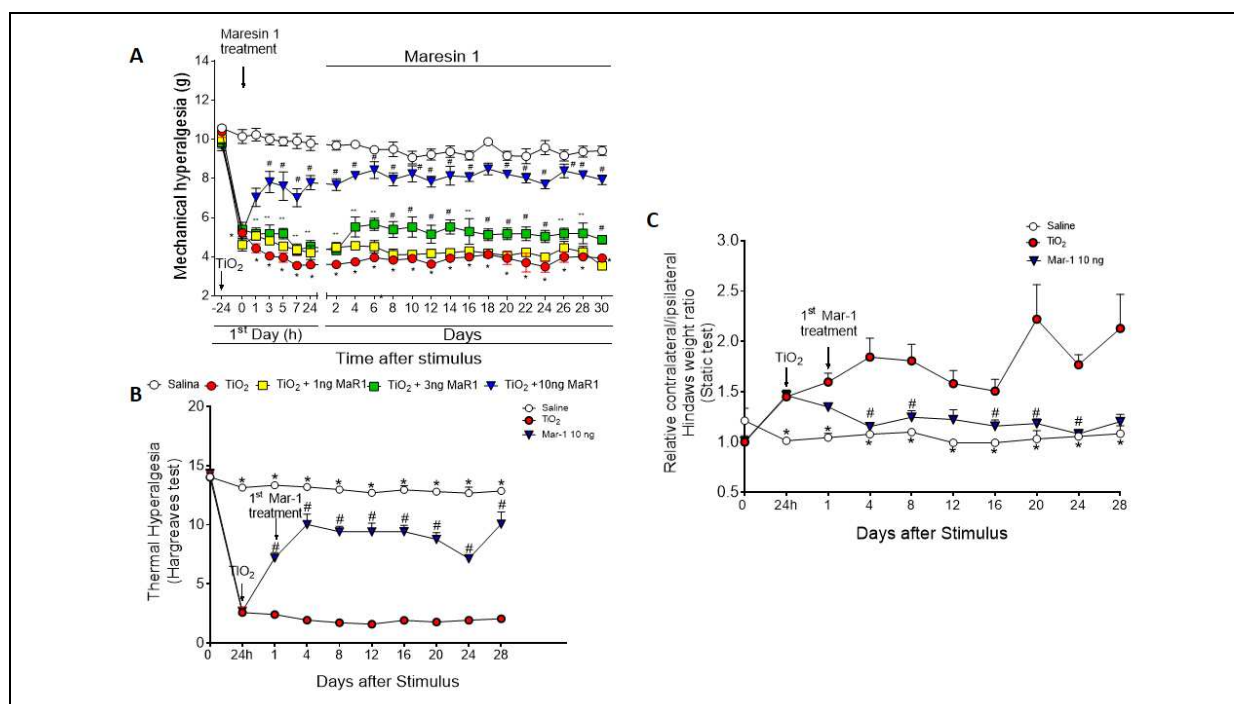
**2.13 Statistical analysis:** Data were analyzed using GraphPad Prism statistical software (GraphPad Software, Inc., USA-500.288, version 8.0). The results were presented as means  $\pm$  SEM of measurements made on six mice in each group per

experiment and are representative of two separate experiments. Two-way repeated measures analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post-test was used to compare all groups and doses at all times when responses were measured at different times after the stimulus injection. Differences between responses were evaluated by one-way ANOVA followed by Tukey's post-test for data of single time point.  $P < 0.05$  was considered significant.

### 3. Results

#### 3.1 MaR1 decreases evoked and non-evoked pain-like behavior in TiO<sub>2</sub> arthritis.

We started with a dose-response curve for MaR1 treatment (1, 3, 10 ng/animal, intraperitoneal [i.p.]) starting 24 h after intra-articular (i.a) injection of TiO<sub>2</sub> (3 mg/joint). Mechanical hyperalgesia (**Fig. 1A**) was evaluated 0, 1, 5, 7 and 24 hours after treatments, and on alternate days until the end of the 30th day. We defined that treatment should be every 3 days since MaR1 activity reduced by the 3rd day and our aim was to maintain analgesia continuously. The dose of 10ng was selected to the following experiments since it almost abolished TiO<sub>2</sub> mechanical hyperalgesia. Thermal hyperalgesia in the Hargreaves test (**Fig. 1B**) and the static weight distribution of the paws (**Fig. 1C**) were evaluated 0h, 24h after the stimulus, 1, 4, 8, 12, 16, 20, 24 and 28 days after the stimulus. MaR1 also reduced thermal and static weight distribution imbalance caused by TiO<sub>2</sub> joint inflammation.



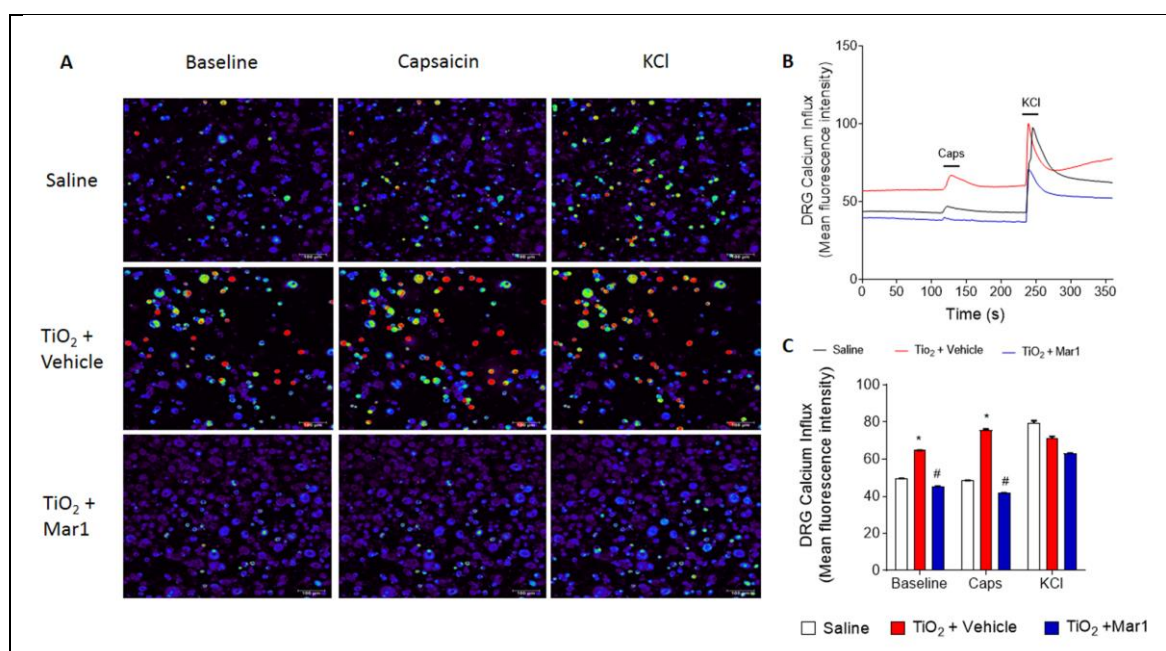
**Figure 1: MaR1 decreases mechanical hyperalgesia, thermal hyperalgesia and the proportion of relative weight of the paws in the titanium dioxide-induced arthritis model (TiO<sub>2</sub>)**

The mice were treated every 3 days in the 30-day period with MaR1 (1, 3, 10 ng/animal, intraperitoneal [i.p.]) starting 24 h after intra-articular (i.a) injection of TiO<sub>2</sub> (3 mg/joint). Mechanical hyperalgesia (**Fig. 1A**), thermal hyperalgesia (**Fig. 1B**) and the proportion of relative weight of the paws (**Fig. 1C**). The results were presented as a mean  $\pm$  standard error (SEM) of 6 mice per experimental group. \*  $p < 0.05$  compared to the saline group, \*\* $p < 0.05$  compared to the TiO<sub>2</sub> group, #  $p < 0.05$  compared to tio2 groups and other MaR1 doses. (Two-way ANOVA followed by Tukey's post-test).

### 3.2 MaR1 reduces primary afferent neuron activation in TiO<sub>2</sub> arthritis.

Considering the results of Fig. 1 that MaR1 reduces pain as observed by mechanical and thermal evoked responses and non-evoked static weight distribution imbalance, we evaluated whether MaR1 would be acting by reducing nociceptor neuron activation in TiO<sub>2</sub> arthritis. To this end, mice were treated as in **Fig. 1**, and at the 2<sup>nd</sup> day post-TiO<sub>2</sub> challenge, the dorsal root ganglia (DRG) corresponding to L4-L6 that innervate the knee joint were collected to isolate neurons and check their activity. The cellular bodies of those neurons are located in the DRG explaining our choice to properly evaluate primary afferent neuron activity. We opted to evaluate neuronal activation in the 2<sup>nd</sup> day after MaR1 treatment since pain was already established and this period would give time to allow MaR1 activity. We are presenting representative images of DRG culture (**Fig. 2A**), calcium traces (**Fig. 2B**) and quantitative analyses (**Fig. 2C**) using Fluo-4 as a fluorescent probe for calcium detection. Figure 2 shows that DRG neurons of TiO<sub>2</sub> arthritis mice presented a higher basal calcium level, which explains the observed enhanced pain behavior upon evoked and non-evoked tests (**Fig. 1A-D**). Thus, enhanced response to capsaicin represents enhanced response to nociceptive stimulation. On the other hand, MaR1 treatment reduced the basal calcium level of DRG neurons as well as the response to

capsaicin (**Fig. 2**). Thus, behavior and neuronal responses align to explain the analgesic activity of MaR1.

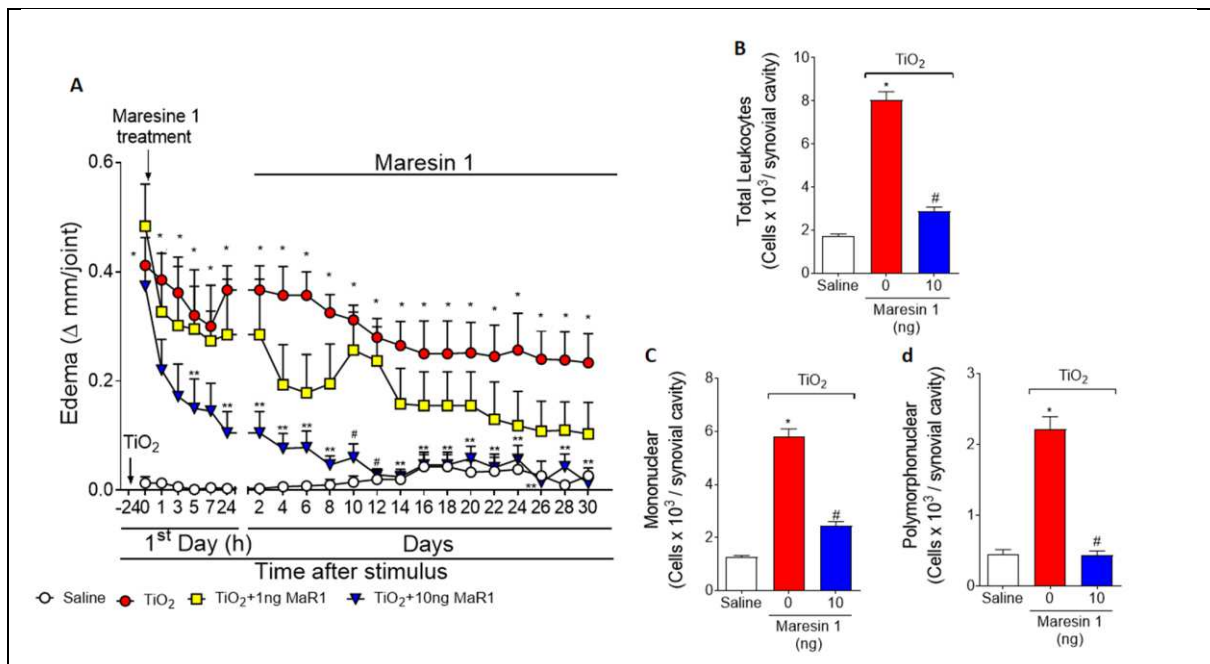


**Figure 2: MaR1 reduces arthritis TiO<sub>2</sub>-induced activation of DRG neurons**

Three days after intra-articular injection (i.a) of TiO<sub>2</sub> (3 mg/joint), DRGs were dissected for calcium imaging using Fluo-4AM (A-C). Panel (A) displays representative fields of DRG neurons dissected from saline-treated mice, mice stimulated with TiO<sub>2</sub> intra-articular (i.a.) injection and treated with vehicle, or stimulated with TiO<sub>2</sub> intra-articular (i.a.) injection and treated with MaR1. Panel (**Fig. 2A**): baseline fluorescence (first column), fluorescence after capsaicin (second column), and after KCl control (third column). Panel (**Fig. 2B**) displays the fluorescence intensity traces of calcium influx from the representative DRG fields (a) throughout the 6 min of recording. The representative traces show that the TiO<sub>2</sub> + vehicle DRG neurons presented higher calcium levels in the baseline than saline control and TiO<sub>2</sub> + MaR1 DRG neurons groups. Panel (**Fig. 2C**) shows the mean fluorescence intensity of calcium influx of the baseline (0-s mark) and that following the stimulus, either capsaicin (120-s mark, TRPV1 agonist) or KCl (240-s mark, activates all neurons). Results are expressed as mean  $\pm$  SEM, n = 4 DRG plates (each plate is a neuronal culture pooled from six mice) per group per experimente. \* p < 0.05 compared to the saline group, # p < 0.05 compared to TiO<sub>2</sub> groups. (One-way ANOVA followed by Tukey's post-test).

### 3.3 MaR1 reduces knee edema and recruitment of leukocytes caused by TiO<sub>2</sub> arthritis.

After establishing that MaR1 reduces TiO<sub>2</sub> arthritic pain, we next assessed its effect in inflammatory parameters. MaR1 reduced TiO<sub>2</sub> arthritic edema (**Fig. 3A**) as well as the recruitment of total leukocytes (**Fig. 3B**), mononuclear cells (**Fig. 3C**) and neutrophils (**Fig. 3D**). Thus, MaR1 also reduces TiO<sub>2</sub> joint inflammation.

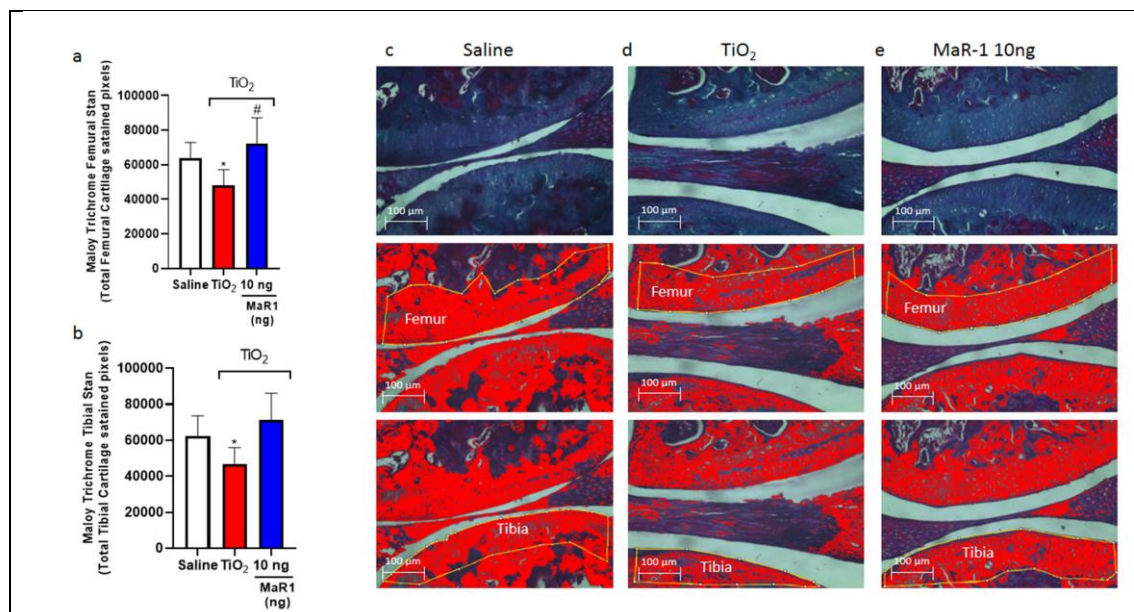


**Figure 3: MaR1 decreases edema and the migration of inflammatory cells into the synovial cavity in the titanium dioxide-induced arthritis model (TiO<sub>2</sub>).** Edema (Fig. 3A) was evaluated in the joint for 30 days after TiO<sub>2</sub> injection. The recruitment of total leukocytes (Fig. 3B), mononuclear (Fig. 3C) and polymorphonuclear (Fig. 3D) was evaluated in the joint wash 30 days after TiO<sub>2</sub> injection. The results were presented as a mean ± standard error (SEM) of 6 mice per experimental group. \* p < 0.05 compared to the saline group, \*\*p < 0.05 compared to the TiO<sub>2</sub> group, # p < 0.05 compared to TiO<sub>2</sub> groups and other MaR1 doses. (Two-way ANOVA followed by Tukey's post-test).

### 3.4 MaR1 reduces the histopathological changes caused by TiO<sub>2</sub> in the knee joint.

We followed the same treatment protocol as for Fig. 1 using the selected dose of MaR1 (10 ng/animal, i.p.) and samples of the knee joint were collected at the 30<sup>th</sup> day of TiO<sub>2</sub> inflammation. Fig. 4A presents the quantitative score of histopathological alterations caused by TiO<sub>2</sub> in the knee joint and that MaR1 post-treatment significantly reversed those alterations. Figs. 4B, C and D show representative images of knee joint sections in which arrows indicate leukocyte recruitment, the arrowhead demonstrates neovascularization, the asterisks show up TiO<sub>2</sub> and the rectangle highlight synovial hyperplasia. Note that a clear accumulation of TiO<sub>2</sub> may be observed in the knee tissue as black pigments.



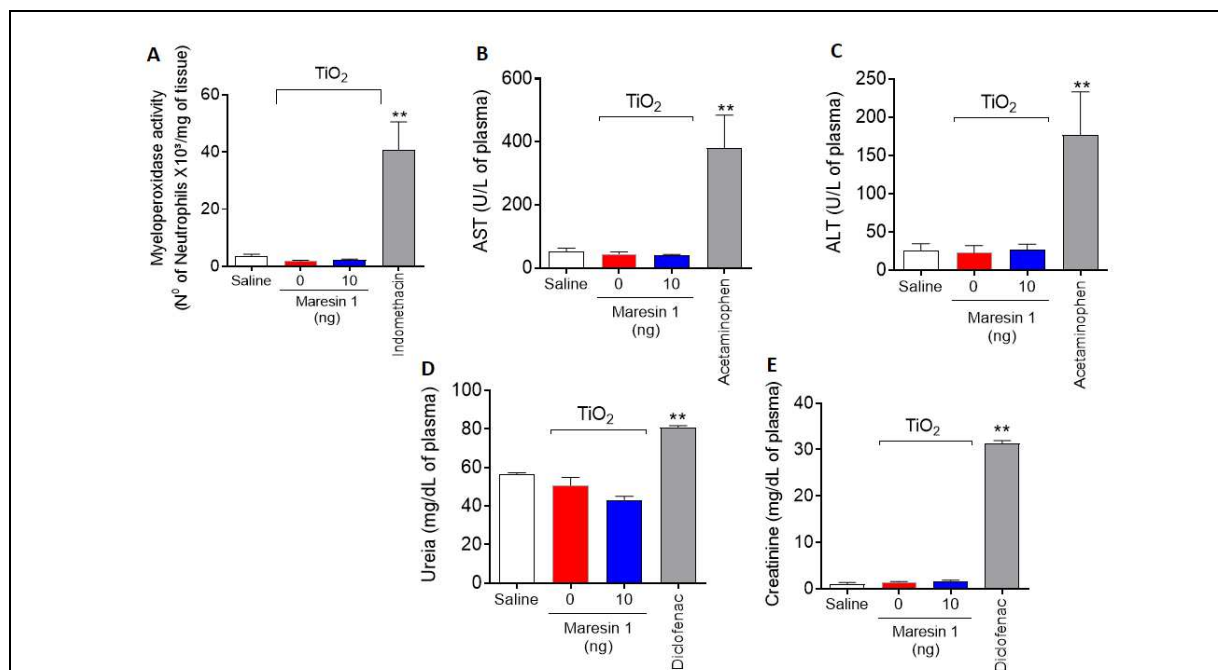


**Figure 5: MaR1 reduces cartilage degradation in chronic arthritis caused by TiO<sub>2</sub>**

Panel (A) shows the graphic representation of femoral degradation, (B) shows tibial degradation, (C) the joint of mice belonging to the saline group, in (D) joints of mice stimulated with TiO<sub>2</sub> and treated with vehicle and in (E) joint of TiO<sub>2</sub>-stimulated and MaR1-treated mice. Results are expressed as mean ± SEM, n = 6 animals per group per experiment, (\* P < 0.05 vs. saline, #P < 0.05 vs. 0 mg · kg<sup>-1</sup> group; Oneway Anova followed by the Tukey post-test).

