



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

CATIA CAMPANER FERRARI BERNARDY

**PARTICIPAÇÃO DA IL-33 NA INFLAMAÇÃO E NO
ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDOS PELO ÂNION
SUPERÓXIDO**

CATIA CAMPANER FERRARI BERNARDY

**PARTICIPAÇÃO DA IL-33 NA INFLAMAÇÃO E NO
ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDOS PELO ÂNION
SUPERÓXIDO**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina.

Orientador: Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verri Júnior.

Londrina
2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

B523p Bernardy, Catia Campaner Ferrari.
Participação da IL-33 na inflamação e no estresse oxidativo induzidos pelo ânion superóxido / Catia Campaner Ferrari Bernardy. – Londrina, 2016.
147 f. il.

Orientador: Waldiceu Aparecido Verri Júnior.
Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Universidade Estadual de Londrina,
Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde,
2016.

Inclui bibliografia.

1. Inflamação - Teses. 2. Interleucina-33 - Teses. 3. Estresse oxidativo - Teses
I. Verri Júnior, Waldiceu Aparecido. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de
Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDU 615.89

CATIA CAMPANER FERRARI BERNARDY

**PARTICIPAÇÃO DA IL-33 NA INFLAMAÇÃO E NO ESTRESSE
OXIDATIVO INDUZIDOS PELO ÂNION SUPERÓXIDO**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verri
Jr.
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dr^a. Gislaine Garcia Pelosi Gomes
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dr^a. Graziela Sciantti Ceravolo
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dr^a. Andressa de Freitas Mendes
Dionísio
Universidade Estadual de Londrina - UEL

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

Londrina, 29 de janeiro de 2016.

*Dedico este trabalho aos meus pais,
que nunca mediram esforços para que
eu realizasse meus sonhos.*

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço imensamente a Deus, ele é o responsável por todas minhas vitórias pessoais, sem sua força e poder não teria chegado ao fim deste processo. Apenas eu sei como ele é presente em minha vida, me tornando uma pessoa melhor a cada dificuldade superada.

À minha família que foi privada de minha atenção e cuidado, ficando por diversas vezes com pouco tempo da minha disponibilidade. Sou grata principalmente pela compreensão dos meus filhos, que aguardavam ansiosos pelo término dos meus estudos e minha dedicação como mãe.

Ao meu orientador Prof.Dr.Waldiceu registro meu profundo agradecimento, por acreditar em mim e me dar a chance de desenvolver um trabalho distante da minha prática profissional. Obrigada também por me proporcionar um aprendizado científico de alta qualidade, contribuindo para minha formação profissional em um novo olhar.

Meu sincero agradecimento a todos os colegas de laboratório, em especial a minha companheira de escala de limpeza Daniela Tagliari Longhi Balbinot pela companhia e amizade.

Agradeço de forma inesquecível meus companheiros e colaboradores diretos: Ana Carla Zarpelon e Felipe Almeida de Pinho Ribeiro, sem a colaboração e paciência de vocês não teria concluído esta jornada. Meu agradecimento de forma carinhosa também a Cássia Calixto Campos e Thacyana Teixeira de Carvalho, pela colaboração nos experimentos e pela paciência com minha inexperiência. Não tenho palavras que demonstre meu carinho por cada um de vocês.

Não poderia deixar de mencionar minha grande amiga e companheira Fabiane Yuri Yamacita Borin. Deus permitiu que nossos caminhos se encontrassem e fico imensamente feliz por ela fazer parte da minha história. Agradeço principalmente por sua presença quando o apoio de um amigo se fazia tão importante.

Agradeço a disponibilidade e dedicação da banca examinadora, por contribuírem com valioso conhecimento. Registro meu agradecimento especial a professora Graziela que dedicou sua atenção para a finalização deste trabalho de forma carinhosa e acolhedora. Professora Graziela você contribuiu para que eu reconhecesse onde posso melhorar, obrigada!

A todos os docentes e funcionários do Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, especialmente a professora Estefânia que se apresentou de forma acolhedora em minha entrevista para ingresso no Programa.

Às agências de fomento pelo suporte financeiro e incentivo à pesquisa.