### 3.6 Treatment with MaR1 does not induce gastric, hepatic or renal damage

An important question that arises during the development a novel active biological molecule is if they would induce side effects known to be triggered by current treatments. Following the protocol described in Fig. 1, samples of blood and stomach were collected. The myeloperoxidase (MPO) activity in the stomach tissue is used to detected inflammation and ulcers induced by non-steroidal anti-inflammatory drugs such as acethyl salicylic acid and indomethacin (Fig. 6A). Plasma AST (Fig. 6C) and ALT (Fig. 6D) levels are used to assess liver damage. Plasma urea (Fig. 6E) and creatinine levels are applied to investigate renal damage. MaR1 did not induce alteration of those markers of stomach lesion or liver and renal damage. On the other hand, control drugs that induce those alterations demonstrated that the tests were working properly. Indomethacin induced stomach lesion, acetaminophen induced liver damage and diclofenac induced renal damage (Fig. 6). **CoMO FOI FEITO O TRATAMENTO COM OS CONTROLES?**



**Figure 6: Treatment with MaR1 does not induce gastric, hepatic or renal damage.**

Were determined: (**Fig. 6A**) MPO activity in the stomach; (**Fig. 6B**) plasma levels of AST, (**Fig. 6C**) plasma levels of ALT; (**Fig. 6D**) plasma levels of urea; (**Fig. 6E**) plasma creatinine levels. The results were presented as  $\pm$  epm of 6 mice per experimental group. \*\* $p < 0.05$  compared to the saline group. (One-way ANOVA followed by Tukey's post-test).

#### 4. Discussion

TiO<sub>2</sub> is one of the main biomaterials used in prostheses and metal implants and also a causative agent of joint inflammation [15, 30]. With the general inflammatory process, there may be rejection of the prosthesis and the need for new surgery, and depending on the patient's health status, this is not possible [14]. In the present study, data demonstrate that MaR1 reduces mechanical and thermal hyperalgesia, knee edema, and joint histopathology in TiO<sub>2</sub> arthritis. All these beneficial effects occurred in the absence of stomach lesions or liver and renal damage.

We have previously observed that MaR1 presents a long-lasting analgesic effect in the CFA paw inflammation model. The analgesic effect of MaR1 lasted for 5 days upon pre-treatment, and for 3 days upon 24h post-treatment [52]. The current findings resemble those observations in the CFA model since MaR1 effect in the TiO<sub>2</sub> lasted for 72h. However, the present model has a much longer disease duration, with detectable inflammation for more than 30 days [53]. However, as we have standardized before, 30 days is sufficient to observed histopathological changes in the knee joint and even cartilage degradation [54, 55], and for this reason we restricted the disease period of evaluation to 31 days.

Results show that MaR1 reduced TiO<sub>2</sub> triggered nociceptive behavior using three methods, mechanical stimulation, heat thermal stimulation and non-evoked weight distribution between the rear paws. Thus, consistent data support the

analgesic effect of MaR1. In addition to these behavioral results, MaR1 reduced the basal dorsal root ganglia (DRG) neuronal calcium levels, which is a measure of neuronal activity. MaR1 reduces the activation of the TRPV1 channel, which is permeable to calcium [56]. DRG neurons of TiO<sub>2</sub> arthritis mice also presented higher response to capsaicin, which is a TRPV1 agonist. TRPV1 is widely expressed by C fiber nociceptor neurons and is involved in neuronal activation in pain [50, 51]. Quite interestingly, unpublished evidence demonstrates that TRPV1 mRNA and protein levels are increased in the DRG of TiO<sub>2</sub> knee inflammation mouse (unpublished data of Telma Saraiva-Santos and colleagues). In trigeminal ganglion neurons, MaR1 blocks capsaicin-induced TRPV1 in calcium influx at a low concentrations [44] indicating that it is a potent TRPV1 inhibitor. In the CFA paw inflammation model, MaR1 also reduced TRPV1 mRNA expression in the DRG [52]. Thus, it is reasonable to suggest that MaR1 could be inhibiting TRPV1 expression by DRG neurons, and this mechanism together with the inhibition of TRPV1 activity [56] would explain the analgesic effect of MaR1 in TiO<sub>2</sub> arthritis..

Leukocyte recruitment is a characteristic phenomenon that occurs in arthritis. We confirmed that TiO<sub>2</sub> induces leukocyte recruitment and MaR1 reduced this inflammatory event. TiO<sub>2</sub> activates recruited neutrophils [34] that participate in cartilage and bone destruction directly by releasing extracellular neutrophil traps (NETs), the release of NETs results in histone citrullination, which is a mechanism involved in rheumatoid arthritis and implant-induced arthritis, such as TiO<sub>2</sub> [34]. In chronic inflammation and neuropathic conditions, TNF- $\alpha$  [37], participate in the activation of sensory neurons, which is a nociceptive mechanism. In this sense, inhibition of cytokine production is also an analgesic effect [18]. In CFA inflammation, MaR1 reduces TNF- $\alpha$  production in the paw skin and spinal cord as well as macrophage and neutrophil accumulation in the inflamed paw skin [52]. Herein, MaR1 reduced the recruitment of leukocytes, synovial hyperplasia, neovascularization, and femoral cartilage degradation. Again, it is reasonable to suggest that MaR1 would be acting by reducing the production of inflammatory mediators and recruitment of leukocytes, and these effects accounted to reduce articular histopathology and cartilage degradation.

Finally, MaR1 analgesic and anti-inflammatory effects were observed in the absence of stomach lesions, liver damage or renal lesions, which are characteristic of non-steroidal anti-inflammatory drugs.

## 5. Conclusion

The present results explored the potential beneficial effect of MaR1 in a model of chronic arthritis triggered by TiO<sub>2</sub>, which is a wear process component generated in the by prosthesis friction. MaR1 consistently reduced nociceptive behavior, neuronal activation, inflammation, and histopathology changes in the knee of TiO<sub>2</sub> arthritis mice. These analgesic and anti-inflammatory effects occurred in the absence of stomach, liver or renal damages. Thus, the present data together with the literature support the therapeutic potential of MaR1 in inflammatory conditions.

## 6. Referenses

[1]. A. T. Guerrero, W. A. Verri, Jr., T. M. Cunha, T. A. Silva, F. A. Rocha, S. H. Ferreira, F. Q. Cunha and C. A. Parada, Hypernociception elicited by tibio-tarsal joint flexion in mice: a novel experimental arthritis model for pharmacological screening.

- Pharmacol Biochem Behav, 2006;84:244-251. <https://doi:10.1016/j.pbb.2006.05.008>
- [2]. Cobelli N, Scharf B, Crisi GM, Hardin J, Santambrogio L. Mediators of the inflammatory response to joint replacement devices. *Nat Rev Rheumatol*, 2011;7:600-8. <https://doi:10.1038/nrrheum.2011.128>
- [3]. Ulrich SD, Seyler TM, Bennett D, Delanois RE, Saleh KJ, Thongtrangan I, et al. Total hip arthroplasties: What are the reasons for revision? *Int Orthop*, 2008;32:597-604. <https://doi:10.1007/s00264-007-0364-3>
- [4]. Lee K, Goodman SB. Current state and future of joint replacements in the hip and knee. *Expert Rev. Med. Devices*, 2008;5(3):383-93. <https://doi:10.1586/17434440.5.3.383>
- [5]. Browne M, Gregson PJ. Surface modification of titanium alloy implants. *J. Biomed*, 1994;15(11):894-8. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(94\)90113-9](https://doi.org/10.1016/0142-9612(94)90113-9)
- [6]. Wooley PH, Morren R, Andary J, Sud S, Yang SY, Mayton L, et al. Inflammatory responses to orthopaedic biomaterials in the murine air pouch. *J. Biomed*, 2002;23:517-26. [https://doi:10.1016/s0142-9612\(01\)00134-x](https://doi:10.1016/s0142-9612(01)00134-x)
- [7]. St. Pierre CA, Chan M, Iwakura Y, Ayers DC, Kurt-Jones EA, Finberg RW. Periprosthetic osteolysis: Characterizing the innate immune response to titanium wearparticles. *J Orthop Res*, 2010;28:1418-24. <https://doi:10.1002/jor.21149>
- [8]. Wang CT, Lin YT, Chiang BL, Lee SS, Hou SM. Over-expression of receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand (RANKL), inflammatory cytokines, and chemokines in periprosthetic osteolysis of loosened total hip arthroplasty. *J. Biomed*, 2010;31:77-82. <https://doi:10.1016/j.biomaterials.2009.09.017>
- [9]. Gurr JR, Wang AS, Chen CH, Jan KY. Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. *Toxicol Res* 2005;213:66-73. <https://doi:10.1016/j.tox.2005.05.007>
- [10]. Dunford R, Salinaro A, Cai L, Serpone N, Horikoshi S, Hidaka H, et al. Chemical oxidation and DNA damage catalysed by inorganic sunscreen ingredients. *FEBS Lett*, 1997;418:87-90. [https://doi:10.1016/s0014-5793\(97\)01356-2](https://doi:10.1016/s0014-5793(97)01356-2)
- [11]. Moran CA, Mullick FG, Ishak KG, Johnson FB, Hummer WB. Identification of titanium in human tissues: Probable role in pathologic processes. *Hum Pathol*, 1991;22:450-54. [https://doi:10.1016/0046-8177\(91\)90130-h](https://doi:10.1016/0046-8177(91)90130-h)
- [12]. Chen J, Dong X, Zhao J, Tang GJ. In vivo acute toxicity of titanium dioxide nanoparticles to mice after intraperitoneal injection. *J Appl Toxicol*, 2009;29:330-37. <https://doi:10.1002/jat.1414>
- [13]. Wang JX, Fan YB, Gao Y, Hu QH, Wang TC. TiO<sub>2</sub> nanoparticles translocation and potential toxicological effect in rats after intraarticular injection. *J. Biomed* 2009;30:4590-600. <https://doi:10.1016/j.biomaterials.2009.05.008>
- [14]. Borghi SM, Mizokami SS, Pinho-Ribeiro FA, Fattori V, Crespigio J, Clemente-Napimoga JT, et al. The flavonoid quercetin inhibits titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>)-induced chronic arthritis in mice. *J Nutr Biochem*. 2017;53:81–95. <https://doi.org/10.1016/j.jnutb.2017.10.010>
- [15]. Dörner T, Haas J, Loddenkemper C, von Baehr V, Salama A. Implant-related inflammatory arthritis. *Nat Clin Pract Reumatol*, 2006;2:53-6. <https://doi.org/10.1038/ncprheum0087>
- [16]. Laev SS, Salakhutdinov NF. Anti-arthritic agents: Progress and potential. *Bioorg Med Chem*, 2015;23:3059-80. <https://doi:10.1016/j.bmc.2015.05.010>
- [17]. Fattori V, Pinho-Ribeiro FA, Staurengo-Ferrari L, Borghi SM, Rossaneis AC, Casagrande R, Verri Jr. WA. The specialised pro-resolving lipid mediator maresin 1 reduces inflammatory pain with a long-lasting analgesic effect. *Br. J. Pharmacol*, 2017; 2019;176:1728–1744. <https://doi.org/10.1111/bph.14647>

- [18]. Verri-JR, WA, Cunha, TM, Parada, CA, Poole, S, Cunha, FQ, & Ferreira, SH. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: Targets for analgesic drug development? *JPET*, 2006;112(1), 116–138. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2006.04.001>
- [19]. Chiang, N, & Serhan, CN. Structural elucidation and physiologic functions of specialized pro-resolving mediators and their receptors. *Mol. Asp. Med*, 2017;58, 114–129. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2017.03.005>
- [20]. Serhan, CN. Treating inflammation and infection in the 21st century: New hints from decoding resolution mediators and mechanisms. *FASEB*, 2017;31(4), 1273–1288. <https://doi.org/10.1096/fj.201601222R>
- [21]. Serhan, CN., Chiang, N, Dalli, J, & Levy, BD. Lipid mediators in the resolution of inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2015;7(2), a016311. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016311>
- [22]. Giera, M, Ioan-Facsinay, A, Toes, R, Gao, F, Dalli, J, Deelder, AM, et al. Lipid and lipid mediator profiling of human synovial fluid in rheumatoid arthritis patients by means of LC-MS/MS. *BBA*, 2012;1821(11), 1415–1424. <https://doi.org/10.1016/j.bbaliip.2012.07.011>
- [23]. Francos-Quijorna, I, Santos-Nogueira, E, Gronert, K, Sullivan, AB, Kopp, MA, Brommer, B, et al. Maresin 1 promotes inflammatory resolution, neuroprotection, and functional neurological recovery after spinal cord injury. *J Neurosci*, 2017;37(48), 11731–11743. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1395-17>
- [24]. Serhan, C. N., Dalli, J., Karamnov, S., Choi, A., Park, C. K., Xu, Z. Z, et al. Macrophage proresolving mediator maresin 1 stimulates tissue regeneration and controls pain. *FASEB*, 2012;26(4), 1755–1765. <https://doi.org/10.1096/fj.11-201442>
- [25]. Guerrero AT, Verri WA, Jr., Cunha TM, Silva TA, Rocha FA, Ferreira SH, et al. Hypernociception elicited by tibio-tarsal joint flexion in mice: a novel experimental arthritis model for pharmacological screening. *Pharmacol. Biochem. Behav*, 2006;84(2):244-51. <https://doi:10.1016/j.pbb.2006.05.008>
- [26]. Hargreaves K., R. Dubner, F. Brown, C. Flores and J. Joris. New and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain*, 32 (1988) 77-88. [https://doi:10.1016/0304-3959\(88\)90026-7](https://doi:10.1016/0304-3959(88)90026-7)
- [27]. Chiu, IM, Heesters, BA, Ghasemlou, N, Von Hehn, CA, Zhao, F, Tran, J, et al. Bacteria activate sensory neurons that modulate pain and inflammation. *Nat*, 2013;501(7465), 52–57. <https://doi.org/10.1038/nature12479>
- [28]. Ulrich SD, Seyler TM, Bennett D, Delanois RE, Saleh KJ, Thongtrangan I, et al. Total hip arthroplasties: what are the reasons for revision? *Int. Orthop*, 2008;32(5):597-604. <https://doi:10.1007/s00264-007-0364-3>
- [29]. Fattori, V, Hohmann, MS, Rossaneis, AC, Pinho-Ribeiro, FA, & Verri, WA. Capsaicin: Current understanding of its mechanisms and therapy of pain and other pre-clinical and clinical uses. *Mol*, 2016;21(7). <https://doi.org/10.3390/molecules21070844>
- [30]. Long M, Rack HJ. Titanium alloys in total joint replacement– a materials science perspective. *Biomaterials*, 1998;19(18):1621–39. [https://doi:10.1016/s0142-9612\(97\)00146-4](https://doi:10.1016/s0142-9612(97)00146-4)
- [31]. Bannenberg, GL, Chiang, N, Ariel, A, Arita, M, Tjonahen, E, Gotlinger, K H, et al. Molecular circuits of resolution: Formation and actions of resolvins and protectins. *J. Immunol. Res.*, 2005;174(7), 4345–4355. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.7.4345>
- [32]. Huang, L, Wang, CF, Serhan, CN, & Strichartz, G. Enduring prevention and transient reduction of postoperative pain by intrathecal resolvin D1. *Pain*,

- 2011;152(3), 557–565. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2010.11.021>
- [33]. Verri WA, Souto FO, Vieira SM, Almeida SCL, Fukada SY, Xu D, et al. IL-33 induces neutrophil migration in rheumatoid arthritis and is a target of anti-TNF therapy. *Ann Rheum Dis*, 2010;69(9):1697–703. <https://doi.org/10.1136/ard.2009.122655>
- [34]. Gonçalves DM, Chiasson S, Girard D. Activation of human neutrophils by titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticles. *Toxicol. In Vitro*. 2010;24(3):1002–8. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.12.007>
- [35]. Vitkov L, Krautgartner W-D, Obermayer A, Stoiber W, Hannig M, Klappacher M, et al. The initial inflammatory response to bioactive implants is characterized by NETosis. *PLoS One*, 2015;10(3):e0121359-e. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121359>
- [36]. Wright HL, Moots RJ, Edwards SW. The multifactorial role of neutrophils in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol*, 2014;10(10):593–601. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2014.80>
- [37]. Jin X, Gereau RW. Acute p38-mediated modulation of tetrodotoxin-resistant sodium channels in mouse sensory neurons by tumor necrosis factor. *J Neurosci*, 2006;26(1):24655. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.385805.2006>
- [38]. Ma, QP, & Woolf, CJ. Progressive tactile hypersensitivity: Na inflammation-induced incremental increase in the excitability of the spinal cord. *Pain*, 1996;67(1), 97–106. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(96\)03105-3](https://doi.org/10.1016/0304-3959(96)03105-3)
- [39]. Pinho-Ribeiro, FA, Verri, WAJr, & Chiu, IM. Nociceptor sensory neuron-immune interactions in pain and inflammation. *Curr Trends Immunol*, 2017;38(1), 5–19. <https://doi.org/10.1016/j.it.2016.10.001>
- [40]. Woolf, CJ. (1994). A new strategy for the treatment of inflammatory pain. Prevention or elimination of central sensitization. *Drugs*, 199;47(Suppl 5),1–9. discussion 46-47 <https://doi.org/10.2165/00003495-199400475-00003>
- [41]. Kawasaki, Y, Zhang, L, Cheng, JK, & Ji, RR. Cytokine mechanisms of central sensitization: Distinct and overlapping role of interleukin-1 $\beta$ , interleukin-6, and tumor necrosis factor- $\alpha$  in regulating synaptic and neuronal activity in the superficial spinal cord. *J Neurosci*, 2008;28(20), 5189–5194. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3338-07.2008>
- [42]. Fattori, V, Amaral, FA, & Verri, WAJr. Neutrophils and arthritis: Role in disease and pharmacological perspectives. *Pharmacol Res*, 2016;112, 84–98. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.01.027>
- [43]. Kolaczowska, E., & Kuberski, P. (2013). Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*, 2013,13(3), 159–175. <https://doi.org/10.1038/nri3399>
- [44]. Park, CK. Maresin 1 inhibits TRPV1 in temporomandibular joint-related trigeminal nociceptive neurons and TMJ inflammation-induced synaptic plasticity in the trigeminal nucleus. *Mediat. Inflamm.*, 2015, 275126. <https://doi.org/10.1155/2015/275126>
- [45]. Blake, K. J., Baral, P., Voisin, T., Lubkin, A., Pinho-Ribeiro, F. A., Adams, K. L., et al. *Staphylococcus aureus* produces pain through pore-forming toxins and neuronal TRPV1 that is silenced by QX-314. *Nat. Commun*, 2018,9(1), 37. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02448-6>
- [46]. Chiu, I. M., Heesters, B. A., Ghasemlou, N., Von Hehn, C. A., Zhao, F., Tran, J., et al. Bacteria activate sensory neurons that modulate pain and inflammation. *Nat*, 2013,501(7465), 52–57. <https://doi.org/10.1038/nature12479>
- [47]. Dörner T, Haas J, Loddenkemper C, von Baehr V, Salama A. Implant-related

inflammatory arthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2006;2:53-6.

<https://doi.org/10.1038/ncprheum0087>

[48]. CHIANG, N. et al. Infection regulates pro-resolving mediators that lower antibiotic requirements. *Nat*, 2012, 484, 524–528.

<https://doi.org/10.1038/nature11042>

[49]. SERHAN, Charles N. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature*, 2014, 510,(7503),92-101. <https://doi.org/10.1038/nature13479>

[50]. PARK, C. K. et al. Resolving TRPV1- and TNF- $\alpha$ -mediated spinal cord synaptic 34 plasticity and inflammatory pain with neuroprotectin D1. *J Neurosci* 2011, v35 (31), 42, 15072–15085. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2443-11.2011>

[51]. HUANG, Tingting et al. The Synergistic Effect of TRPV1 on Oxidative Stress-Induced Autophagy and Apoptosis in Microglia. *Anal. Cell. Pathol.*, 2021, V. 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/7955791>

[52]. FATTORI, Victor et al. The specialised pro-resolving lipid mediator maresin 1 reduces inflammatory pain with a long-lasting analgesic effect. *Br. J. Pharmacol.*, 2019, 176, (11), 1728-1744. <https://doi.org/10.1111/bph.14647>

[53]. GUIRRO, Philippe B. et al. Effect of running exercise on titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>)-induced chronic arthritis and sarcopenia in mice. A titanium prosthesis loosening injury model study. *Life Sci*, 2022, 297, p. 120472. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.120472>

[54]. BORGHI, Sergio M. et al. The flavonoid quercetin inhibits titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>)-induced chronic arthritis in mice. *J. Nutr. Biochem.*, 2018, 53, 81-95. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2017.10.010>

[55]. MANCHOPE, Marília F. et al. Naringenin mitigates titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>)-induced chronic arthritis in mice: Role of oxidative stress, cytokines, and NF $\kappa$ B. *J. Inflamm. Res.*, 2018, 67, 11, 997-1012. <https://doi.org/10.1007/s00011-018-1195-y>

[56]. SERHAN, Charles N. et al. Macrophage proresolving mediator maresin 1 stimulates tissue regeneration and controls pain. *FASEB*, 2012, 26, 4, 1755. <https://doi.org/10.1096/fj.11-201442>

## 7. ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

O presente trabalho foi realizado no laboratório de Dor, Inflamação, Neuropatia e Câncer, da Universidade Estadual de Londrina e segue as normas da revista *Inflammation Research* ([https://www.springer.com/journal/11/submissionguidelines#Instructions%20fo%20Au%20thors\\_Types%20of%20papers](https://www.springer.com/journal/11/submissionguidelines#Instructions%20fo%20Au%20thors_Types%20of%20papers)). Os resultados estão descritos no artigo intitulado "Maresin 2 reduces pain and inflammation in acetic acid-induced colitis".

## Maresin 2 reduces pain and inflammation in acetic acid-induced colitis

Anelise Franciosi<sup>1</sup>, Nayara A. Antero<sup>1</sup>, Julia Bagatim<sup>1</sup>, Telma S. dos Santos<sup>1</sup>, Tiago H. Zaninelli<sup>1</sup>, Mariana M. Bertozzi<sup>1</sup>, Camila R. Ferraz<sup>1</sup>, Rúbia Casagrande<sup>2</sup> and Waldiceu A. Verri Jr<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Ciências Patológicas, Universidade Estadual de Londrina-UEL, Rod. Celso Garcia Cid, km 380, PR 445, 86057-970, Cx. Postal 10.011, Londrina, Paraná, Brazil.

<sup>2</sup>Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Londrina-UEL, Avenida Robert Koch, 60, Hospital Universitário, 86038-350, Londrina, Paraná, Brazil.

\*Corresponding Author

Waldiceu A. Verri Jr

Departamento de Ciências Patológicas, Universidade Estadual de Londrina-UEL, Rod. Celso Garcia Cid, km 380, PR 445, 86057-970, Cx. Postal 10.011, Londrina, Paraná, Brazil. Fax: +55 43 33714387, Tel:+55 43 33714979, E-mail address: waldiceujr@yahoo.com.br; waverri@uel.br.

### Abstract

**Objective:** To evaluate the effect of maresin 2 (MaR2) on acute inflammation caused by acetic acid induced-colitis in mice.

**Material and Methods:** Mice were treated with MaR2 (3ng/animal, i.p.) 30 minutes before and 12h after acetic acid (6% solution) intrarectal induction. Visceral mechanical hyperalgesia was assessed by the electronic von Frey method. After collection of intestine samples, we evaluated macroscopic and microscopic histological patterns alterations, mucus production, mast cells recruitment and macrophages phenotype on colonic tissue. Myeloperoxidase (MPO) activity was used for neutrophils recruitment in the tissue. Immunofluorescence was performed to analyze the inducible nitric oxide synthase (iNOS) activation in macrophages.

**Results:** MaR2 decreased visceral mechanical hyperalgesia, leukocyte recruitment, atrophy of the mucosal layer, destruction of goblet cells, detachment of the muscular and mucosal layers. As well as was observed a reduction in the amount of mast cells present in the tissue and the iNOS activation in macrophages.

**Conclusion:** MaR2 improves the phenotype of acetic acid-induced colitis, producing an analgesic effect observed on visceral mechanical hyperalgesia assessment, and anti-inflammatory potential by decreasing leukocyte recruitment and histological changes, including crypt atrophy and goblet cell destruction.

**Keywords:** Maresin · Colitis · Acetic Acid · Acute Inflammation · Pain ·

## 1. Introduction

Inflammatory bowel disease (IBD) has been considered a major public health problem since its incidence has been increasing around the world, making it also considered a global disease [1]. It is characterized both by a chronic intestinal inflammation with multifactorial etiology, and presents two main forms according to the region where the inflammation is, one being Crohn's disease (CD) and the other ulcerative colitis (UC) [2]. CD is marked by an extensive lesion that can affect the entire gastrointestinal tract, already in UC, this inflammatory lesion is controlled and local, limited to the colon [3].

Due to the severity of the disease, IBD greatly impacts quality of life and productivity [4], as it manifests itself in symptoms such as diarrhea, often bloody, which refers to anemia, abdominal pain, weight loss, fatigue, fever, fistulas, and often extra-intestinal manifestations. Even though its origin is multifactorial, IBD may occur in response to immunological deregulation that causes a response against the intestinal microbiota in a genetically susceptible individual [5, 6]. Nevertheless, chronic intestinal inflammation from immune deregulation is associated with increased production of ROS, molecules that play an important role in the pathophysiology of the disease in humans and animals [7, 8].

Contributing to the inflammatory process and tissue injury, there is the recruitment of neutrophils and macrophages to the injured intestinal tissue, which is responsible for the production of ROS and NF- $\kappa$ B-dependent pro-inflammatory cytokines, which perpetuate the disease [4]. This may be seen clinically, since pro-inflammatory cytokines such as IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-33 are found at high levels in patients with IBD [9, 10, 11], and as much as anti-inflammatory cytokines are involved in controlling the development of IBD, it is known that patients who present mutations in the production of interleukin 10 (IL-10) or in their receptor tend to develop the most severe and early disease [12].

UC is usually characterized as abdominal pain, diarrhea and mucous stools, which are associated with the severity of inflammation clinically [13], affects only the colon, diffusely, recurrent and non-transmural [14]. Although the precise etiology of UC is unclear, it is well recognized that the increased production and release of pro-inflammatory cytokines, such as TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  and IL-33, are responsible for inflammation of the intestinal mucosa [15].

Although the disease is characterized with idiopathic etiology, many studies are conducted about this, and it is known that 8 to 14% of patients diagnosed with ulcerative colitis have a family history of inflammatory bowel disease, and first-degree relatives have four times the risk of developing the disease [16, 17]. Regarding ethnicities, studies say that Jewish populations have higher rates of patients with ulcerative colitis than others [18, 19].

In recent years, a wide variety of therapeutic approaches have been applied for the treatment of UC, such as aminosalicylates derived from 5-aminosalicylic acid (5-ASA), which are the main choice of treatment for the disease in the mild or moderate stage. Topical and systemic steroids are used to mitigate the effects of seizures promoted by the disease, while immunosuppressants and biological drugs are choices in cases considered moderate to severe.

Therapy aims to induce a clinical remission process [20]. Aminosalicylates are the main choice of treatment for mild to moderate ulcerative colitis, topical and systemic steroids may be used to treat ulcerative colitis seizures, while immunosuppressants and biological drugs are used in moderate to severe disease [21].

However, limited beneficial effects or adverse effects still existed in these therapeutic approaches, more effective and non-toxic therapies are urgently needed. And colectomy (surgical removal of part of the colon) is necessary in up to 15% of cases [22].

Maresin 2 (MaR-2), a pro-resolution lipid mediator (SPM) arising from macrophages from the breakdown of DHA by human 12-lipoxygenase [23, 24], is a therapeutic agent with adequate potential to promote the reduction of leukocyte recruitment, observed in the zymosan-induced arthritis model, and also inducer phagocytosis by macrophages [24]. Recently, its demonstrated potential has been demonstrated through reduction of TRPV1 and neuronal dependent in recent data (FAT0 from NTOR12 to Neuropharmac dependent-22-22-22-10).

## **2. Materials and methods**

### **2.1 Animals**

Male Swiss mice weighing between 20-25 g from the animal facility of the State University of Londrina, Paraná, Brazil, were used. The animals were housed in

standard plastic cages with free access to food and water, light/dark cycle (12/12h and controlled temperature (21°C). They were kept in the animal facility at the Pathology Department of the State University of Londrina for at least two days before the experiments. The methods of manipulation and animal care were in accordance with the guidelines of the International Association of Studies on Pain (IASP) and were approved by the Research and Ethics Committee from State University of Londrina (CEUA nº 11148.2016.83).

## **2.2 Drugs**

The compounds used in this study were saline solution (NaCl 0.9%, Frenesius Kabi Brasil Ltda, Aquiraz, CE, Brazil), acetic acid P.A (Synth, Diadema, SP, Brazil), and MaR-2 (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA).

## **2.3 Experimental procedures**

Before induction, the animals were packed in metabolic cages for 12 hours fasting, receiving only water, to keep the intestines empty. After fasting, animals were anesthetized (inhaled isoflurane) for colon cleansing with saline solution and divided into the experimental groups. Half an hour after the colon cleansing, mice were pretreated with MaR-2 (0.3 and 3 ng/animal) or vehicle (saline solution), intraperitoneally (i.p.) for dose response determination. For the colitis induction, mice were anesthetized with ketamine and xylazine to be stimulated with acetic acid (Aac) in the concentration of 6%, previously solubilized in saline solution, through intrarectal route half an hour after pretreatment. 12 hours after induction, the treatments with MaR-2 were administrated again and 18 hours after induction the animals were anesthetized and euthanized (inhaled isoflurane) for sample collection.

## **2.4 Evaluation of Mechanical Hyperalgesia Visceral**

Mechanical hyperalgesia of the peritoneal region was evaluated by means of an electronic pressure measurement test consisting of a hand force transducer equipped with a polypropylene tip (von Frey electronic anesthesiometer; Insight, Ribeirão Preto, SP) was used to evaluate mechanical joint nociception. In a quiet room, the animals were placed individually in acrylic cages (12 x 10 x 17 cm) with a wire grid floor, 15 to 30 minutes before the environmental adaptation test. The application of force was performed only when the animals had four legs on the grid,

did not exhibit exploratory movements or defecation, and were not resting on the paws. An increasing perpendicular force was applied in the central area of the peritoneum to induce a flexion/contortion movement. A mirror tilted below the grid provided a clear view of the four legs. The electronic pressure measuring device automatically recorded the intensity of the force applied when the animal arched. The test was repeated until subsequent consistent measurements (i.e., the variation between these measurements was less than 1 g). The mechanical threshold induced by flexion was expressed in grams (g).

### **2.5 MPO activity assay**

MPO activity, considered a reliable marker of neutrophil migration to tissues, was analyzed by a colorimetric assay [25]. Colon samples were collected in  $\text{H}_2\text{PO}_4$  50 mM buffer (pH 6.0) containing 0.5% trimethylammonium hexadecyl bromide (HTAB) and kept at  $-80^\circ\text{C}$  until use. The frozen samples were homogenized using a turrax (Tissue-Tearor 985370, BioSpec Products, Bartlesville, OK, USA) and centrifuged (2 min, 16,000g,  $4^\circ\text{C}$ ) to obtain the supernatant. The analysis were performed in a spectrophotometer (Multiskan GO Microplate Spectrophotometer, ThermoScientific, Vantaa, Finland) with wavelenght at 450 nm. The MPO activity from the samples were compared to a neutrophil standard curve. In summary, samples were mixed with phosphate buffer 50 mM (pH 6.0), containing 0.167 mg / mL of O-dianiside dihydrochloride and 0.0005% of hydrogen peroxide. The results were presented as MPO activity.

### **2.6 Histological processing**

Femorotibial joint samples were collected, fixed in buffered formalin and submitted to histological processing, with dehydration using graduated alcohol baths (Contemporary Chemical Dynamics - São Paulo), diaphrel with xylool baths (Synth - Diadema - SP), paraffin impregnation (Synth - Diadema - SP). Sections of 7 micrometers were performed in the microtome. The slides with the cuts were submitted to staining techniques of hematoxylin and eosin (Laborclin - Pinhais-PR), Toluidine Blue (TB) (Sigma-Aldrich - Jurubatuba - SP) and Schiff Reactive (PAS) (Sigma-Aldrich - Jurubatuba - SP). Through the staining of Hematoxylin and Eosin (HE), it was possible to observe the tissue, and perform the analysis by means of a clinical score, where crypt atrophy, destruction of calliform cells, separation of muscle

and mucosal layers, and inflammatory infiltrate were evaluated, which scored from 0 to 3, demonstrating a degree of tissue degradation according to the increasing level, being 0 for no alteration and 3 for severe alteration, in this case being a significant degree of crypt atrophy, decrease in the number of goblet cells, and even an increase in inflammatory infiltrate that harm the tissue. Through the toluidine blue staining, it was possible to observe the migration of mast cells to the inflamed tissue, and by means of The Schiff Reactive staining with alcian blue staining it was possible to measure the amount of positive PAS+ and AB cells, characterizing the goblet cells as the production of acid mucin and basic mucin. This analysis was performed with the aid of the Image J program, which allowed the counting of positive cells to be performed.

## **2.7 Immunofluorescence**

Colon samples were collected, fixed in PFA 4% and submitted to processing for freezing. Sections of 7 micrometers were performed through the microtome. The slides with the cuts were submitted to immunofluorescence technique, for the visualization of macrophages present in the tissue, immunostaining was performed with the F4/80 antibody (eBioscience), and through immunostaining with the antibody iNOS (eBioscience) it was possible to observe the positive iNOS cells. The colocalization analysis required to visualize positive iNOS macrophages was performed using the Leica X confocal

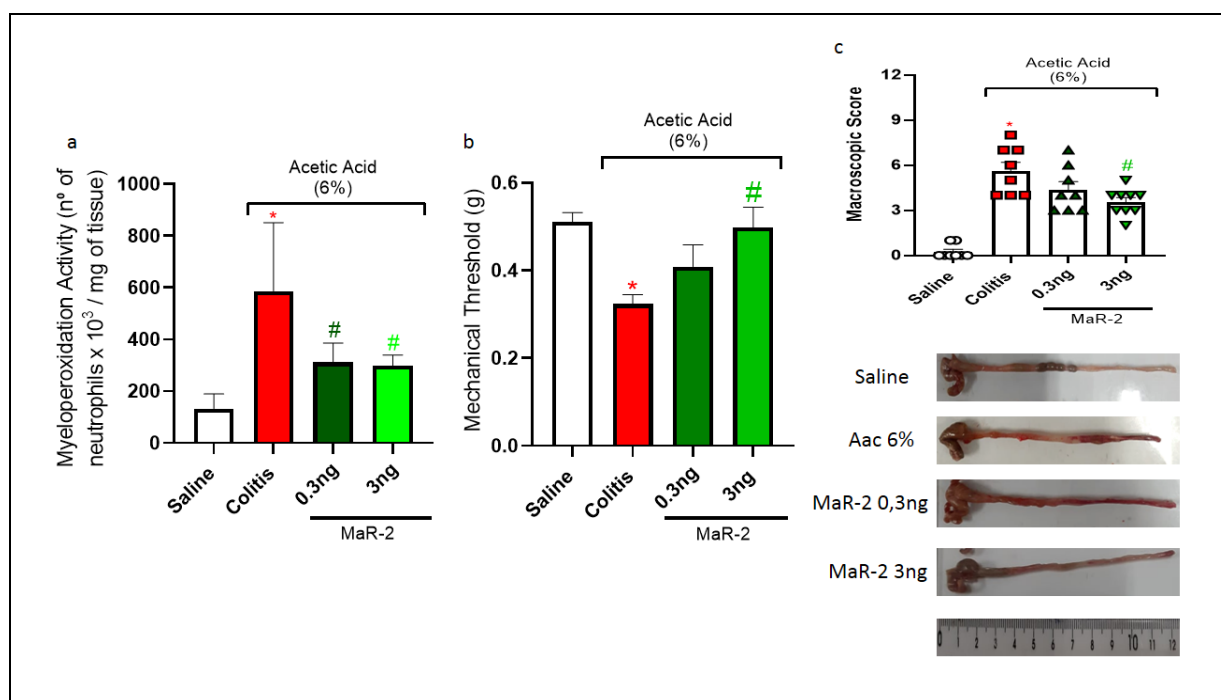
## **2.8 Statistical analysis:**

Data were analyzed using GraphPad Prism statistical software (GraphPad Software, Inc., USA-500.288, version 8.0). The results were presented as means  $\pm$  SEM of measurements made on six mice in each group per experiment and are representative of two separate experiments. Two-way repeated measures analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post-test was used to compare all groups and doses at all times when responses were measured at different times after the stimulus injection. Differences between responses were evaluated by one-way ANOVA followed by Tukey's post-test for data of single time point.  $P < 0.05$  was considered significant.

### 3. Results

#### 3.1 MaR2 reduces myeloperoxidase activity, mechanical hyperalgesia and histological changes visualized through the macroscopic score.

The animals were kept in a metabolic cage 24 hours before colon lavage, followed by pretreatment and model induction. After 12 hours of induction, the second treatment was performed, after 17 hours of induction, mechanical hyperalgesia was evaluated using the von Frey method and after 18 hours of induction, the animals were euthanized, and the colon segment was collected for evaluation. of the exposed dose. The dose of MaR-2 for the treatment was chosen through the evaluation of MPO (**Fig. 1A**) evaluated after 18 hours of induction, mechanical hyperalgesia (**Fig. 1B**) evaluated at the seventeenth hour of induction, and evaluation of changes macroscopic histological findings observed in the tissue (**Fig. 1C**) after 18 hours of induction (0.3ng and 3 ng/animal intraperitoneal). The 3 ng dose was chosen after promoting the reduction of myeloperoxidation activity, the evaluated mechanical hyperalgesia in the peritoneum and promoting visible bleeding in the colonic tissue, as well as the decrease in the shortening of the organ in only 2 treatments.