*"Todos nós sabemos alguma coisa.
Todos nós ignoramos alguma coisa.
Por isso, aprendemos sempre".*

(Paulo Freire)

BERNARDY, Catia Campaner Ferrari. **Participação da IL-33 na inflamação e no estresse oxidativo induzidos pelo ânion superóxido**. 2016. 147 f. Tese (Doutorado Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

RESUMO

As citocinas e o estresse oxidativo são extremamente importantes no desenvolvimento das respostas inflamatórias. Em resposta a um estímulo, células do sistema imune, tais como, neutrófilos e macrófagos ativados são capazes de induzir a síntese de citocinas e outros mediadores. A IL-33 é o mais recente membro da família da IL-1, e atua ao interagir com seu receptor ST2. A IL-33 demonstrou ser essencial no desenvolvimento da hiperalgesia mecânica em modelos de resposta imune inata, desencadeada pela administração de carragenina, bem como no modelo de constrição crônica do nervo ciático. Esta citocina é capaz de ativar o fator nuclear- κ B (NF κ B) e a NADPH oxidase, dessa forma, possivelmente está envolvida na hiperalgesia inflamatória e no estresse oxidativo. Entretanto, esta é a primeira demonstração da participação da IL-33 em um modelo induzido pela administração de um doador de ânion superóxido. Este modelo foi padronizado pelo nosso grupo e a administração de superóxido de potássio (KO₂) induz hiperalgesia mecânica, térmica, edema e dor manifesta de maneira dose-dependente, e pode ser modulada por inibidores da NADPH oxidase e NF κ B. Este estudo engloba 3 objetivos principais: 1) demonstração da participação da IL-33 em modelo de hiperalgesia induzido por ânion superóxido; 2) avaliação da participação do ânion superóxido por meio da administração de um inibidor da NADPH-oxidase (apocinina); e 3) avaliar o efeito de um mimético da SOD (tempol). Foram utilizados camundongos Balb-c (selvagens - ST2^{+/+}), deficientes para o receptor ST2 (ST2^{-/-}). Os resultados obtidos demonstram que a administração de KO₂ induziu a produção de IL-33 na pata (0,5, 1, 3, 5, 7 e 24h) e medula (3, 5, e 7h, 24h), tendo como pico de produção a quinta e sétima hora, respectivamente. Os animais ST2^{-/-} exibiram uma redução estatisticamente significativa na hiperalgesia mecânica, térmica, edema e atividade de mieloperoxidase (MPO) desencadeada pela administração de KO₂. Corroborando com os dados do MPO, os animais deficientes para o ST2 reduziram o recrutamento de leucócitos (leucócitos totais, neutrófilos e células mononucleares). A administração de KO₂ induziu também o comportamento de dor manifesta (contorções abdominais, sacudidas da pata e tempo de lambida) em animais selvagens, o que foi significativamente reduzido nos animais ST2^{-/-}. A capacidade antioxidante foi avaliada pelos métodos de redução do ferro (FRAP) e teste da capacidade de eliminação de radicais livres da amostra (ABTS) e, a produção de ânion superóxido foi avaliada pelo ensaio do nitrozul de tetrazólio (NBT) sendo que os animais ST2^{-/-} apresentaram níveis significativamente menores de depleção na pata e na medula após estímulo com KO₂. Demonstrou-se também que o tratamento com apocinina e tempol foi capaz de preservar a capacidade antioxidante após o estímulo com KO₂. Assim, tanto no local da administração (pata) e no segmento espinal correspondente as patas traseiras (L4-L6) houve depleção dos níveis antioxidantes em animais ST2^{+/+}, o qual foi revertido nos animais deficientes para o receptor. A produção das citocinas pró-inflamatórias TNF α e IL-1 β foram reduzidas pelo tratamento com apocinina e tempol. Conclui-se que o ânion superóxido está associado à interação de IL-33/ST2 para induzir a hiperalgesia e inflamação e parece ser importante na sensibilização dos nociceptores contribuindo para o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio. Portanto, modular o metabolismo do ânion superóxido parece ser uma estratégia promissora para controlar a hiperalgesia inflamatória, a qual pode ser realizada utilizando miméticos da superóxido dismutase (tempol) e inibição da NADPH-oxidase (apocinina).

Palavras-chave: IL33. ST2. Ânion superóxido. Inflamação. Hiperalgesia.

BERNARDY, Catia Campaner Ferrari. **IL-33 participation in inflammation and oxidative stress induced superoxide anion**. 2016. 147 p. Thesis (Doctoral degree in Health Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

ABSTRACT

The cytokines and oxidative stress are extremely important in the development of inflammatory responses. In response to a stimulus, immune system cells, such as activated neutrophils and macrophages, are able to induce cytokines synthesis and other mediators. The IL-33 is the most recent member of IL-1 family, and acts by interacting with its receptor ST2. The IL-33 has shown to be essential in the development of mechanical hyperalgesia in models of innate immune response, triggered by the administration of carrageenan, as well as in the constriction model of the chronic sciatic nerve. This cytokine is capable of activate the nuclear factor- κ B (NF κ B) and the NADPH oxidase, thus, it is possibly involved in the inflammatory hyperalgesic and the oxidative stress. However, this is the first demonstration of participation of IL-33 in an induced model by the administration of a superoxide anion donor. This model was developed by our group and the administration of potassium superoxide (KO₂) induces mechanical and thermal hyperalgesia, edema and pain express in a dose-dependent manner and can be modulated by inhibitors of NADPH oxidase and NF κ B. This study covers three main objectives: 1) demonstration of IL-33 participation in hyperalgesia induced model by superoxide anion; 2) evaluation of participation of the superoxide anion through the administration of a NADPH oxidase inhibitor (apocynin); and 3) evaluate the effect of a SOD mimetic (tempol). The Balb-c mice were used (wild - ST2 ^{+/+}), disabled to the ST2 receptor (ST2^{-/-}). The results obtained demonstrate that the administration of KO₂ induced the production of IL-33 in the paw (0,5, 1, 3, 5, 7 and 24h) and marrow (3, 5, and 7h, 24h), with the production peak at fifth and seventh hour, respectively. The animals ST2^{-/-} showed a significant statistically decrease in mechanical and thermal hyperalgesia, edema and myeloperoxidase activity (MPO) triggered by the KO₂ administration. Corroborating with data from MPO, the disabled animals to the ST2 reduced the leukocyte recruitment (total leukocytes, neutrophils, and mononuclear cells). The KO₂ administration also induced the behavior of manifest pain (abdominal contortions, paw shakes and lick time) in wild animals, which was significantly reduced in ST2^{-/-} animals. The antioxidant capacity was evaluated by iron reduction methods (FRAP) and capacity test of elimination of free radicals in the sample (ABTS) and the superoxide anion production was assessed by the nitroblue tetrazolium test (NBT) wherein the ST2^{-/-} animals showed significantly lower levels of depletion on the paw and marrow after KO₂ stimulation. It was also demonstrated that the treatment with apocynin and tempol was able to preserve the antioxidant capacity after the stimulation with KO₂. Thus, at the site of administration (paw) as well as the spinal segment corresponding to the hind paws (L4-L6), there was depletion of antioxidant levels in animals ST2^{+/+}, which was reversed in disabled animals to the receptor. The production of the proinflammatory cytokines TNF α and IL-1 β were reduced by the treatment with apocynin and tempol. In conclusion, the superoxide anion is associated to the interaction of IL-33/ST2 to induce hyperalgesia and inflammation and it seems to be important in the sensibilization of nociceptors, contributing to increase the production of reactive species of oxygen. Therefore, modulating the metabolism of superoxide anion appears to be a promising strategy to control inflammatory hyperalgesia, which can be performed using mimetics of dismutase superoxide (tempol), and NADPH oxidase inhibition.