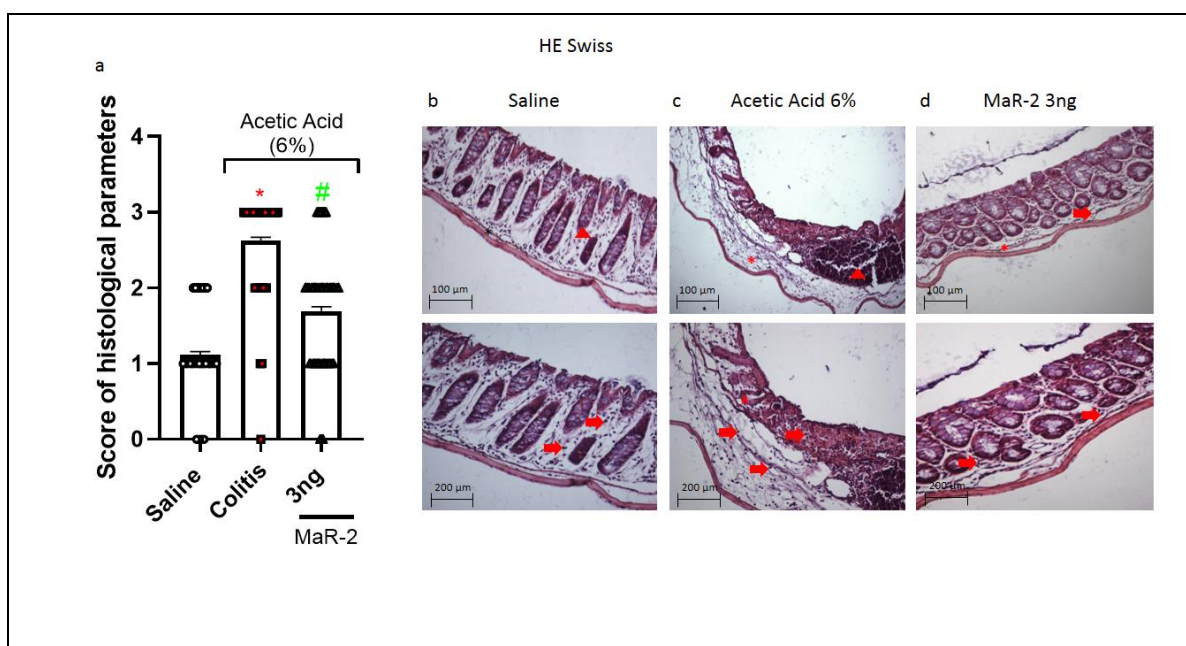


**Figure 1: MaR2 reduz a atividade da mieloperoxidase, a hiperalgesia mecânica e as alterações histológicas visualizadas através do score macroscópico.**

Animals received two treatments of MaR-2 30 (0.3ng and 3ng/animal, intraperitoneal [i.p.]). Myeloperoxidation activity (**Fig. 1A**) was evaluated 18h after induction. Mechanical hyperalgesia (**Fig. 1B**) were evaluated 17h after the stimulus and macroscopic score (**Fig. 1C**) were evaluated 18h after the stimulus. Thus, it was possible to evaluate the best dose of treatment, being 3 ng, able to decrease myeloperoxidation activity, mechanical hyperalgesia, and macroscopic histological alterations. The results were presented as a mean  $\pm$  standard error (SEM) of 6 mice per experimental group. \* p < 0.05 compared to the saline group, \* p < 0.05 compared to the colitis group, # p < 0.05 compared to colitis groups and other MaR2 doses. (Two-way ANOVA followed by Tukey's post-test).

### 3.2 MaR2 reduces the inflammatory infiltrate, the detachment of the muscular and submucosal layers, and the destruction of the goblet cells.

After 18 hours of induction, the animals were euthanized and colon samples were collected, processed for histology and stained with hematoxylin and eosin. The analysis of histological parameters (**Fig. 2A**) (crypt atrophy, destruction of goblet cells, separation of muscle and mucosa layers, and inflammatory infiltrate – **Fig. 2B, C and D**) was performed using a score that considered increasing levels from 0 to 3, where 0 means no change and 3 for severe alteration, in which case it may be a significant degree of crypt atrophy, decrease in the number of goblet cells, and even an increase in the inflammatory infiltrate that damage the tissue. The 3ng dose of MaR-2 was able to reduce the intense inflammatory infiltrate, as well as the distance between the muscle and mucosa layers, and the destruction of goblet cells. It also promoted the rehabilitation of crypts that had been atrophied by acetic acid.

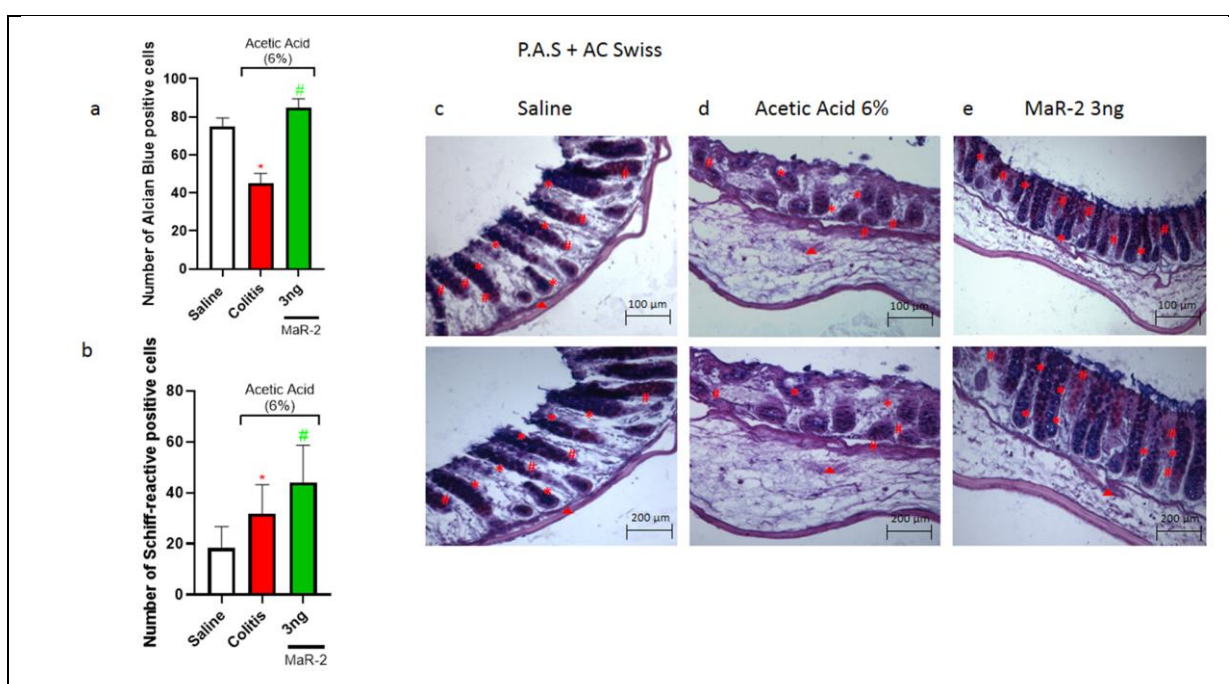


**Figure 2: MaR2 reduces the inflammatory infiltrate, the detachment of the muscular and submucosal layers, and the destruction of the goblet cells.**

Colon samples stained with hematoxylin and eosin for visualization of histological components. Panel (**Fig. 2A**): analysis of histological components. Panel (**Fig. 2B**) colon samples from animals in the saline group. Panel (**Fig. 2C**) colon of animals from the colitis group – induced with acetic acid. Panel (**Fig. 2D**) colon of animals from the group treated with 3 ng of MaR2. The arrow represents the inflammatory infiltrate, the arrowhead represents the destruction of goblet cells and the asterisk represents the separation of the muscular and mucous layer. Results are expressed as mean ± SEM, n = 6 mice per group per experimente. \* p < 0.05 compared to the saline group, # p < 0.05 compared to colitis group and MaR2 treated group. (Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post-test).

### 3.3 MaR2 decreases the destruction of acidic and basic mucin-producing goblet cells. O QUE O PAS TA CORANDO? O QUE VC VE NA REAÇÃO

After 18 hours of induction, the animals were euthanized and colon samples were collected, processed for histology and stained with schiff reagent (PAS) and counterstained with alcian blue (AB) (Fig. 3C, D and E). MaR-2 was able to reduce the destruction of acid mucin-producing goblet cells visualized by PAS (Fig. 3B) and basic staining visualized by AB staining (Fig. 3A), with greater preservation of basic mucin-producing cells, in addition to preserving tissue architecture, reducing distance of the muscular and mucosal layers. Confirming the evaluation of histological parameters, it was also possible to observe a decrease in crypt atrophy and intense inflammatory infiltrate.



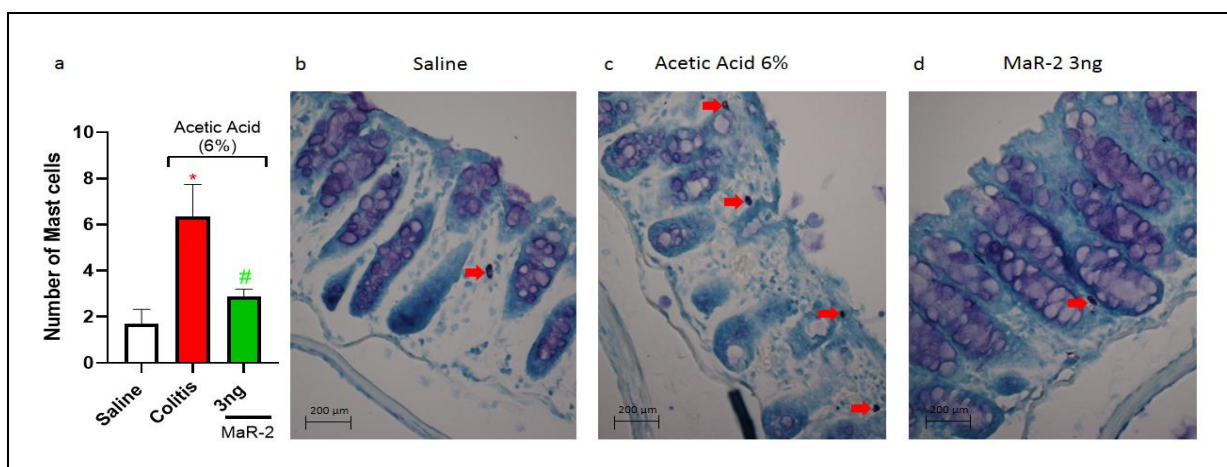
#### Figure 3: MaR2 decreases the destruction of acidic and basic mucin-producing goblet cells

Colon samples stained by Schiff reagent (PAS) and alcian blue (AB) to identify acid and basic mucin-producing goblet cells. Panel (Fig. 3A): number of AB positive cells. Panel (Fig. 3B): number of PAS positive cells. Panel (Fig. 3C) colon samples from animals in the saline group. Panel (Fig. 3D) colon of animals from the colitis group – induced with acetic acid. Panel (Fig. 3E) colon of animals from the group treated with MaR2 3ng. The asterisk represents AB positive goblet cells, and the hash represents PAS positive goblet cells. The results were presented as a mean  $\pm$  standard error (SEM) of 6 mice per experimental group. \*  $p < 0.05$  compared to the saline group, #  $p < 0.05$  compared to colitis group and MaR2 treated group. (Two-way ANOVA followed by Tukey's post-test).

### 3.4 MaR2 reduces the amount of mast cells recruited to the tissue. COMO VC AVALIAR?

MaR2 promoted a decrease in mast cells recruited to the inflamed colonic tissue in the treated group compared to the acetic acid-induced colitis group (Fig. 4a). It was

also observed that the treatment of MaR2 managed to preserve a part of the cellular structure of the mast cell, whereas a large amount of granules was not visualized in the colonic tissue of the treated group.

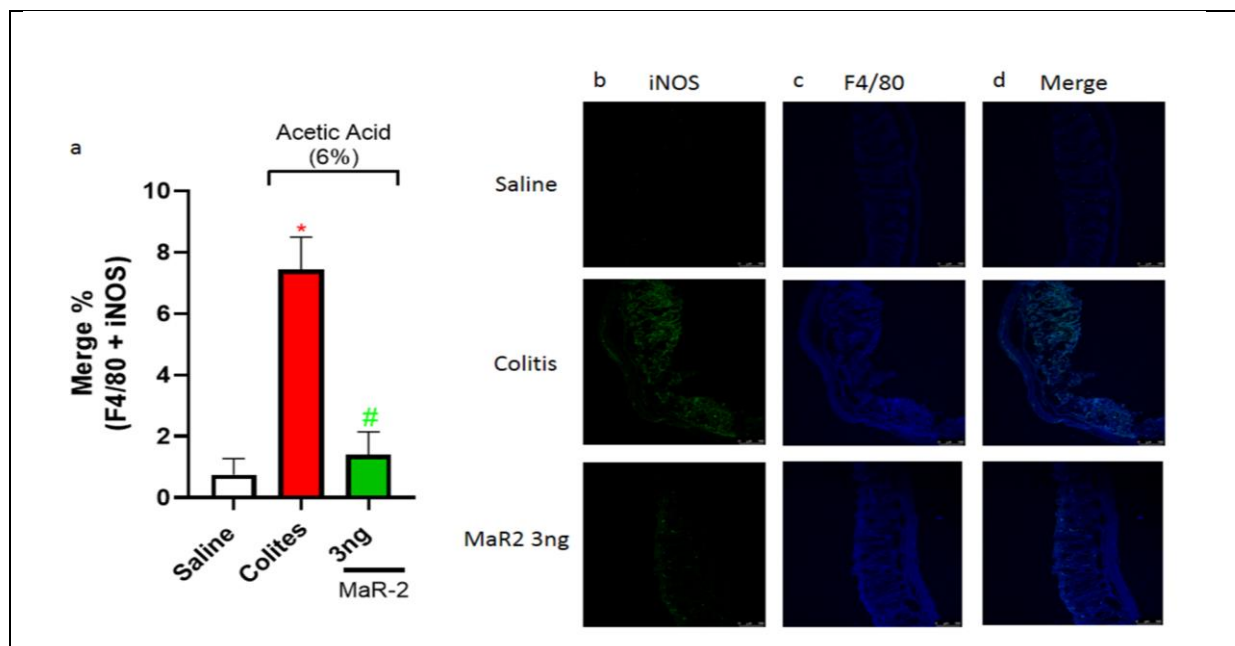


**Figure 4: MaR2 reduces the amount of mast cells recruited to the tissue.**

Colon samples stained with toluidine blue. Panel (**Fig. 4A**): number of mast cells recruited to the tissue. Panel (**Fig. 4B**): colon sample from animals in the saline group. Panel (**Fig. 4C**) colon of animals in the colitis group – induced with acetic acid. Panel (**Fig. 4D**) Colon of animals from the 3ng MaR2 treated group. The arrow indicates mast cells recruited to injured tissue. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM,  $n = 6$  animals per group per experiment, \*  $p < 0.05$  compared to the saline group, #  $p < 0.05$  compared to colitis group and MaR-2 treated group. (One-way Anova followed by the Tukey post-test).

### 3.5 MaR2 reduces the number of macrophages producing inducible nitric oxide synthase

After 18 hours of induction, the animals were euthanized, and the collected samples were processed for immunofluorescence. Through immunostaining with the monoclonal antibody F4/80 (**Fig. 5B**) it was possible to visualize the macrophages recruited to the colonic tissue. To understand the macrophage population, a combined immunostaining was performed that demonstrated the placement between cells immunostained by F4/80 and those stained by specific antibody for inducible nitric oxide synthase (iNOS) (**Fig. 5B**). In this way, it was possible to observe which of these macrophages were iNOS producers (**Fig. 5D**). MaR-2 reduced the amount of iNOS-producing macrophages recruited to the injured tissue (**Fig. 5A**). **A TEM QUE VIR PRIMEIRO**

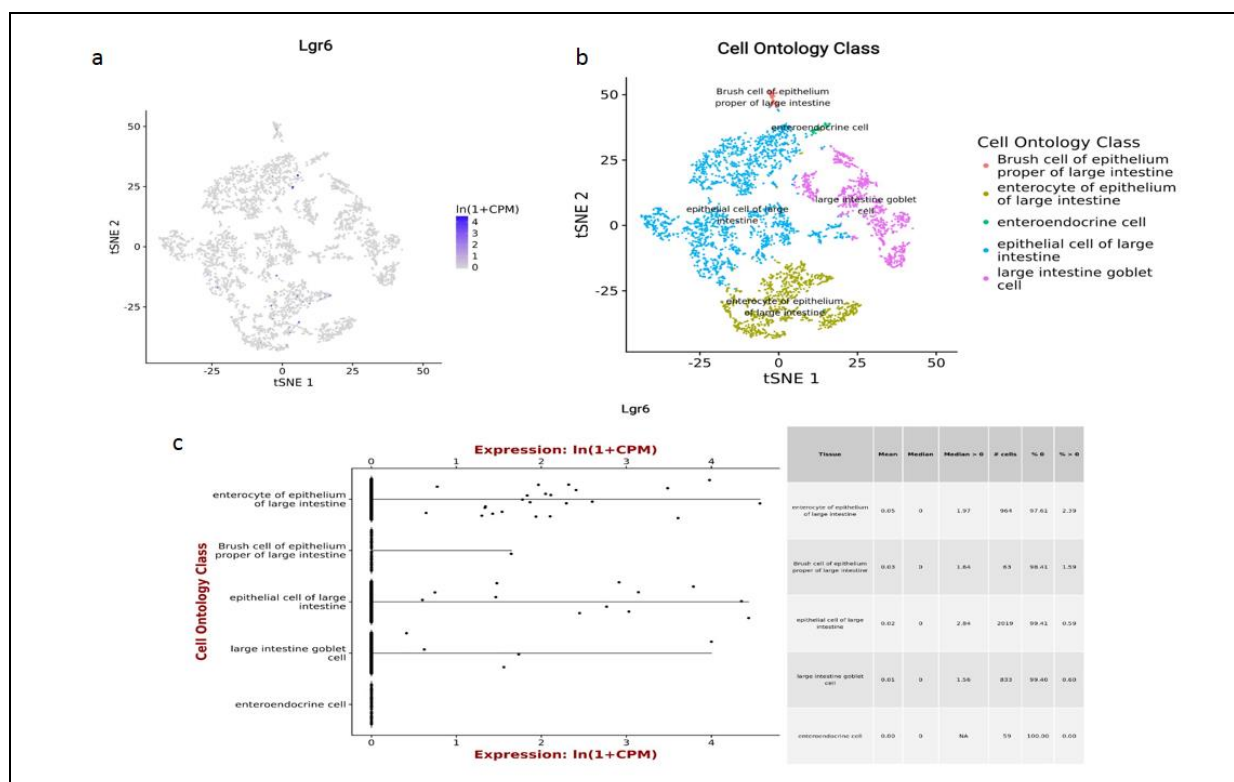


**Figure 5: MaR2 reduces the number of macrophages producing inducible nitric oxide synthase**

Panel (**Fig. 5A**): percentage of macrophages producing inducible nitric oxide synthase (iNOS). Panel (**Fig. 5B**): immunostaining for inducible nitric oxide synthase. Panel (**Fig. 5C**): F4/80 immunostaining for macrophages. Panel (**Fig. 5D**): colocalization of F4/80-labeled macrophages and iNOS producers. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM, n = 6 animals per group per experiment, \* p < 0.05 compared to the saline group, # p < 0.05 compared to colitis group and MaR-2 treated group. (Oneway Anova followed by the Tukey post-test).