Keywords: IL33. ST2. Superoxide anion. Inflammation. Hyperalgesia.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Participação da IL-33 na inflamação e no estresse oxidativo	14
Figura 2 – Cascata de mediadores inflamatórios hiperalgésicos.....	17
Figura 3 – Interação da IL-33 com ST2L e a proteína acessória IL-1RAcP.....	21
Figura 4 – Estrutura da NADPH oxidase fagocítica	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	2,2- aninobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato, sal de diamônio)
ARE	Elemento antioxidante-responsivo
CAT	Catalase
Cg	Carragenina
CO	Monóxido de carbono
COX	cicloxigenase
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
ET-1	Endotelina 1
ET-A	Receptor da endotelina tipo A
FAD	Adenina flavina
FADH2	Adenina flavina reduzida
fMLF	N-formil-metionil-leucylphenylalanine
FRAP	Poder Antioxidante pela Redução do Ferro
GFAP	Proteína fibrilar ácida da glia
GPx	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione reductase
GSH	Glutathione reduzida
GSSG	GSH dissulfeto
GST	Quinona S-transferase
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HO•	Radical hidroxil
HO-1	Heme oxygenase-1
Iba-1	Molécula adaptadora da ligação ao cálcio ionizado
i.p	intraperitoneal
i.pl	Intraplantar
IL	Interleucina
IL1RAcP	Proteína acessória IL1R
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
Keap1	Do inglês <i>Kelch like ECH-associated protein 1</i>
KO ₂	Superóxido de Potássio
KO2	Superóxido de potássio

LTB ₄	Leucotrieno B4
MAPK	Proteínas quinases ativadas por mitógeno
MPO	Mieloperoxidase
NADPH oxidase	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato oxidase
NFκB	Fator nuclear kappa B
NLS	Sinal de localização nuclear
NO	Óxido nítrico
Nrf2	Fator nuclear eritróide 2
O ₂ ^{•-}	Ânion Superóxido
ONOON2	Peroxinitrito
PAF	Fator de agregação plaquetária
PAMPS	Padrões moleculares associados a patógenos
PGE ₂	Prostaglandina E2
PKC	Proteína quinase C
PRRs	Reconhecimento de receptores com padrão codificado
RNA _m	RNA mensageiro
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superóxido Dismutase
ST2	Receptor da IL33
TBARS	Ácido tiobarbitúrico
Th2	Linfócito T <i>helper</i> (auxiliar) do tipo 2
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TNFR	Receptor do Fator de Necrose Tumoral
Toll-like/TLR	Receptor toll like

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	A relação entre processo inflamatório e hiperalgesia	15
1.2	IL-33 e seu receptor ST2	19
1.3	Estímulo inflamatório induzido pelo Superóxido de Potássio	22
1.4	Radicais livres e o estresse oxidativo	23
1.5	Inibidores sintéticos do estresse oxidativo	27
1.6	Fator Nuclear-kappa B (NFκB) e suas vias de sinalização	28
1.7	O complexo enzimático NADPH oxidase	30
2	OBJETIVOS	32
2.1	Objetivo Geral	32
2.2	Objetivos Específicos	32
3	MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1	Animais Experimentais	33
3.2	Protocolo Experimental e Tratamento	34
3.3	Hiperalgesia Mecânica	35
3.4	Hiperalgesia Térmica	35
3.5	Edema	36
3.6	Dor Manifesta	36
3.7	Recrutamento de Leucócitos	36
3.8	Avaliação da Atividade de Mieloperoxidase	37
3.9	Avaliação da Quantificação de Citocinas	37
3.10	Avaliação do Estresse Oxidativo	37
3.10.1	<i>Teste do Poder Antioxidante para Redução do Ferro (FRAP)</i>	37
3.10.2	<i>Teste da Capacidade de Eliminação de Radicais Livres da Amostra (ABTS)</i>	38
3.10.3	<i>Produção de ânion superóxido pelo ensaio do Nitroazul de Tetrazólio (NBT)</i>	39
3.10.4	<i>Ensaio do ácido tiobarbitúrico (TBARS)</i>	39
3.11	Extração do RNA e Análise por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em Tempo Real	39

3.12	Análise Estatística.....	41
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.1	Primeiro Artigo Científico	43
4.2	Segundo Artigo Científico	77
4.3	Terceiro Artigo Científico	104
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	134
	REFERÊNCIAS.....	135
	ANEXO A	145
	ANEXO B	160
	ANEXO C	180

1. INTRODUÇÃO

O processo inflamatório é uma resposta fisiológica do organismo para eliminar os estímulos nocivos e realizar a reparação tecidual, ocorre em resposta a uma injúria celular de origem física, biológica ou química e envolve eventos químicos e celulares. Estes eventos incluem reação dos vasos sanguíneos, liberação de mediadores químicos, recrutamento celular, ativação de enzimas e de receptores (TAKEUCHI; AKIRA, 2010; COLLINS, 2000).