### 3.6 There is expression of the mRNA of the receptor for MaR1 in the intestinal epithelium

The LgR6 (receptor for MaR1) mRNA expression demonstrates the possibility of interaction of this SPM with the intestinal epithelium. This suggests the possibility of a beneficial interaction of MaR2 in this tissue.



**Figure 6: There is expression of the mRNA of the receptor for MaR1 in the intestinal epithelium**

Panel (Fig. 6A): represents the distribution of LgR6 receptor mRNA expression in the intestinal epithelium. Panel (Fig. 6B): Demonstrates the cell ontology class distribution in intestinal tissue. Panel (Fig. 6C): Demonstrates disruption of LgR6 receptor mRNA expression in different intestinal cell types. Data obtained through Single cell RNA sequencing (scRNA-seq) analysis.

#### 4. Discussion

In this work we demonstrate the analgesic and anti-inflammatory effect of MaR2 in the model of acetic acid-induced colitis. The analgesic effect was observed through the reduction of visceral mechanical hyperalgesia, while the anti-inflammatory effect was observed through the reduction of MPO activity, the reduction of histological alterations such as the reduction of organ shortening, reduction of the inflammatory infiltrate, reduction of destruction of goblet cells, reduction of crypt atrophy and detachment of the muscular and mucosal layers, decrease in the recruitment of mast cells to the injured tissue, observed by means of macroscopic and microscopic scores, and also the reduction in the amount of nitric oxide synthase-producing macrophages indubitable.

Inflammatory bowel disease (IBD) is responsible for several extra-intestinal symptoms such as bloody diarrhea, fever and abdominal pain, which reduces the quality of life of patients, and in most cases is disabling [4]. There are usually severe manifestations in the acute phase of the disease and a reduction in signs and symptoms in the remission phase [4, 6, 27].

One of the most common histological findings seen in patients with ulcerative

colitis is the intense inflammatory infiltrate in the mucosal layer, which contributes to tissue damage and intestinal barrier dysfunction [28]. Several studies demonstrate that tissue damage and inflammatory signs in DSS-induced colitis are mediated primarily by PMN infiltration [29, 30]. Neutrophils are components of this inflammatory infiltrate, cells that have azurophilic granules where a large amount of the MPO enzyme is present, which contributes to tissue damage [31, 32]. MPO may be used as an indicator of inflammation since its activity is directly related to the amount of neutrophils in the tissue [33].

Our data corroborate these studies, demonstrating the anti-inflammatory effect of MaR2 through the reduction of MPO activity and inflammatory infiltrate, corroborating with data from our research group not published yet that demonstrate the reduction of inflammatory infiltrate in acute inflammation in the potassium superoxide ( $KO_2$ ) model. Marcon et al (2013) [34] in relation to Mar1 demonstrated the same in the DSS-induced colitis model.

Regarding to characteristics symptom of IBD, abdominal pain, which is responsible for the need for clinical intervention in 70% of cases [34, 35]. Inflammatory mediators such as IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-33 may be responsible for inducing inflammatory pain [36, 37, 38, 39], as well as the production of reactive oxygen species such as iNOS [40, 41, 42, 43]. MaR2 was able to reduce visceral mechanical hyperalgesia as well as the iNOS-producing macrophage population, demonstrating once again its analgesic and anti-inflammatory capacity.

In addition to the inflammatory infiltrate, UC is responsible for extensive and transmural mucosal damage, in addition to the destruction of goblet cells and consequently decreased mucus production, as well as crypt atrophy [44]. Intrarectal acetic acid administration promotes extensive and severe inflammation promoting organ shortening [25, 45]. We demonstrated that treatment with MaR-2 promotes a decrease in the crypt atrophy process, as well as a decrease in goblet cell destruction, aiding in the physiological function of this cell, mucus production, mainly through basic mucin, which can be an attempt to balance the pH of the medium.

On the other hand, mast cells are commonly present in the intestine, but in small amounts [46]. Mast cells have granules containing mediators such as histamine, and proteases, such as tryptases and chymases, promoting an immediate response, being able to synthesize and release lipid mediators, such as prostaglandins and leukotrienes, within 1 to 2 hours after activation. This is linked to the diversity of mechanisms in which mast cells are involved, such as epithelial secretion and permeability, recruitment and activation of immune cells, vascular permeability, and neuroimmune interaction altering peristalsis and pain [47].

The diffuse mucosal inflammation that characterizes ulcerative colitis is associated with mucus loss together with massive blood loss from the rectum. At the tissue level, there is a reduction in the mucus inside the theca of goblet cells. It is likely that inflammatory mediators are enhancing secretion over mature product storing [48].

We used alcian blue stain, prepared at the acid pH of 2.5, to identify acidic mucopolysaccharides and acetic mucins, and the PAS stain, which is used mainly for staining structures that contain a high proportion of carbohydrates, such as glycogen, glycoproteins and proteoglycans, usually found in connective tissues, mucus and basement membranes. Thus, it was possible to quantify the goblet cells

responsible for each type of mucin production. MaR2 was able to reverse the degradation of acid and basic mucin-producing goblet cells, demonstrating an attempt to maintain the intestinal epithelial barrier.

The expression of LgR6 receptor mRNA in cells in the intestine demonstrates the possibility of action of MaR1 together with its receptor in this tissue. Thus, it is expected that the same will happen with MaR2, which reinforces the interaction of this SPM with the tissue.

Our data showed a reduction in the amount of mast cells in the injured colonic tissue when treated with MaR2, suggesting the analgesic and anti-inflammatory capacity of this molecule. However, the technique applied for mast fixation in our study is limited, once we used PFA 4% for fixation followed by toluidine blue for staining and, apparently, the use of derived-aldehyde for fixation could result in a weak mucosal mast cells coloring [48].

## 5. Conclusion

The results of the present work demonstrate the great potential of MaR-2 as a therapeutic target in the model of acute inflammation caused by acetic acid-induced colitis. MaR-2 reduced the painful behavior of the disease, as well as the products of the inflammatory process. Demonstrating the beneficial effect of using MaR-2 in inflammatory conditions.

## 6. Referenses

- [1]. MOLODECKY, N. A. et al. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *GI*, 2012, 142 (1), 46-54. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.10.001>
- [2]. BIASI, Fiorella et al. Inflammatory bowel disease: mechanisms, redox considerations, and therapeutic targets. *ARS*, 2013, 19 (14), 1711-1747. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4530>
- [3]. BAUMGART, Daniel C.; SANDBORN, William J. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Lancet*, 2007, 369, (9573), 1641-1657. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)60751-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60751-X)
- [4]. NEURATH, 2014 - NEURATH, Markus F. Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nat. Rev. Immunol.*, 2014, 14 (5), 329-342. <https://doi.org/10.1038/nri3661>
- [5]. MOLODECKY; GILAAD and KAPLAN, et al., 2010 - MOLODECKY, Natalie A.; KAPLAN, Gilaad G. Environmental risk factors for inflammatory bowel disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, 2010, 6 (5), 339. [PMID: 20567592](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20567592/)
- [6]. DE LANGE and BARRETT, 2015 - DE LANGE, Katrina M.; BARRETT, Jeffrey C. Understanding inflammatory bowel disease via immunogenetics. *J. Autoimmun.*, 2015, 64, 91-100. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2015.07.013>
- [7]. PAVLICK, Kevin P. et al. Role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen in inflammatory bowel disease. *Free Radic. Biol. Med.*, 2002, 33 (3), 311-322. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(02\)00853-5](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(02)00853-5)
- [8]. KARP, Sean M.; KOCH, Timothy R. Oxidative stress and antioxidants in inflammatory bowel disease. *Dis Mon*, 2006, 52 (5), 199-207. <https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2006.05.005>
- [9]. MCALINDON, HAWKEY and MAHIDA, 1998 - MCALINDON, M. E.; HAWKEY, C.

- J.; MAHIDA, Y. R. Expression of interleukin 1 $\beta$  and interleukin 1 $\beta$  converting enzyme by intestinal macrophages in health and inflammatory bowel disease. *Gut*, 1998, 42 (2), 214-219. <https://doi.org/10.1136/gut.42.2.214>
- [10]. BELTRÁN, Caroll J. et al. Characterization of the novel ST2/IL-33 system in patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.*, 2010, 16, (7), 1097-1107. <https://doi.org/10.1002/ibd.21175>
- [11]. ATREYA, Raja et al. Antibodies against tumor necrosis factor (TNF) induce T-cell apoptosis in patients with inflammatory bowel diseases via TNF receptor 2 and intestinal CD14<sup>+</sup> macrophages. *GI*, 2011, 141 (6), p. 2026-2038. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.08.032>
- [12]. LEE, Cheng Hiang et al. Novel de novo mutations of the interleukin-10 receptor gene lead to infantile onset inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis*, 2014, 8 (11), 1551-1556. <https://doi.org/10.1016/j.crohns.2014.04.004>
- [13]. RUFO, Paul A.; BOUSVAROS, Athos. Current therapy of inflammatory bowel disease in children. *Paediatr. Drugs*, 2006, 8 (5), 279-302. <https://doi.org/10.2165/00148581-200608050-00002>
- [14]. RANI, Reena et al. TGF- $\beta$  limits IL-33 production and promotes the resolution of colitis through regulation of macrophage function. *Eur. J. Immunol.* 2011, 41 (7), 2000-2009. <https://doi.org/10.1002/eji.201041135>
- [15]. Heazlewood CK, Cook MC, Eri R, et al. Aberrant mucin assembly in mice causes endoplasmic reticulum stress and spontaneous inflammation resembling ulcerative colitis. *PLoS Med.* 2008; (5), 54. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0050054>
- [16]. HALME, Leena et al. Family and twin studies in inflammatory bowel disease. *World journal of gastroenterology: WJG*, 2006, 12 (23), 3668. <https://doi.org/10.3748/wjg.v12.i23.3668>
- [17]. MOLLER, Frederik Trier et al. Familial risk of inflammatory bowel disease: a population-based cohort study 1977–2011. *Am. J. Gastroenterol. | ACG*, 2015, 110 (4), 564-571. <https://doi.org/10.1038/ajg.2015.50>
- [18]. BERNSTEIN, Charles N. et al. A population-based case control study of potential risk factors for IBD. *Am. J. Gastroenterol. | ACG*, 2006, 101 (5), 993-1002. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2006.00381.x>
- [19]. ANANTHAKRISHNAN AN. Epidemiology and risk factors for IBD. *Nature Review Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, 2015, 12, 205–17. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2015.34>
- [20]. Peyrin-Biroulet L, Sandborn W, Sands BE, et al. Selecting Therapeutic Targets in Inflammatory Bowel Disease (STRIDE): determining therapeutic goals for treat-to-target. *Am J Gastroenterol.* 2015; 110:1324–38. <https://doi.org/10.1038/ajg.2015.233>
- [21]. Ungaro R, Bernstein CN, Geary R, et al. Antibiotics associated with increased risk of new-onset Crohn's disease but not ulcerative colitis: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol.* 2014; 109:1728–38. <https://doi.org/10.1038/ajg.2014.246>
- [22]. MAGRO, Fernando et al. Review of the disease course among adult ulcerative colitis population-based longitudinal cohorts. *Inflamm. Bowel Dis.*, 2012, 18 (3), 573-583. <https://doi.org/10.1002/ibd.21815>
- [23]. DALLI, J. et al. The novel 13S,14S-epoxy-maresin is converted by human macrophages to maresin 1 (MaR1), inhibits leukotriene A4 hydrolase (LTA4H), and shifts macrophage phenotype. *FASEB J*, 2013, 27 (7), 2573–2583. <https://doi.org/10.1096/fj.13-227728>
- [24]. DENG, B. et al. Maresin biosynthesis and identification of maresin 2, a new anti-inflammatory and pro-resolving mediator from human macrophages. *PLoS ONE*,

- 2014, 9 (7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102362>
- [25]. GUAZELLI, Carla FS et al. Quercetin-loaded microcapsules ameliorate experimental colitis in mice by anti-inflammatory and antioxidant mechanisms. *J. Nat. Prod.*, 2013, 76 (2), 200-208. <https://doi.org/10.1021/np300670w>
- [26]. COLOMBO, Bárbara B. et al. Vinpocetine ameliorates acetic acid-induced colitis by inhibiting NF- $\kappa$ B activation in mice. *INF*, 2018, 41 (4), 1276-1289. <https://doi.org/10.1007/s10753-018-0776-9>
- [27]. BERNSTEIN, Charles N. et al. World Gastroenterology Organization Practice Guidelines for the diagnosis and management of IBD in 2010. *Inflamm. Bowel Dis.*, 2010, 16 (1), 112-124. <https://doi.org/10.1002/ibd.21048>
- [28]. HIGA, A.; ETO, T.; NAWA, Y. Evaluation of the role of neutrophils in the pathogenesis of acetic acid-induced colitis in mice. *Scand. J. Gastroenterol. Suppl.*, 1997, 32 (6), 564-568. <https://doi.org/10.3109/00365529709025100>
- [29]. Stevceva, L., P. Pavli, A. J. Husband, and W. F. Doe. The inflammatory infiltrate in the acute stage of the dextran sulphate sodium induced colitis: B cell response differs depending on the percentage of DSS used to induce it. *BMC Clin. Pathol.* 2001, 1: 3. <https://doi.org/10.1186/1472-6890-1-3>
- [30]. Dieleman, L. A., B. U. Ridwan, G. S. Tennyson, K. W. Beagley, R. P. Bucy, and C. O. Elson. Dextran sulfate sodium-induced colitis occurs in severe combined immunodeficient mice. *GI* 1994, 107: 1643–1652. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(94\)90803-6](https://doi.org/10.1016/0016-5085(94)90803-6)
- [31]NAITO, Yuji; TAKAGI, Tomohisa; YOSHIKAWA, Toshikazu. Molecular fingerprints of neutrophil-dependent oxidative stress in inflammatory bowel disease. *J. Gastroenterol.*, 2007, 42 (10), 787-798. <https://doi.org/10.1007/s00535-007-2096-y>
- [32]. KLEBANOFF, Seymour J. Myeloperoxidase: friend and foe. *J. Leukoc. Biol.*, 2005, 77 (5), 598-625. <https://doi.org/10.1189/jlb.1204697>
- [33]. KRAWISZ, J. E.; SHARON, P.; STENSON, W. F. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity: assessment of inflammation in rat and hamster models. *GI*, 1984, 87 (6), 1344-1350. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(84\)90202-6](https://doi.org/10.1016/0016-5085(84)90202-6)
- [34]. AGHAZADEH, Rahim et al. Inflammatory bowel disease in Iran: a review of 457 cases. *J Gastroenterol Hepatol*, 2005, 20 (11), 1691-1695. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2005.03905.x>
- [35]. WAGTMANS, M. J. et al. Crohn's disease in the elderly: a comparison with young adults. *J. Clin. Gastroenterol.*, 1998, 27 (2), 129-133. <https://doi.org/10.1097/00004836-199809000-00005>
- [36]. MARCON, Rodrigo et al. Maresin 1, a proresolving lipid mediator derived from omega-3 polyunsaturated fatty acids, exerts protective actions in murine models of colitis. *J. Immunol.*, v. 191, n. 8, p. 4288-4298, 2013. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202743>
- [37]. RW, Jin X. Gereau. 4th. Acute p38-mediated modulation of tetrodotoxin-resistant sodium channels in mouse sensory neurons by tumor necrosis factor-alpha. *J Neurosci*, 2006, 26, 246-255. [PMC6674296](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/166674296/)
- [38]. WRIGHT, A. Recent concepts in the neurophysiology of pain. *Man. Ther.*, 1999, 4 (4), 196-202. <https://doi.org/10.1054/math.1999.0207>
- [39]. Zarpelon, A.C., T.M. Cunha, J.C. Alves-Filho, L.G. Pinto, S.H. Ferreira, D. Xu I B McInnes, F.Y. Liew, F.Q. Cunha, and W.A. Verri. 2013. IL-33/ST2 signalling contributes to carrageenin-induced innate inflammation and inflammatory pain: Role of cytokines, endothelin-1 and prostaglandin E2. *Br. J. Pharmacol.* 169: 90–101. <https://doi.org/10.1111/bph.12110>.

- [40]. Ma, Fei, Liping Zhang, and Karin N. Westlund. 2009. Reactive oxygen species mediate TNFR1 increase after TRPV1 activation in mouse DRG neurons. *Mol. Pain* 5: 31. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-5-31>.
- [41]. Salvemini, Daniela, Joshua W. Little, Timothy Doyle, and William L. Neumann. 2011. Roles of reactive oxygen and nitrogen species in pain. *Free Radic. Biol. Med* 51: 951–966. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.01.026>.
- [42]. Wang, Zq, Frank Porreca, and Salvatore Cuzzocrea. 2004. A newly identified role for superoxide in inflammatory pain. *J. Pharmacol. Exp. Ther* 309: 869–878. <https://doi.org/10.1124/jpet.103.064154.increased>.
- [43]. Maioli, N.A., A.C. Zarpelon, S.S. Mizokami, C. Calixto-Campos, C.F.S. Guazelli, M.S.N. Hohmann, F.A. Pinho-Ribeiro, T.T. Carvalho, M.F. Manchope, C.R. Ferraz, R. Casagrande, and W.A. Verri Jr. 2015. The superoxide anion donor, potassium superoxide, induces pain and inflammation in mice through production of reactive oxygen species and cyclooxygenase-2. *Braz. J. Med. Biol.* 48: 321–331. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20144187>.
- [44]. Ungaro, R., et al., Ulcerative colitis. *Lancet*, 2017. 389(10080): p. 1756-1770. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)32126-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32126-2).
- [45]. Belem, M.O., et al., Light-emitting diodes at 940nm attenuate colitis-induced inflammatory process in mice. *J Photochem Photobiol B*, 2016. 162: p. 367-373. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.07.008>
- [46]. Rogler, G., Where are we heading to in pharmacological IBD therapy? *Pharmacol Res*, 2015. 100: p. 220-7. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2015.07.005>
- [47]. Martin, D.A. and B.W. Bolling, A review of the efficacy of dietary polyphenols in experimental models of inflammatory bowel diseases. *Food Funct*, 2015. 6(6): p. 1773-86. <https://doi.org/10.1039/c5fo00202h>
- [48]. J. R. Jass, M. D. Walsh. Altered mucin expression in the gastrointestinal tract: a review. *J.Cell.Mol.Med.* Vol 5, No 3, 2001 pp.327-351 <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2001.tb00169.x>
- [49]. I.P. Grigorev, D.E. Korzhevskii. Modern Imaging Technologies of Mast Cells for Biology and Medicine (Review). *CTM*, 2021. vol. 13, No.4 <https://doi.org/10.17691/stm2021.13.4.10>

## CONCLUSÃO

A dor articular, bem como a dor inflamatória ativam processos que envolvem mecanismos centrais e periféricos, e a inflamação local pode ainda se agravar com o recrutamento de células, e a modulação inflamatória por meio da produção de mediadores, como aminas vasoativas, interleucinas e quimiocinas agravam ainda mais o caso.

Tendo essa questão em vista, os SPMs se fazem uma excelente alternativa terapêutica, pois possuem a capacidade de trabalhar de maneira analgésica e anti-inflamatória de modo central e periférico, diminuindo o recrutamento de leucócitos para o local da lesão, a hiperalgesia mecânica e térmica, e danos histopatológicos como a degradação da cartilagem no caso do modelo de artrite induzido por dióxido de titânio, ou como a diminuição da atrofia da camada da mucosa, e destruição das células caliciformes recuperando a função de produção de muco, tanto ácido, quanto básico, no modelo de colite induzida por ácido acético.

Deste modo, as maresinas 1 e 2 se mostram com uma potente alternativa terapêutica no caso da artrite induzida por dióxido de titânio, ou no caso da colite induzida pelo ácido acético.