Na resposta inflamatória, os vasos sanguíneos passam de um estado de vasoconstrição inicial para vasodilatação e, desta forma, ocorre aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade vascular no local da lesão. Os leucócitos aderem ao endotélio vascular e transmigram por meio dele sendo atraídos ao local da lesão pelos agentes quimiotáticos. Durante a quimiotaxia e fagocitose, mediadores químicos são liberados, estes podem originar-se do plasma ou de algumas células (COLLINS, 2000; MELLO; LAURINDO, 2000).

As citocinas são mediadores sintetizados em muitos tipos celulares, principalmente por linfócitos e macrófagos ativados, possuem múltiplas funções e podem influenciar na síntese ou ação de outras citocinas. As principais citocinas envolvidas na inflamação são a Interleucina 1 β (IL-1 β) e o Fator de Necrose Tumoral α (TNF α) (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009; COLLINS, 2000) e uma citocina mais recentemente descoberta denominada IL-33.

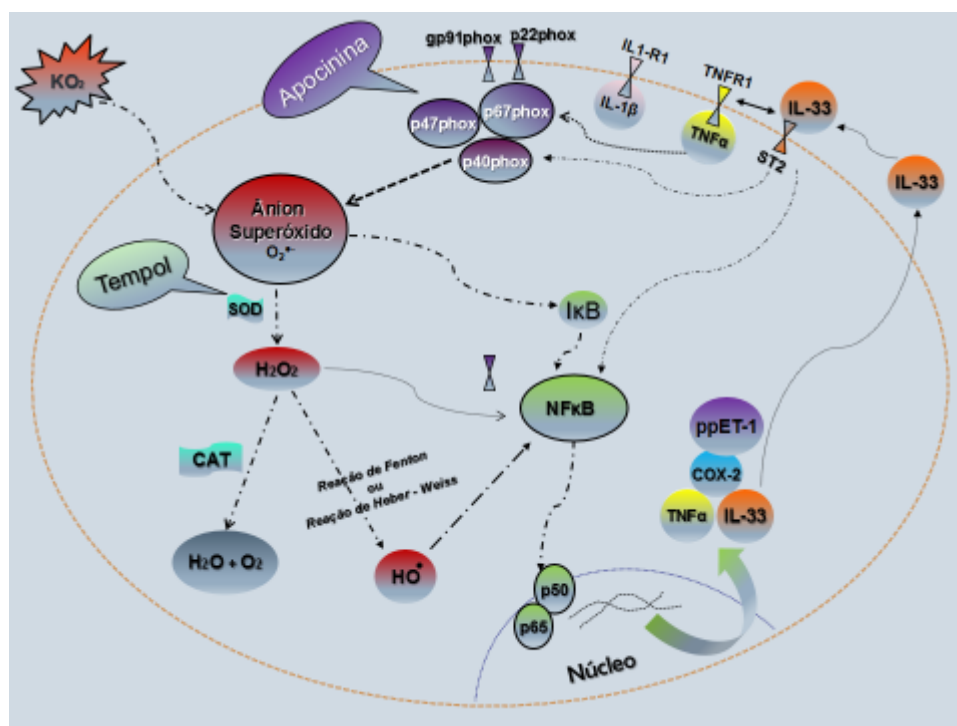
A família da IL-1 possui onze membros, descritas em sua classificação sistemática como IL-1F1 a IL-1F11. A IL-1F11 é o mais recente membro da família da IL-1 e também conhecida como IL-33, um potente quimioatrativo para neutrófilos e está associada a outros mediadores que induzem a migração de células de defesa, como o TNF α (VERRI et al, 2010).

Em estudo com modelo de inflamação induzida por antígeno, foi possível observar que a IL-33 tem papel pró-inflamatório causando hiperalgesia mecânica articular e cutânea em camundongos via produção de TNF α e endotelina-1 (ET-1). O receptor da IL-33, ST2 é expresso em mastócitos, macrófagos e fibroblastos. A interação IL-33 – ST2 é suficiente para acionar a ativação do fator nuclear kappa B (NF κ B) (VERRI et al, 2008) e também a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato-oxidase (NADPH oxidase) (BUCKLEY et al, 2011). A via NF κ B é responsável pela produção de moléculas pró-inflamatória como citocinas e enzimas, entre elas a cicloxigenase-2 (COX-2) e lipoxigenase (FERREIRA et al, 2009).

A NADPH oxidase é um complexo enzimático multiprotéico presente em diferentes tipos celulares. Dentre as proteínas que compõe este sistema pesquisou-se a proteína transmembrana gp91phox/NOX2, altamente expressa em fagócitos como macrófagos e neutrófilos, mas também expressa em neurônios e células endoteliais. A NADPH oxidase é um importante componente da resposta imune e está implicado na lesão tecidual inespecífica (CRUZ, 2010).

Este complexo enzimático reduz o oxigênio molecular em ânion superóxido, considerado um precursor das espécies reativas do oxigênio (ERO) (BURGESS; AGATHOCLEOUS; MARRISON, 2014). Por sua vez, o ânion superóxido gera, por ação da superóxido dismutase, o peróxido de hidrogênio e, por sua vez pela reação de Fenton ou Haber Weiss gera o radical hidroxil (AGUIAR et al, 2007). Este radical é um dos principais responsáveis pelos danos em macromoléculas dos tecidos conectivos, cartilagosos e vascular, bem como pela atividade microbida dos fagócitos (MELLO; LAURINDO, 2000). Ademais, o ânion superóxido pode ativar vias de sinalização intracelular como o NFκB induzindo a produção de citocinas e quimiocinas chaves, que contribuem para modulação da resposta inflamatória. Dessa forma, parece haver um ciclo no qual citocinas induzem a produção de ânion superóxido e o ânion superóxido induz a produção de citocinas. O desequilíbrio entre as EROs e os antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) levam ao estresse oxidativo (RAJENDRASOZHAN et al, 2008) (Figura 1).

Figura 1: Participação da IL-33 na inflamação e no estresse oxidativo (Própria autora)



Dados obtidos pelo Laboratório de Dor, Inflamação, Neuropatia e Câncer do Departamento de Ciências Patológicas da Universidade Estadual de Londrina demonstram que a deficiência no receptor da IL-33, o ST2, reduz o estresse oxidativo nos modelos de intoxicação com tetracloreto de carbono e acetaminofeno (CARDOSO et al, dados não publicados), bem como, essa mesma deficiência aumenta a produção de ânion superóxido e peroxinitrito na artrite séptica (STAURENGO et al, dados não publicados). Dessa forma, ainda é incerto o papel da IL-33 no estresse oxidativo, mas parece haver uma relação com o tipo de estímulo. Foi demonstrado que a IL-33 induz a produção de TNF α e vice-versa (VERRI et al, 2010, 2008). Por sua vez, durante o processo inflamatório a sinalização por TNF α /TNFR1 resulta na ativação da NADPH oxidase com produção de ânion superóxido e os radicais livres consequentes (HSU et al, 2013; OECKINGHAUS; HAYDEN; GHOSH, 2011). Assim, parece existir uma relação entre IL-33 e TNF α , e entre essas citocinas e o estresse oxidativo. De fato, no modelo de inflamação induzida pela carragenina há participação de TNF α (CUNHA et al, 2005, 1992) e IL-33 (ZARPELON et al, 2013) e neste mesmo modelo ocorre estresse oxidativo com redução de glutathiona reduzida (GSH) (VALÉRIO et al, 2009).