Portanto, podemos dizer, que essa classe de SPMs possui a capacidade de modular a resposta inflamatória induzindo a resolução da inflamação, promovendo uma redução da dor articular e dor inflamatória.

## REFERÊNCIAS

ABDULKHALEQ, L. A. et al. The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation: A review. **Veterinary world**, v. 11, n. 5, p. 627, 2018.

ABDULNOUR, R. E. et al. Maresin 1 biosynthesis during platelet-neutrophil interactions is organ-protective. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 111, 16526–16531, 2014.

ALMEIDA, Tainá Paixão et al. Classificação dos processos dolorosos em medicina veterinária–revisão de literatura. **Veterinária em Foco**, v. 3, n. 2, p. 107-118, 2006.

AICH, Anupam; AFRIN, Lawrence B.; GUPTA, Kalpna. Mast cell-mediated mechanisms of nociception. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 12, p. 29069-29092, 2015.

AKIRA, Shizuo; TAKEDA, Kiyoshi. Toll-like receptor signalling. **Nature reviews immunology**, v. 4, n. 7, p. 499-511, 2004.

AL-REJAIE, Salim S. et al. Protective effect of naringenin on acetic acid-induced ulcerative colitis in rats. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 19, n. 34, p. 5633, 2013.

ANANTHAKRISHNAN, Ashwin N. et al. Aspirin, nonsteroidal anti-inflammatory drug use, and risk for Crohn disease and ulcerative colitis: a cohort study. **Annals of internal medicine**, v. 156, n. 5, p. 350-359, 2012.

ANANTHAKRISHNAN AN. Epidemiology and risk factors for IBD. **Nature Review Gastroenterology Hepatology**, v. 12, p. 205–17, 2015.

ANANTHAKRISHNAN AN, MCGINLEY EL, BINION DG. Excess hospitalisation burden associated with *Clostridium difficile* in patients with inflammatory bowel disease. **Gut**, v. 57, p. 205–10, 2008.

ARITA, Makoto et al. Resolvin E1, an endogenous lipid mediator derived from omega-3 eicosapentaenoic acid, protects against 2, 4, 6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 21, p. 7671-7676, 2005.

AZEVEDO, Luís Filipe et al. Epidemiology of chronic pain: a population-based nationwide study on its prevalence, characteristics and associated disability in Portugal. **The journal of pain**, v. 13, n. 8, p. 773-783, 2012.

BAISCH, Brittany L. et al. Equivalent titanium dioxide nanoparticle deposition by intratracheal instillation and whole body inhalation: the effect of dose rate on acute respiratory tract inflammation. **Particle and fibre toxicology**, v. 11, n. 1, p. 1-16, 2014.

BALLANTYNE, Jane C. et al. Pharmacological management of neuropathic pain.

**Pain: Clinical Updates, 2010.**

BAUMGART, Daniel C.; SANDBORN, William J. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. **The Lancet**, v. 369, n. 9573, p. 1641-1657, 2007.

BEAUGERIE, Laurent et al. Impact of cessation of smoking on the course of ulcerative colitis. **The American journal of gastroenterology**, v. 96, n. 7, p. 2113-2116, 2001.

BERNSTEIN, Charles N. et al. A population-based case control study of potential risk factors for IBD. **Official journal of the American College of Gastroenterology ACG**, v. 101, n. 5, p. 993-1002, 2006.

BIRRENBACH, Tanja; BÖCKER, Ulrich. Inflammatory bowel disease and smoking: a review of epidemiology, pathophysiology, and therapeutic implications. **Inflammatory bowel diseases**, v. 10, n. 6, p. 848-859, 2004.

BITIREN, Muharrem et al. Protective effects of selenium and vitamin E combination on experimental colitis in blood plasma and colon of rats. **Biological trace element research**, v. 136, n. 1, p. 87-95, 2010.

BRAIN, S. D.; WILLIAMS, T. J. Interactions between the tachykinins and calcitonin gene-related peptide lead to the modulation of oedema formation and blood flow in rat skin. **British journal of pharmacology**, v. 97, n. 1, p. 77-82, 1989.

BARON, Ralf; BINDER, Andreas; WASNER, Gunnar. Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment. **The Lancet Neurology**, v. 9, n. 8, p. 807-819, 2010.

BARROT, Michel. Tests and models of nociception and pain in rodents. **Neuroscience**, v. 211, p. 39-50, 2012.

BASBAUM, Allan I. et al. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 267-284, 2009.

BERSELLINI FARINOTTI, Alex et al. Cartilage-binding antibodies induce pain through immune complex-mediated activation of neurons. **Journal of Experimental Medicine**, v. 216, n. 8, p. 1904-1924, 2019.

BORGHI, Sergio M. et al. The flavonoid quercetin inhibits titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>)-induced chronic arthritis in mice. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 53, p. 81-95, 2018.

BREIVIK, Harald et al. Survey of chronic pain in Europe: prevalence, impact on daily life, and treatment. **European journal of pain**, v. 10, n. 4, p. 287-333, 2006.

BUCKLEY CD, et al. the resolution of inflammation. **Nature Review Immunology**, v. 13, p. 59-66, 2013.

BUONOCORE, Sofia et al. Innate lymphoid cells drive interleukin-23-dependent innate intestinal pathology. **Nature**, v. 464, n. 7293, p. 1371-1375, 2010.

BURNSTOCK, Geoffrey. Purinergic receptors and pain. **Current pharmaceutical design**, v. 15, n. 15, p. 1717-1735, 2009.

CALVO, Margarita et al. Neuregulin-ErbB signaling promotes microglial proliferation and chemotaxis contributing to microgliosis and pain after peripheral nerve injury. **Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 15, p. 5437-5450, 2010.

CARVALHO, Carla CCR de; CARAMUJO, Maria José. The various roles of fatty acids. **Molecules**, v. 23, n. 10, p. 2583, 2018.

CASTRO-LOPES, J.; ROMÃO, P.; PAIVA, M. M. A Dor Crónica em Portugal [Chronic Pain in Portugal]. **Pain Proposal**, p. 1-12, 2010.

CEZAR, Talita LC et al. Treatment with maresin 1, a docosahexaenoic acid-derived pro-resolution lipid, protects skin from inflammation and oxidative stress caused by UVB irradiation. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-14, 2019.

CHATTERJEA, Devavani; MARTINOV, Tijana. Mast cells: versatile gatekeepers of pain. **Molecular Immunology**, v. 63, n. 1, p. 38-44, 2015.

CHEN, Jinyuan et al. In vivo acute toxicity of titanium dioxide nanoparticles to mice after intraperitoneal injection. **Journal of applied toxicology**, v. 29, n. 4, p. 330-337, 2009.

CHERUBINO, Paolo et al. The management of chronic pain in important patient subgroups. **Clinical drug investigation**, v. 32, n. 1, p. 35-44, 2012.

CHIANG, N. et al. Infection regulates pro-resolving mediators that lower antibiotic requirements. **Nature** 484, 524–528, 2012.

CHIU, Isaac M.; VON HEHN, Christian A.; WOOLF, Clifford J. Neurogenic inflammation and the peripheral nervous system in host defense and immunopathology. **Nature neuroscience**, v. 15, n. 8, p. 1063-1067, 2012.

CHIU, Isaac M. et al. Bacteria activate sensory neurons that modulate pain and inflammation. **Nature**, v. 501, n. 7465, p. 52-57, 2013.

CHU, Coco; ARTIS, David; CHIU, Isaac M. Neuro-immune interactions in the tissues. **Immunity**, v. 52, n. 3, p. 464-474, 2020.

CLOSA, Daniel; FOLCH-PUY, Emma. Oxygen free radicals and the systemic inflammatory response. **IUBMB life**, v. 56, n. 4, p. 185-191, 2004.

COBELLI Neil, et al. Mediators of the inflammatory response to joint replacement devices. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 7, p. 600-8, 2011.

COLOMBO, Bárbara B. et al. Vinyocetina ameliora a colite induzida por ácido acético em camundongos por inibição da ativação do NF- $\kappa$ B. **Inflammation**, v. 41, n. 4, p. 1276-1289, 2018.

COLOMBO, Bárbara B. et al. Vinpocetine ameliorates acetic acid-induced colitis by inhibiting NF- $\kappa$ B activation in mice. **Inflammation**, v. 41, n. 4, p. 1276-1289, 2018.

CORNISH, Julie A. et al. The risk of oral contraceptives in the etiology of inflammatory bowel disease: a meta-analysis. **Official journal of the American College of Gastroenterology| ACG**, v. 103, n. 9, p. 2394-2400, 2008.

CORRIGAN, Frances et al. Neurogenic inflammation after traumatic brain injury and its potentiation of classical inflammation. **Journal of neuroinflammation**, v. 13, n. 1, p. 1-12, 2016.

Corr M. The tolls of arthritis. **Arthritis & Rheumatology**. v.52, n.8, p. 2233-6, 2005.

CUMPSTEY, A.; FEELISCH, M. Free Radicals in Inflammation. **Inflammation**, p. 695-726, 2017/12/11 2017.

CUNHA, T. M.; VERRI, W. A.; SILVA, J. S.; POOLE, S. *et al.* A cascade of cytokines 1 mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 102, n. 5, p. 1755-1760, 2005.

CUNHA, Thiago M. et al. Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception. **Journal of leukocyte biology**, v. 83, n. 4, p. 824-832, 2008.

DALLI, J. et al. The novel 13S,14S-epoxy-maresin is converted by human macrophages to maresin 1 (MaR1), inhibits leukotriene A4 hydrolase (LTA4H), and shifts macrophage phenotype. **FASEB J**, v. 27, n. 7, p. 2573–2583, 2013.

DANESHMAND, Ali et al. Protective effects of lithium on acetic acid-induced colitis in rats. **Digestive diseases and sciences**, v. 54, n. 9, p. 1901-1907, 2009.

DENG, B. et al. Maresin biosynthesis and identification of maresin 2, a new anti-inflammatory and pro-resolving mediator from human macrophages. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, 2014.

DIGNASS, Axel et al. Second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis part 1: definitions and diagnosis. **Journal of Crohn's and Colitis**, v. 6, n. 10, p. 965-990, 2012.

Direcção-Geral da Saúde. Plano Nacional de Luta Contra a Dor. Saúde D-G da, editor, p.1-60, 2001.

Direcção-Geral da Saúde. Programa Nacional de Controlo da Dor. 2008.

DREWES, A.M. The physiology of pain. **Ugeskrift for Laeger**, v.168, n. 20, p. 1941-1943, 2006.

DRÖGE, Wulf. Free radicals in the physiological control of cell function.

**Physiological reviews**, 2002.

DUBIN, Adrienne E. et al. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. **The Journal of clinical investigation**, v. 120, n. 11, p. 3760-3772, 2010.

DUBUQUOY, Laurent et al. Impaired expression of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  in ulcerative colitis. **Gastroenterology**, v. 124, n. 5, p. 1265-1276, 2003.

DUNFORD, Rosemary et al. Chemical oxidation and DNA damage catalysed by inorganic sunscreen ingredients. **FEBS letters**, v. 418, n. 1-2, p. 87-90, 1997.

ECKMANN, L. Ingrid Ordás, Lars Eckmann, Mark Talamini, Daniel C Baumgart, William J Sandborn. **The Lancet**, v. 380, p. 1606-19, 2012.

ELSON, Charles O. et al. Experimental models of inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, v. 109, n. 4, p. 1344-1367, 1995.

FATTORI, Victor; AMARAL, Flavio A.; VERRI JR, Waldiceu A. Neutrophils and arthritis: role in disease and pharmacological perspectives. **Pharmacological research**, v. 112, p. 84-98, 2016.

FATTORI, Victor et al. Targeting IL-33/ST2 signaling: regulation of immune function and analgesia. **Expert opinion on therapeutic targets**, v. 21, n. 12, p. 1141-1152, 2017.

FATTORI, Victor et al. Neuroimmune regulation of pain and inflammation: targeting glial cells and nociceptor sensory neurons interaction. **Frontiers in CNS drug discovery**, v. 3, p. 146-200, 2017.

FATTORI, Victor et al. The specialised pro-resolving lipid mediator maresin 1 reduces inflammatory pain with a long-lasting analgesic effect. **British Journal of Pharmacology**, v. 176, n. 11, p. 1728-1744, 2019.

FATTORI, Victor et al. Diosmin treats lipopolysaccharide-induced inflammatory pain and peritonitis by blocking NF- $\kappa$ B activation in mice. **Journal of natural products**, v. 83, n. 4, p. 1018-1026, 2020.

FERREIRA, S. H.; FERRARI, L. F.; CUNHA, T. M.; NASCIMENTO, P. G. B. D. *et al.* Dor Inflamatória. **In**, p. 1438-1438, 2009.

FEEHAN, Karen T.; GILROY, Derek W. Is resolution the end of inflammation?. **Trends in molecular medicine**, v. 25, n. 3, p. 198-214, 2019.

FMUL. CEMBE da FMUL - NOC da Dor Neuropática Localizada. **DOR**, v.19, p.6-48, 2011.

FREIRE, M. O.; VAN DYKE, T. E. **Natural resolution of inflammation.** Periodontology 2000, v. 63, n. 1, p. 149-164, Out. 2013.

FULLERTON, J.N. and GILROY, D.W. Resolution of inflammation: a new therapeutic

frontier. **Nature Reviews Drug Discovery**. 15, 551–567, 2016.

FUSS, Ivan J. et al. Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. **The Journal of Immunology**, v. 157, n. 3, p. 1261-1270, 1996.

FUSS, Ivan J. et al. Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. **The Journal of clinical investigation**, v. 113, n. 10, p. 1490-1497, 2004.

GEREMIA, Alessandra et al. IL-23–responsive innate lymphoid cells are increased in inflammatory bowel disease. **Journal of Experimental Medicine**, v. 208, n. 6, p. 1127-1133, 2011.

GERLACH, Katharina et al. TH9 cells that express the transcription factor PU. 1 drive T cell–mediated colitis via IL-9 receptor signaling in intestinal epithelial cells. **Nature immunology**, v. 15, n. 7, p. 676-686, 2014.

GIRBL, T.; LENN, T.; PEREZ, L.; ROLAS, L. *et al.* Distinct Compartmentalization of the Chemokines CXCL1 and CXCL2 and the Atypical Receptor ACKR1 Determine Discrete Stages of Neutrophil Diapedesis. **Immunity**, 49, n. 6, p. 1062-1076 e1066, Dec 2018.

GILROY, Derek W. et al. Inducible cyclooxygenase-derived 15deoxy  $\Delta$  12-14PGJ2 brings about acute inflammatory resolution in rat pleurisy by inducing neutrophil and macrophage apoptosis. **The FASEB journal**, v. 17, n. 15, p. 2269-2271, 2003.

GINHOUX, Florent et al. Origin and differentiation of microglia. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 7, p. 45, 2013.

GLOIRE, G.; PIETTE, J. Redox Regulation of Nuclear Post-Translational Modifications During NF- $\kappa$ B Activation. **Antioxidants & Redox Signaling**, 11, n. 9, p. 2209-2222, 2009.

GODINHO-SILVA, Cristina; CARDOSO, Filipa; VEIGA-FERNANDES, Henrique. Neuro-immune cell units: a new paradigm in physiology. **Annual review of immunology**, v. 37, p. 19-46, 2019.

GÓMEZ-NICOLA, Diego et al. Role of IL-15 in spinal cord and sciatic nerve after chronic constriction injury: regulation of macrophage and T-cell infiltration. **Journal of neurochemistry**, v. 107, n. 6, p. 1741-1752, 2008.

GONG, Jie et al. Maresin 1 mitigates LPS-induced acute lung injury in mice. **British journal of pharmacology**, v. 171, n. 14, p. 3539-3550, 2014.

GONZALEZ, Ricardo et al. Anti-inflammatory activity of phycocyanin extract in acetic acid-induced colitis in rats. **Pharmacological research**, v. 39, n. 1, p. 55-59, 1999.

GORGULU, Semih et al. Hyperbaric oxygen enhances the efficiency of 5-aminosalicylic acid in acetic acid–induced colitis in rats. **Digestive diseases and sciences**, v. 51, n. 3, p. 480-487, 2006.

GOSWAMI R, KAPLAN MH. A brief history of IL-9. **The Journal of Immunology**, 186:3283–8, 2011.

GRISHAM, Matthew B.; GRANGER, D. Neil. Neutrophil-mediated mucosal injury. **Digestive diseases and sciences**, v. 33, n. 3, p. 6S-15S, 1988.

GUAZELLI, Carla FS et al. Quercetin-loaded microcapsules ameliorate experimental colitis in mice by anti-inflammatory and antioxidant mechanisms. **Journal of natural products**, v. 76, n. 2, p. 200-208, 2013.

GUAZELLI, Carla FS et al. Antioxidant and anti-inflammatory effects of hesperidin methyl chalcone in experimental ulcerative colitis. **Chemico-Biological Interactions**, v. 333, p. 109315, 2021.

GUDE, David R. et al. Apoptosis induces expression of sphingosine kinase 1 to release sphingosine-1-phosphate as a “come-and-get-me” signal. **The FASEB Journal**, v. 22, n. 8, p. 2629-2638, 2008.

GUDES, S.; BARKAI, O.; CASPI, Y.; KATZ, B. *et al.* The role of slow and persistent TTX-resistant sodium currents in acute tumor necrosis factor-alpha-mediated increase in nociceptors excitability. **Journal of Neurophysiology**, 113, n. 2, p. 601-619, Jan 15 2015.

GUERRERO, Ana TG et al. Toll-like receptor 2/MyD88 signaling mediates zymosan-induced joint hypernociception in mice: participation of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and CXCL1/KC. **European journal of pharmacology**, v. 674, n. 1, p. 51-57, 2012.

GURR, Jia-Ran et al. Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. **Toxicology**, v. 213, n. 1-2, p. 66-73, 2005.

HAANPÄÄ, Maija et al. NeuPSIG guidelines on neuropathic pain assessment. **PAIN®**, v. 152, n. 1, p. 14-27, 2011.

HAGAR, Hanan H. et al. Ameliorative effect of pyrrolidinedithiocarbamate on acetic acid-induced colitis in rats. **European journal of pharmacology**, v. 554, n. 1, p. 69-77, 2007.

HALME, Leena et al. Family and twin studies in inflammatory bowel disease. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 12, n. 23, p. 3668, 2006.

HARGREAVES, K. et al. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. **Pain**, v. 32, n. 1, p. 77-88, 1988.

HART, A. L. Al-Hassi HO, Rigby RJ, Bell SJ, Emmanuel AV, Knight SC, Kamm MA, Stagg AJ. Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel diseases. **Gastroenterology**, v. 129, p. 50-65, 2005.

HARTMANN, Renata Minuzzo et al. Effect of *Boswellia serrata* on antioxidant status in an experimental model of colitis rats induced by acetic acid. **Digestive diseases**

**and sciences**, v. 57, n. 8, p. 2038-2044, 2012.

HAUSMANN, M. et al. Toll-like receptors 2 and 4 are up-regulated during intestinal inflammation. **Gastroenterology**, v. 122, n. 7, p. 1987-2000, 2002.

HE, Mei et al. Receptor for advanced glycation end products binds to phosphatidylserine and assists in the clearance of apoptotic cells. **EMBO reports**, v. 12, n. 4, p. 358-364, 2011.

HELLEBREKERS, Ludo J. Dor em animais: uma abordagem com orientação prática para um controle eficaz da dor em animais. 2002.

HELLER, Frank et al. Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. **Gastroenterology**, v. 129, n. 2, p. 550-564, 2005.

HIRTEN, Robert P. et al. Combining biologics in inflammatory bowel disease and other immune mediated inflammatory disorders. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 16, n. 9, p. 1374-1384, 2018.

HØIVIK, Marte Lie et al. Work disability in inflammatory bowel disease patients 10 years after disease onset: results from the IBSEN Study. **Gut**, v. 62, n. 3, p. 368-375, 2013.

HUANG, Tingting et al. The Synergistic Effect of TRPV1 on Oxidative Stress-Induced Autophagy and Apoptosis in Microglia. **Analytical Cellular Pathology**, v. 2021, 2021.

HUFFORD MM, KAPLAN HM. A gut reaction to IL-9. **Nature Immunology**, 15:599–600, 2014.

HVIID, Anders; SVANSTRÖM, Henrik; FRISCH, Morten. Antibiotic use and inflammatory bowel diseases in childhood. **Gut**, v. 60, n. 1, p. 49-54, 2011.

INOUE, Shigeo et al. Characterization of cytokine expression in the rectal mucosa of ulcerative colitis: correlation with disease activity. **The American journal of gastroenterology**, v. 94, n. 9, p. 2441-2446, 1999.

Janeiro, Inês Margarida Inácio. **Fisiologia da Dor**. 2017. Dissertação de mestrado. Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa. 2017.

JENSEN, Troels S. et al. A new definition of neuropathic pain. **Pain**, v. 152, n. 10, p. 2204-2205, 2011.

JI, Ru-Rong et al. Neuroinflammation and central sensitization in chronic and widespread pain. **Anesthesiology**, v. 129, n. 2, p. 343-366, 2018.

JIANG, Chengyu; TING, Adrian T.; SEED, Brian. PPAR- $\gamma$  agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. **Nature**, v. 391, n. 6662, p. 82-86, 1998.

JOHANSSON, Malin EV et al. Bacteria penetrate the normally impenetrable inner colon mucus layer in both murine colitis models and patients with ulcerative colitis. **Gut**, v. 63, n. 2, p. 281-291, 2014.

JOSTINS, Luke et al. Host–microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. **Nature**, v. 491, n. 7422, p. 119-124, 2012.

KARP, Sean M.; KOCH, Timothy R. Oxidative stress and antioxidants in inflammatory bowel disease. **Disease-a-Month**, v. 52, n. 5, p. 199-207, 2006.

JURJUS, Abdo R.; KHOURY, Naim N.; REIMUND, Jean-Marie. Animal models of inflammatory bowel disease. **Journal of pharmacological and toxicological methods**, v. 50, n. 2, p. 81-92, 2004.

Kaplan MH, Hufford MM, Olson MR. The development and in vivo function of T helper 9 cells. **Nature Reviews Immunology**, 15:295–307, 2015.

Kaplan MH. The transcription factor network in Th9 cells. **Seminars in Immunopathology**, 39(1):11–20, 2017.

KAWASAKI, Yasuhiko et al. Distinct roles of matrix metalloproteases in the early-and late-phase development of neuropathic pain. **Nature medicine**, v. 14, n. 3, p. 331-336, 2008.

KESHAVARZIAN, Ali et al. Excessive production of reactive oxygen metabolites by inflamed colon: analysis by chemiluminescence probe. **Gastroenterology**, v. 103, n. 1, p. 177-185, 1992.

KIM HS, CHUNG DH. IL-9-producing invariant NKT cells protect against DSS-induced colitis in an IL-4-dependent manner. **Mucosal Immunology**, 6:347–57, 2013.

KLARESKOG, Lars; PADYUKOV, Leonid; ALFREDSSON, Lars. Smoking as a trigger for inflammatory rheumatic diseases. **Current opinion in rheumatology**, v. 19, n. 1, p. 49-54, 2007.

KHALILI, Hamed et al. Hormone therapy increases risk of ulcerative colitis but not Crohn's disease. **Gastroenterology**, v. 143, n. 5, p. 1199-1206, 2012.

KO, Yanna et al. Inflammatory bowel disease environmental risk factors: a population-based case–control study of Middle Eastern migration to Australia. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 13, n. 8, p. 1453-1463. e1, 2015.

KOLASINSKI, Sharon L. et al. 2019 American College of Rheumatology/Arthritis Foundation guideline for the management of osteoarthritis of the hand, hip, and knee. **Arthritis & Rheumatology**, v. 72, n. 2, p. 220-233, 2020.

KOPF, A.; PATEL, N. B. Guia para o tratamento da dor em contextos de poucos recursos [homepage na internet]. **Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP)**, 2010.

LAEV, Sergey S.; SALAKHUTDINOV, Nariman F. Anti-arthritic agents: progress and potential. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 23, n. 13, p. 3059-3080, 2015.

LAMONT, Leigh A.; TRANQUILLI, William J.; GRIMM, Kurt A. Physiology of pain. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 30, n. 4, p. 703-728, 2000.

LAUBER, Kirsten et al. Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal. **Cell**, v. 113, n. 6, p. 717-730, 2003.

LAWRENCE, Toby; WILLOUGHBY, Derek A.; GILROY, Derek W. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 10, p. 787-795, 2002.

LEE, Cheng Hiang et al. Novel de novo mutations of the interleukin-10 receptor gene lead to infantile onset inflammatory bowel disease. **Journal of Crohn's and Colitis**, v. 8, n. 11, p. 1551-1556, 2014.

LEE, Kevin; GOODMAN, Stuart B. Current state and future of joint replacements in the hip and knee. **Expert review of medical devices**, v. 5, n. 3, p. 383-393, 2008.

LEE, Hyunkyung et al. Toll-like receptors: sensor molecules for detecting damage to the nervous system. **Current Protein and Peptide Science**, v. 14, n. 1, p. 33-42, 2013.

LEE, Yvonne C. et al. Pain persists in DAS28 rheumatoid arthritis remission but not in ACR/EULAR remission: a longitudinal observational study. **Arthritis research & therapy**, v. 13, n. 3, p. 1-9, 2011.

LEVY, Bruce D. et al. Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. **Nature immunology**, v. 2, n. 7, p. 612-619, 2001.

LI, Q. F. et al. Maresins: anti-inflammatory pro-resolving mediators with therapeutic potential. **A European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 24, n. 13, p. 7442-7453, 2020.

LI, Yan-hong et al. Berberine ameliorates chronic relapsing dextran sulfate sodium-induced colitis in C57BL/6 mice by suppressing Th17 responses. **Pharmacological Research**, v. 110, p. 227-239, 2016.

LICHTIGER, Simon et al. Cyclosporine in severe ulcerative colitis refractory to steroid therapy. **New England Journal of Medicine**, v. 330, n. 26, p. 1841-1845, 1994.

LUNA, S. P. L. Dor, analgesia e bem estar animal. In: **ANAIS-I Congresso Internacional de Conceitos em Bem-estar Animal**. 2006. p. 16-18.

MACPHERSON, B. R.; PFEIFFER, C. J. Experimental production of diffuse colitis in rats. **Digestion**, v. 17, n. 2, p. 135-150, 1978.

MAIOLI, N. A. et al. The superoxide anion donor, potassium superoxide, induces pain

and inflammation in mice through production of reactive oxygen species and cyclooxygenase-2. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, p. 321-331, 2015.

MAJNO, Guido; JORIS, Isabelle. **Cells, tissues, and disease: principles of general pathology**. Oxford University Press, 2004.

MAGRO, Fernando et al. Review of the disease course among adult ulcerative colitis population-based longitudinal cohorts. **Inflammatory bowel diseases**, v. 18, n. 3, p. 573-583, 2012.

MAHID, Suhal S. et al. Smoking and inflammatory bowel disease: a meta-analysis. In: **Mayo Clinic Proceedings**. Elsevier, 2006. p. 1462-1471.

MARCHAL-BRESSENOT, Aude et al. Development and validation of the Nancy histological index for UC. **Gut**, v. 66, n. 1, p. 43-49, 2017.

MARCON, Rodrigo et al. Maresin 1, a proresolving lipid mediator derived from omega-3 polyunsaturated fatty acids, exerts protective actions in murine models of colitis. **The Journal of Immunology**, v. 191, n. 8, p. 4288-4298, 2013.

MARTINEZ, F. O.; HELMING, L.; GORDON, S. Alternative activation of macrophages: **An immunologic functional perspective Annual Review of Immunology**, v. 27, p. 451-483, Abr. 2009.

MAQUEZ, J. O. Bases de anatomia e fisiopatologia. **Dor diagnóstico e tratamento**, v. 1, n. 1, p. 3-10, 2004.

MASHIMO, Hiroshi et al. Impaired defense of intestinal mucosa in mice lacking intestinal trefoil factor. **Science**, v. 274, n. 5285, p. 262-265, 1996.

MCCORMACK, DAVID G. et al. Calcitonin gene-related peptide vasodilation of human pulmonary vessels. **Journal of Applied Physiology**, v. 67, n. 3, p. 1265-1270, 1989.

MCGUCKIN, Michael A. et al. Intestinal barrier dysfunction in inflammatory bowel diseases. **Inflammatory bowel diseases**, v. 15, n. 1, p. 100-113, 2009.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, 454, n. 11 7203, p. 428-435, 2008.

MELINGER, K. Was ist ein Nozizeptor?. **Der Anaesthetist Overview**, v. 2, n. 46, p. 142-153, 1997.

MILLAN, Mark J. The induction of pain: an integrative review. **Progress in neurobiology**, v. 57, n. 1, p. 1-164, 1999.

MILLAR, A. D. et al. Evaluating the antioxidant potential of new treatments for inflammatory bowel disease using a rat model of colitis. **Gut**, v. 39, n. 3, p. 407-415, 1996.

MILLER, Richard J. et al. Cytokine and chemokine regulation of sensory neuron function. **Sensory nerves**, p. 417-449, 2009.

MOCSAI, A., WALZOG, B., LOWELL, C. A. Intracellular signalling during neutrophil recruitment. **Cardiovascular Research**, v. 107, n. 3, p. 373-385, Ago. 2015.

MOFFAT, Ryan; RAE, Colin P. Anatomy, physiology and pharmacology of pain. **Anaesthesia & Intensive Care Medicine**, v. 12, n. 1, p. 12-15, 2011.

MORAES, Marcos Fernando Breda de et al. Sympathetic nervous system block to control phantom limb pain: case report. **Revista Dor**, v. 14, p. 155-157, 2013.

MORAN, Cesar A. et al. Identification of titanium in human tissues: probable role in pathologic processes. **Human pathology**, v. 22, n. 5, p. 450-454, 1991.

MOSLI, Mahmoud H. et al. Development and validation of a histological index for UC. **Gut**, v. 66, n. 1, p. 50-58, 2017.

MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature Reviews Immunology**, v.8, n.12, p. 958-969. Dez. 2008.

MOULIN, D. E. et al. Pharmacological management of chronic neuropathic pain—consensus statement and guidelines from the Canadian Pain Society. **Pain Research and Management**, v. 12, n. 1, p. 13-21, 2007.

MOUSAVIZADEH, K. et al. Anti-inflammatory effects of 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonist, tropisetron on experimental colitis in rats. **European journal of clinical investigation**, v. 39, n. 5, p. 375-383, 2009.

MUNDY, Gregory R. Osteoporosis and inflammation. **Nutrition reviews**, v. 65, n. suppl\_3, p. S147-S151, 2007.

MURAKAMI, M.; HIRANO, T. The molecular mechanisms of chronic inflammation development. **Front Immunol**, v. 3, p. 323, Nov. 2012.

NAHIN, Richard L. Estimates of pain prevalence and severity in adults: United States, 2012. **The Journal of Pain**, v. 16, n. 8, p. 769-780, 2015.

NAKHAI, Leila Ashtaral et al. Benefits of Zataria multiflora Boiss in experimental model of mouse inflammatory bowel disease. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 4, n. 1, p. 43-50, 2007.

NG, Siew C. et al. Environmental risk factors in inflammatory bowel disease: a population-based case-control study in Asia-Pacific. **Gut**, v. 64, n. 7, p. 1063-1071, 2015.

NGUYEN, Geoffrey C. et al. A national survey of the prevalence and impact of Clostridium difficile infection among hospitalized inflammatory bowel disease patients. **Official journal of the American College of Gastroenterology| ACG**, v.

103, n. 6, p. 1443-1450, 2008.

NOA, MIRIAM et al. Effect of D-002 on acetic acid-induced colitis in rats at single and repeated doses. **Pharmacological Research**, v. 41, n. 4, p. 391-395, 2000.

NORDGREN, Tara M. et al. Maresin-1 reduces the pro-inflammatory response of bronchial epithelial cells to organic dust. **Respiratory research**, v. 14, n. 1, p. 1-10, 2013.

O'BRIEN, William et al. RANK-independent osteoclast formation and bone erosion in inflammatory arthritis. **Arthritis & rheumatology**, v. 68, n. 12, p. 2889-2900, 2016.

ODES, H. S. et al. Effects of current cigarette smoking on clinical course of Crohn's disease and ulcerative colitis. **Digestive diseases and sciences**, v. 46, n. 8, p. 1717-1721, 2001.

OKA, Y. et al. Interleukin-6 is a candidate molecule that transmits inflammatory information to the CNS. **Neuroscience**, v. 145, n. 2, p. 530-538, 2007.

OLD, Elizabeth A. et al. Monocytes expressing CX3CR1 orchestrate the development of vincristine-induced pain. **The Journal of clinical investigation**, v. 124, n. 5, p. 2023-2036, 2014.

ORTEGA-GÓMEZ, Almudena; PERRETTI, Mauro; SOEHNLEIN, Oliver. Resolution of inflammation: an integrated view. **EMBO molecular medicine**, v. 5, n. 5, p. 661-674, 2013.

OSPELT, C. et al. Toll-like receptors in rheumatoid arthritis joint destruction mediated by two distinct pathways. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 63, n. suppl 2, p. ii90-ii91, 2004.

OTIS, John D. Flor, H., & Turk, DC (2011) **Chronic Pain: An Integrated Biobehavioral Approach** Seattle: IASP Press. 2013.

PARK, C. K. et al. Resolving TRPV1- and TNF- $\alpha$ -mediated spinal cord synaptic plasticity and inflammatory pain with neuroprotectin D1. **Journal of Neuroscience**, v. 35, n. 42, p. 15072-15085, 2011a.

PERRETTI, M.; SOLITO, E. Annexin 1 and neutrophil apoptosis. **Biochemical Society Transactions**, 32, n. Pt3, p. 507-510, Jun 2004.

PEYRIN-BIROULET, L. et al. Selecting therapeutic targets in inflammatory bowel disease (STRIDE): determining therapeutic goals for treat-to-target. **Official journal of the American College of Gastroenterology| ACG**, v. 110, n. 9, p. 1324-1338, 2015.

PIETROBON, Daniela. Calcium channels and migraine. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1828, n. 7, p. 1655-1665, 2013.

PINHO-RIBEIRO, Felipe A.; VERRI JR, Waldiceu A.; CHIU, Isaac M. Nociceptor sensory neuron-immune interactions in pain and inflammation. **Trends in**

**immunology**, v. 38, n. 1, p. 5-19, 2017.

PODOLSKY, Daniel K.; ISSELBACHER, Kurt J. Glycoprotein composition of colonic mucosa: specific alterations in ulcerative colitis. **Gastroenterology**, v. 87, n. 5, p. 991-998, 1984.

RADSTAKE, Timothy RDJ et al. Expression of Toll-like receptors 2 and 4 in rheumatoid synovial tissue and regulation by proinflammatory cytokines interleukin-12 and interleukin-18 via interferon- $\gamma$ . **Arthritis & Rheumatism**, v. 50, n. 12, p. 3856-3865, 2004.

RAVICHANDRAN, Kodi S. Beginnings of a good apoptotic meal: the find-me and eat-me signaling pathways. **Immunity**, v. 35, n. 4, p. 445-455, 2011.

REICHLING, David B.; GREEN, Paul G.; LEVINE, Jon D. The fundamental unit of pain is the cell. **PAIN®**, v. 154, p. S2-S9, 2013.

RICHARDSON, Jennelle Durnett; VASKO, Michael R. Cellular mechanisms of neurogenic inflammation. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 302, n. 3, p. 839-845, 2002.

RISKOWSKI, Jody L. Associations of socioeconomic position and pain prevalence in the United States: Findings from the National Health and Nutrition Examination Survey. **Pain Medicine**, v. 15, n. 9, p. 1508-1521, 2014.

ROCA-LAPIROT, Olivier et al. Calcium signalling through L-type calcium channels: role in pathophysiology of spinal nociceptive transmission. **British Journal of Pharmacology**, v. 175, n. 12, p. 2362-2374, 2018.

ROCHA E SILVA, M. A brief survey of the history of inflammation. **Agents and actions**, v. 8, n. 1, p. 45-49, 1978.

RUFO, Paul A.; BOUSVAROS, Athos. Current therapy of inflammatory bowel disease in children. **Pediatric Drugs**, v. 8, n. 5, p. 279-302, 2006.

RYGH, Lars Jørgen; HOLE, Kjell; TJØLSEN, Arne. Molecular mechanisms in acute and chronic pain states. **Tidsskrift for den Norske Lægeforening: Tidsskrift for Praktisk Medicin, ny Raekke**, v. 125, n. 17, p. 2374-2377, 2005.

SARIA, A. Substance P in sensory nerve fibres contributes to the development of oedema in the rat hind paw after thermal injury. **British journal of pharmacology**, v. 82, n. 1, p. 217-222, 1984

SASAKI, S. et al. Prostaglandin E2 inhibits lesion formation in dextran sodium sulphate-induced colitis in rats and reduces the levels of mucosal inflammatory cytokines. **Scandinavian journal of immunology**, v. 51, n. 1, p. 23-28, 2000.

SCANNELL, Michael et al. Annexin-1 and peptide derivatives are released by apoptotic cells and stimulate phagocytosis of apoptotic neutrophils by macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 178, n. 7, p. 4595-4605, 2007.

SCHAIBLE, Hans-Georg et al. Joint pain. **Experimental brain research**, v. 196, n. 1, p. 153-162, 2009.

Schmitt E, Germann T, Goedert S, Hoehn P, Huels C, Koelsch S, et al. IL-9 production of naive CD4+ T cells depends on IL-2, is synergistically enhanced by a combination of TGF-beta and IL-4, and is inhibited by IFN-gamma. **European Journal of Immunology**, 153:3989–96, 1994.

SCHIPPER, Lydia G. et al. Meta-analysis of tight control strategies in rheumatoid arthritis: protocolized treatment has additional value with respect to the clinical outcome. **Rheumatology**, v. 49, n. 11, p. 2154-2164, 2010.

SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. Can we conquer pain? **Nature Neuroscience**, 5, n. Supp, p. 1062-1067, 2002.

SCHROEDER, Kenneth W.; TREMAINE, William J.; ILSTRUP, Duane M. Coated oral 5-aminosalicylic acid therapy for mildly to moderately active ulcerative colitis. **New England Journal of Medicine**, v. 317, n. 26, p. 1625-1629, 1987.

SCHUH, C. D.; PIERRE, S.; WEIGERT, A.; WEICHAND, B. *et al.* Prostacyclin mediates neuropathic pain through interleukin 1beta-expressing resident macrophages. **Pain**, 155, n. 3, p. 545-555, Mar 2014.

SCIPIO, C.; WANDNER, L.; ROBINSON, M. The perception of pain in others: How gender, race, and age influence pain expectations. **The Journal of Pain**, v. 12, n. 4, p. P84, 2011.

SEKIGUCHI, Fumiko; KAWABATA, Atsufumi. T-type calcium channels: functional regulation and implication in pain signaling. **Journal of pharmacological sciences**, v. 122, n. 4, p. 244-250, 2013.

SERHAN, Charles N. et al. Macrophage proresolving mediator maresin 1 stimulates tissue regeneration and controls pain. **The FASEB Journal**, v. 26, n. 4, p. 1755, 2012.

SERHAN, Charles N. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. **Nature**, v. 510, n. 7503, p. 92-101, 2014.

SERHAN, Charles N. et al. Protectins and maresins: New pro-resolving families of mediators in acute inflammation and resolution bioactive metabolome. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1851, n. 4, p. 397-413, 2015.