1.1 A relação entre processo inflamatório e hiperalgisia

A inflamação é uma resposta importante para a célula e tecido, pois este processo ocorre na tentativa de remover os agentes prejudiciais e tecidos lesionados, e desta forma promover a reparação tecidual (RAJENDRASOZHAN et al, 2008).

O processo inflamatório inicia-se com o reconhecimento do agressor. Sabe-se que as alterações fisiológicas na inflamação induzida por infecção são claras, porém, muitas outras respostas inflamatórias são conhecidas apenas em contextos patológicos. Mas, em grande parte das vezes a inflamação evolui como uma resposta adaptativa mantendo a homeostase do tecido (SOEHNLEIN; LINDBOM, 2010; MEDZHITOV, 2008).

A resposta inflamatória aguda envolve entrega coordenada de componentes sanguíneos para o local da infecção ou lesão. Alguns sinais flogísticos são característicos da inflamação, denominados sinais cardinais, compreendidos em: calor e rubor, devido ao aumento do fluxo sanguíneo; edema, causado pela exudação de fluidos, proteínas plasmáticas e leucócitos; e dor, devido à compressão dos tecidos e ativação dos neurônios periféricos por mediadores inflamatórios finais. Um quinto sinal é identificado como perda da função caso a inflamação aguda não seja resolvida. Nesta situação a resposta inicial não foi suficiente e a inflamação evolui para um

estado crônico (SERHAN et al, 2011; TAKEUCHI; AKIRA, 2010; MEDZHITOV, 2008; FERREIRA; VANE, 1967).

Os primeiros eventos da resposta inata são denominados fase vascular. O reconhecimento imediato do agente nocivo se dá pelos macrófagos residentes e mastócitos, que produzem mediadores inflamatórios como as quimiocinas, citocinas (TNF α , IL-1, IL-6 e outras), aminas vasoativas (histamina e serotonina), eicosanoides (mediadores lipídicos) e produtos de cascatas proteolíticas (elastina, catepsina, metaloproteinasas da matriz). Estes componentes por sua vez causarão de forma direta ou indireta alterações no calibre e na permeabilidade dos vasos, levando ao aumento do fluxo sanguíneo no local da injúria e da permeabilidade vascular, ocorrendo o extravasamento de exudato, formado por líquido, proteína e células imunes (TAKEUCHI; AKIRA, 2010; COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009; MEDZHITOV, 2008).

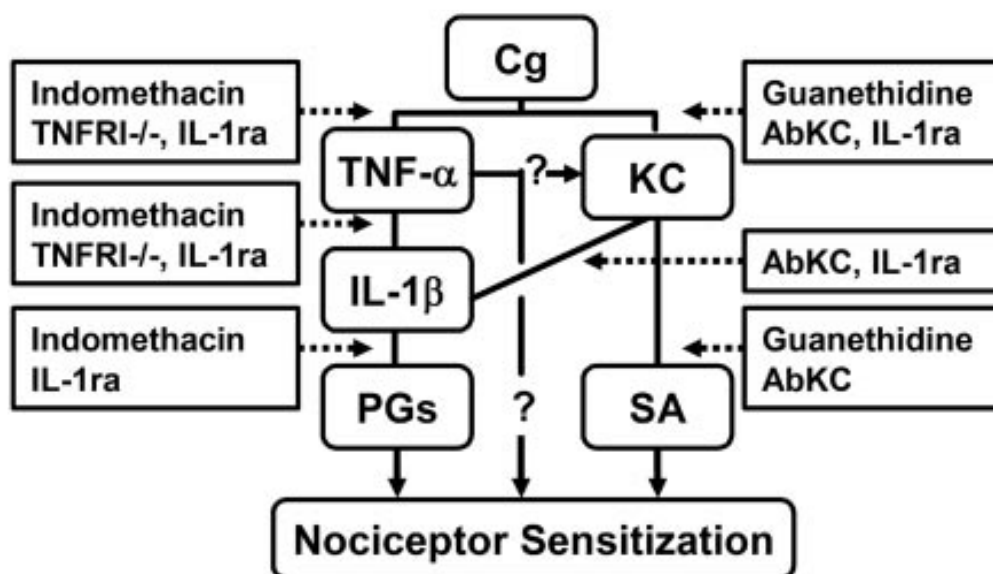
A IL-1 tem influência na produção do peptídeo vasoconstritor ET-1 que é de grande importância no evento vascular inicial. Este peptídeo é uma das endotelinas produzidas por células do endotélio vascular. A ET-1 age no músculo liso vascular por meio do receptor do tipo A (ET-A) causando vasoconstrição, é formada a partir do pré-hormônio pré-pro-endotelina-1, que pela ação de endopeptidases é transformado em *big*-endotelina-1, forma inativa e circulante no plasma. A *big*-endotelina é clivada pelas quimases e metaloproteases e dá origem à forma ativa ET-1 (SLIWINSKA-MASSÓN et al, 2013; ZANATTA et al, 2008).