SERHAN, Charles N. Treating inflammation and infection in the 21st century: new hints from decoding resolution mediators and mechanisms. **The FASEB Journal**, v. 31, n. 4, p. 1273-1288, 2017.

SHUBAYEV, Veronica I. et al. TNF $\alpha$ -induced MMP-9 promotes macrophage recruitment into injured peripheral nerve. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 31, n. 3, p. 407-415, 2006.

SIEGEL, Corey A. et al. Development of an index to define overall disease severity in IBD. **Gut**, v. 67, n. 2, p. 244-254, 2018.

SILVA, Rona M. et al. Biological response to nano-scale titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>): role of particle dose, shape, and retention. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 76, n. 16, p. 953-972, 2013.

SILVERBERG, Mark S. et al. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. **Canadian journal of gastroenterology**, v. 19, n. Suppl A, p. 5A-36A, 2005.

SIMMONDS, R. E. Foxwell BM. NF- $\kappa$ B and its relevance to arthritis and inflammation. **Rheumatology**, v. 47, p. 584-590, 2008.

SINGH, Jasvinder A. et al. 2015 American College of Rheumatology guideline for the treatment of rheumatoid arthritis. **Arthritis & rheumatology**, v. 68, n. 1, p. 1-26, 2016.

SINGHAL, Gaurav et al. Inflammasomes in neuroinflammation and changes in brain function: a focused review. **Frontiers in neuroscience**, v. 8, p. 315, 2014.

SMITH, Ewan St John; LEWIN, Gary R. Nociceptors: a phylogenetic view. **Journal of Comparative Physiology A**, v. 195, n. 12, p. 1089-1106, 2009.

ST. PIERRE, Christine A. et al. Periprosthetic osteolysis: Characterizing the innate immune response to titanium wear-particles. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 28, n. 11, p. 1418-1424, 2010.

TSANG, Siu Wai et al. A Chinese medicinal formulation ameliorates dextran sulfate sodium-induced experimental colitis by suppressing the activity of nuclear factor- $\kappa$ B signaling. **Journal of ethnopharmacology**, v. 162, p. 20-30, 2015.

TAKEUCHI, Osamu; AKIRA, Shizuo. Pattern recognition receptors and inflammation. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 805-820, 2010.

TAMAKI, Yasunobu et al. Expression of Toll-like receptors and their signaling pathways in rheumatoid synovitis. **The Journal of rheumatology**, v. 38, n. 5, p. 810-820, 2011.

TEIXEIRA, M.J. **A lesão do trato de Lissauer e do corno posterior da substância cinzenta da medula espinal e a estimulação elétrica do sistema nervoso central para o tratamento da dor por desafferentação**. São Paulo, 1990. Tese (Doutorado), São Paulo Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 256 p.

TEIXEIRA, Manoel Jacobsen. Fisiopatologia da nocicepção e da supressão da dor. **JBA**, v. 1, n. 4, p. 329-34, 2001.

THALAKOTI, Srikanth et al. Neuron–glia signaling in trigeminal ganglion: implications for migraine pathology. Headache: **The Journal of Head and Face Pain**, v. 47, n. 7, p. 1008-1023, 2007.

TORRES, M.; FORMAN, H. J. Redox signaling and the MAP kinase pathways. **BioFactors (Oxford, England)**, 17, n. 1-4, p. 287-296, 2003.

TORRES, Joana et al. Ulcerative colitis as a progressive disease: the forgotten evidence. **Inflammatory bowel diseases**, v. 18, n. 7, p. 1356-1363, 2012.

TORRES, Joana et al. **Crohn's disease**. *The Lancet*, v. 389, n. 10080, p. 1741-1755, 2017.

THEOHARIDES, T. C.; KEMPURAJ, D.; TAGEN, M.; CONTI, P. *et al.* Differential release of mast cell mediators and the pathogenesis of inflammation. **Immunological Reviews**, 217, n. 1, p. 65-78, 2007.

TRANQUILLI, W. J. Fisiologia da dor aguda. **GREENE, SA Segredos em anestesia veterinária e manejo da dor**. Porto Alegre: Artmed, p. 399-402, 2004..

TRAVIS, Simon PL et al. Developing an instrument to assess the endoscopic severity of ulcerative colitis: the Ulcerative Colitis Endoscopic Index of Severity (UCEIS). **Gut**, v. 61, n. 4, p. 535-542, 2012.

TRUMAN, Lucy A. et al. CX3CL1/fractalkine is released from apoptotic lymphocytes to stimulate macrophage chemotaxis. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 112, n. 13, p. 5026-5036, 2008.

ULRICH, Slif D. et al. Total hip arthroplasties: what are the reasons for revision?. **International orthopaedics**, v. 32, n. 5, p. 597-604, 2008.

UK IBD GENETICS CONSORTIUM et al. & The Wellcome Trust Case Control Consortium 2. Genome-wide association study of ulcerative colitis identifies three new susceptibility loci, including the HNF4A region. **Nature Genetics**, v. 41, n. 12, p. 1330-1334, 2009.

UNGARO R, MEHANDRU S, ALLEN P B, PEYRIN-BIROULET L, COLOMBEL F. Ulcerative colitis. **The Lancet**, 389(10080):1756-1770, 2017.

VAN DER HELM, Annette HM et al. Understanding the genetic contribution to rheumatoid arthritis. **Current opinion in rheumatology**, v. 17, n. 3, p. 299-304, 2005.

VERMA, Vivek; SHEIKH, Zeeshan; AHMED, Ahad S. Nociception and role of immune system in pain. **Acta Neurologica Belgica**, v. 115, n. 3, p. 213-220, 2015.

VERRI, W. A.; CUNHA, T. M.; PARADA, C. A.; POOLE, S. *et al.* Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: Targets for analgesic drug development? **Pharmacology & Therapeutics**, 112, n. 1, p. 116-138, 2006.

VOJDANI, Aristo. A potential link between environmental triggers and autoimmunity.

**Autoimmune diseases**, v. 2014, 2014.

XANTHOS, Dimitris N.; SANDKÜHLER, Jürgen. Neurogenic neuroinflammation: inflammatory CNS reactions in response to neuronal activity. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 15, n. 1, p. 43-53, 2014.

WANG, Chen-Ti et al. Over-expression of receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand (RANKL), inflammatory cytokines, and chemokines in periprosthetic osteolysis of loosened total hip arthroplasty. **Biomaterials**, v. 31, n. 1, p. 77-82, 2010.

WAISBROD, H. et al. Chronic pain in paraplegics. **Neurosurgery**, v.15, p.993-994, 1984.

WALMSLEY, R. S. et al. A simple clinical colitis activity index. **Gut**, v. 43, n. 1, p. 29-32, 1998.

WANG, Jiang-Xue et al. TiO<sub>2</sub> nanoparticles translocation and potential toxicological effect in rats after intraarticular injection. **Biomaterials**, v. 30, n. 27, p. 4590-4600, 2009.

WATSON, Judy J.; ALLEN, Shelley J.; DAWBARN, DrDavid. Targeting nerve growth factor in pain. **BioDrugs**, v. 22, n. 6, p. 349-359, 2008.

WEI, Feng et al. Supraspinal glial–neuronal interactions contribute to descending pain facilitation. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 42, p. 10482-10495, 2008.

WELSING, Paco MJ; FRANSEN, Jaap; VAN RIEL, Piet LCM. Is the disease course of rheumatoid arthritis becoming milder?: Time trends since 1985 in an inception cohort of early rheumatoid arthritis. **Arthritis & Rheumatism**, v. 52, n. 9, p. 2616-2624, 2005.

WIDMAIER, Eric P.; RAFF, Hershel; STRANG, Kevin T. Vander, **Sherman & Luciano fisiologia humana: os mecanismos das funções corporais**. Guanabara Koogan, 2006.

WOODFIN, A.; VOISIN, M. B.; IMHOF, B. A.; DEJANA, E. et al. Endothelial cell activation leads to neutrophil transmigration as supported by the sequential roles of ICAM-2, JAM-A, and PECAM-1. **Blood**, 113, n. 24, p. 6246-6257, Jun 11 2009.

WOOLEY, Paul H. et al. Inflammatory responses to orthopaedic biomaterials in the murine air pouch. **Biomaterials**, v. 23, n. 2, p. 517-526, 2002.

ZHANG, J.; WANG, X.; VIKASH, V.; YE, Q. et al. ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2016, p. 1-18, 2016.

ZHANG, Ji et al. Expression of CCR2 in both resident and bone marrow-derived microglia plays a critical role in neuropathic pain. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 45, p. 12396-12406, 2007.

ZARPELON, Ana C. et al. Spinal cord oligodendrocyte-derived alarmin IL-33

mediates neuropathic pain. **The FASEB Journal**, v. 30, n. 1, p. 54-65, 2016.

## APÊNDICES

## APÊNDICE A

### Instrumento de pesquisa utilizado na coleta de dados



#### COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF, CIRC, CEUA Nº 151/2016

Londrina, 15 de Julho de 2016.

Prezado Pesquisador,

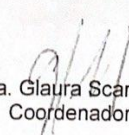
Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação do efeito analgésico dos mediadores lipídicos pró-resolução resolvina D1 (RvD1) resolvina D2 (RvD2), resolvina D5 (RvD5), maresina 1 (Mar1), maresina 2 (Mar2), protectina (PD1), 15-epi-lipoxina A4 (ATLA4) e lipoxina A4 (LxA4) em modelo de artrite induzido por TiO<sub>2</sub>", protocolo CEUA nº 11147.2016.40, sob a responsabilidade de **Waldiceu Aparecido Verri Junior**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL), em reunião realizada em **05/07/2016**.

O objetivo do projeto investigar os mecanismos dos mediadores lipídicos pró-resolução RvD1, RvD2, RvD5, Mar1, Mar2, PD1, ATLA4 e LxA4 em modelo de hiperalgisia induzido por dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>). Os animais serão divididos em gaiolas de polipropileno padrão medindo 41 X 34 X 16 CM (Insight®) no biotério de acordo com os grupos experimentais (máximo de 12 animais por gaiola), com livre acesso à água e ração e serão adaptados aos ambientes e condições experimentais com pelo menos 1 hora de antecedência em relação aos experimentos. Os procedimentos de cuidado e manuseio de animais estarão de acordo com as diretrizes da Associação Internacional de Estudo da Dor (IASP). A utilização de fármacos analgésicos não é realizada uma vez que estes podem interferir na resposta analisada, e desta forma prejudicar a interpretação dos resultados. A eutanásia será realizada por Isoflurano 1,5 a 3% em O<sub>2</sub> e serão posteriormente decapitados. GI 2.

Vigência do Projeto	01/01/2017 a 01/12/2022
Espécie/linhagem	Camundongo heterogênico / Swiss
Nº de animais	672
Peso/idade	20-25 g / 2 meses
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central / UEL
Amostras a serem coletadas	Articulação

Cumpra orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UEL anteriormente à execução das modificações.

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessária. Sem mais para o momento, subscrevo, cordialmente,

  
 Profa. Dra. Glaucia Scantamburlo Alves Fernandes  
 Coordenadora da CEUA/UEL

Ilmo. Sr.

**Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verri Junior**

Coordenador do Projeto

Departamento de Ciências Patológicas / Centro de Ciências Biológicas

Com cópia para Coord. do Biotério Central/UEL; Chefe do Departamento de Ciências Patológicas e Diretor(a) do Centro de Ciências Biológicas

## APÊNDICE B

### Instrumento de pesquisa utilizado na coleta de dados



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

#### COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 180/2016

Londrina, 22 de Setembro de 2016.

Prezado Pesquisador,

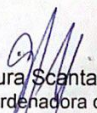
Certificamos que o projeto intitulado "**Avaliação dos mecanismos anti-inflamatórios dos mediadores lipídicos pró-resolução resolvina D5 (RvD5), maresina 2 (Mar2), protectina (PD1), 15-epi-lipoxina A4 (ATLA4) em modelos de colite induzida por ácido acético**", protocolo CEUA nº 11148.2016.83, sob a responsabilidade de **Waldiceu Aparecido Verri Junior**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL), em reunião realizada em **09/08/2016**.

O objetivo do projeto é avaliar a eficácia terapêutica resolvina D5 (RvD5), maresina 2 (Mar2), protectina (PD1) e 15-epi-lipoxina A4 (ATLA4) em modelo de colite e dor abdominal induzido por ácido acético em camundongos. Os animais serão anestesiados com cetamina (80mg/kg, i.m.) e xilazina (10mg/kg, i.m.), e a indução da colite será realizada através da administração intra retal de 200µL de solução de ácido acético 7,5%(v/v) utilizando uma cânula de polietileno. Os animais controle receberão 200µL de salina. Os animais serão tratados com RvD5 ou Mar2 ou PD1 ou ATLA4 por via intraperitoneal. No modelo de hiperalgesia, os animais serão tratados com RvD5 ou Mar2 ou PD1 ou ATLA4 e a hiperalgesia mecânica será avaliada 3 e 17h após a indução da colite. As 4 ou 18 horas após a indução, os animais serão eutanasiados e amostras do cólon dos animais serão coletadas para avaliação da atividade da mieloperoxidase e da N-acetilglicosaminidase, edema, lesões micro e macroscópicas, dosagem de citocinas, avaliação da ativação do NFκB, quantificação da glutatona reduzida (GSH), determinação da capacidade sequestradora do radical ABTS - 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato, sal de diamônio) e determinação do FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power). GI 2.

Vigência do Projeto	01/01/2017 a 01/12/2022
Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / Swiss
Nº de animais	512
Peso/Idade	20-25 g / 2 meses
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central / UEL
Amostras a serem coletadas	Cólon

Cumpra orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UEL anteriormente à execução das modificações.

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessária. Sem mais para o momento, subscrevo, cordialmente,

  
 Profa. Dra. Glaura Scentamburlo Alves Fernandes  
 Coordenadora da CEUA/UEL

Ilmo. Sr.

**Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verri Junior**

Coordenador do Projeto

Departamento de Ciências Patológicas / Centro de Ciências Biológicas

Com cópia para Coordenação do Biotério Central / UEL; Chefe do Departamento de Ciências Patológicas e Diretor(a) do Centro de Ciências Biológicas

## APÊNDICE C

Toxicon 200 (2021) 3–12



Clinical report

Peripheral mechanisms involved in *Tityus bahiensis* venom-induced pain

Camila R. Ferraz<sup>a</sup>, Marília F. Manchope<sup>a</sup>, Ketlem C. Andrade<sup>a</sup>, Telma Saraiva-Santos<sup>a</sup>,  
Anelise Franciosi<sup>a</sup>, Tiago H. Zaninelli<sup>a</sup>, Julia Bagatim-Souza<sup>a</sup>, Sergio M. Borghi<sup>a,b</sup>,  
Denise M. Cândido<sup>c</sup>, Irene Knysak<sup>c</sup>, Rubia Casagrande<sup>d</sup>, Fábio H. Kwamiewski<sup>e,\*</sup>,  
Waldiceu A. Verri<sup>a,e,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Pain, Inflammation, Neuropathy, and Cancer, Department of Pathology, Londrina State University, Londrina, Paraná, Brazil

<sup>b</sup> Center for Research in Health Sciences, University of Northern Paraná, Londrina, Paraná, Brazil

<sup>c</sup> Artificial Laboratory, Botucatu Institute, São Paulo, São Paulo, Brazil

<sup>d</sup> Department of Pharmaceutical Sciences, Centre of Health Sciences, Londrina State University, Londrina, Paraná, Brazil

<sup>e</sup> Department of Pathology, Londrina State University, Londrina, Paraná, Brazil

## ARTICLE INFO

Handling Editor: Glenn King

**Keywords:**  
Cytokines  
Hypersensitivity  
Pain  
*Tityus bahiensis*  
NF-κB

## ABSTRACT

Scorpionism is a public health burden in Brazil. *Tityus bahiensis* is responsible for most accidents in the South-eastern region of Brazil. Here, the hyperalgesic mechanisms of *Tityus bahiensis* venom were investigated, focusing on the role of pro-inflammatory cytokines (tumor necrosis factor alpha [TNF-α] and interleukin 1 beta [IL-1β]) and activation of the transcription factor NF-κB. Intraperitoneal (i.p.) administration of *Tityus bahiensis* venom (0.2, 0.6, 1.2 and 2.4 μg/20 μl i.p.) induced mechanical hyperalgesia and thermal hyperalgesia. The 2.4 μg dose of *Tityus bahiensis* venom induced overt pain-like behavior and increased myeloperoxidase (MPO) and N-acetylmethyl-D-glucosaminidase (NAG) activities, TNF-α and IL-1β levels in the paw tissue. Systemic pre-treatment with antagonist (soluble TNF-α receptor; 10 mg/kg), IL-1ra (IL-1 receptor antagonist; 30 mg/kg) and pyrrolidone dithiocarbamate (PDTC, nuclear factor kappa B [NF-κB] inhibitor; 100 mg/kg) inhibited *Tityus bahiensis* venom-induced mechanical and thermal hyperalgesia, MPO and NAG activity and overt pain-like behavior. These data demonstrate the involvement of TNF-α and IL-1β signaling as well as NF-κB activation in *Tityus bahiensis* venom-induced mechanical and thermal hyperalgesia, overt pain-like behavior, and MPO activity and NAG activity, indicating that targeting these mechanisms might contribute to reducing the pain in this scorpionism.

## 1. Introduction

Scorpionism is a worldwide public health burden with at least 1.2 million stings per year (Chittiporn and Geyffion, 2008; Santos et al., 2016). In 2019, approximately 158,000 scorpionism cases were reported solely in Brazil (Brasil, 2019). Most of these scorpion envenomations were associated with the *Tityus* genus, particularly the species *Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus* (Carmo, 2015). *Tityus bahiensis* sting clinical manifestations include vomiting, tachycardia or bradycardia, tremors, respiratory failure, psychomotor agitation, salivation, lachrymation, increased gastrointestinal mobility, paraesthesia, and pain (Stucchi et al., 2014; Venuti et al., 2008).

So far, most studies investigating *Tityus bahiensis* venom focus on understanding the systemic effects such as neurotoxicity (Lorenzato et al., 2002) and respiratory failure (Miyamoto et al., 2016). *Tityus bahiensis* venom induces edema in rat's paw (Severino et al., 2009) and leukocyte recruitment in rats lung (Miyamoto et al., 2016), and TβH4, a protein isolated from *Tityus bahiensis* venom, induces increased interleukin (IL)-6 and tumor necrosis factor-α (TNF-α) production in rats hippocampus (Neto et al., 2011). The recruitment of neutrophils and macrophages, cytokine production and the transcription factor nuclear factor κB (NF-κB) activation play a key role in hyperalgesia and overt pain-like behavior in several animal models of pain. These effects occur as a consequence of the activation of tissue-resident inflammatory cells

\* Corresponding author. Laboratory of Pain, Inflammation, Neuropathy, and Cancer, Department of Pathology, Londrina State University, Rod. Celso Garcia Cid EM480 PR-445, CEP 06057-970, Cx Postal 10.011, Londrina, Paraná, Brazil.

\*\* Corresponding author. Department of Pathology, Londrina State University, Rod. Celso Garcia Cid EM480 PR-445, CEP 06057-970, Cx Postal 10.011, Londrina, Paraná, Brazil.

E-mail addresses: [fabiohw@uel.br](mailto:fabiohw@uel.br), [fabiohw@uel.br](mailto:fabiohw@uel.br) (F.H. Kwamiewski), [wverri@uel.br](mailto:wverri@uel.br), [waldiceu@pshoon.com.br](mailto:waldiceu@pshoon.com.br) (W.A. Verri).

<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2021.06.013>

Received 27 January 2021; Received in revised form 10 June 2021; Accepted 15 June 2021

Available online 10 June 2021

0041-0101/© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.