A próxima fase da inflamação é caracterizada por eventos celulares, e envolve o extravasamento de leucócitos e fagocitose. Os neutrófilos são as principais células a serem recrutadas no início do processo inflamatório, por meio de quimioatrativos como a fração de C5a, peptídeo N-formil-metionil-leucylphenylalanine (fMLF), interleucina 8 (IL-8), fator de agregação plaquetária (PAF) ou leucotrienos B₄ (LTB₄), TNF α e IL-33. Ao chegarem ao local da inflamação são ativados pelo patógeno ou por células residentes e desencadeiam a produção de enzimas, ERO iniciadas a partir do ânion superóxido (O₂^{•-}) e várias citocinas. As ERO são uma das principais causas de lesão celular e tecidual associadas às diversas doenças crônicas, já as citocinas liberadas pelos neutrófilos são responsáveis por ativar outras células de defesa (ARAUJO et al, 2013; VERRI et al, 2010; EL-BENNA et al, 2009; RAJENDRASOZHAN et al, 2008).

Estas citocinas são responsáveis também por estimular os neurônios nociceptivos, atuando de forma ordenada. Cunha & col (2005) em pesquisa com ratos e camundongos estimulados com carragenina e lipopolissacarídeos, afirmam que após o estímulo inflamatório as citocinas são liberadas em uma sequência temporal de liberação e de ação, e define este evento como cascata de citocinas. Estes autores

demonstraram que os estímulos inflamatórios estudados não ativam diretamente o neurônio nociceptivo, mas este papel é realizado pela cascata, que faz a ligação com a lesão e a liberação de mediadores, que conseqüentemente desencadeiam no local os sinais e sintomas da inflamação. Os resultados apresentam o início da cascata de sinalização realizado pelo $TNF\alpha$, que posteriormente leva à liberação de outros mediadores inflamatórios e a sensibilização dos neurônios nociceptivos (Figura 2).

Figura 2: Estímulo inflamatório pela carragenina (Cg) induzindo a cascata de citocinas e hiperalgesia em modelo animal (CUNHA et al, 2005).



Os neurônios sensoriais nociceptivos periféricos são as fibras nociceptivas classificadas como terminações nervosas livres das fibras A-delta e C. O fenômeno sensitivo doloroso inicia-se com a transformação do estímulo em potencial de ação transferido pelas fibras nervosas periféricas ao Sistema Nervoso Central (SNC). Os estímulos intensos alteram as propriedades das membranas dos nociceptores que iniciam o potencial de ação. Quando ocorre lesão tecidual, há a modificação funcional dos neurônios, o que facilita sua ativação. Este fenômeno denominado sensibilização do neurônio nociceptivo primário decorre da redução de seu limiar de ativação e aumento à resposta de um estímulo doloroso, este evento é classificado como hiperalgesia (TEIXEIRA, 2009).

Várias substâncias são consideradas algênicas por sensibilizar os neurônios e causar hiperalgesia, entre elas a bradicinina, a histamina, a substância P, o fator de agregação plaquetária, as prostaglandinas, as citocinas e as interleucinas IL-1 β , IL-6 e IL-8. Estas substâncias são liberadas pelos mastócitos, macrófagos, vasos sanguíneos e células traumatizadas em condições de injúria (TEIXEIRA, 2009). A

substância P, um peptídeo vasoativo, é armazenada na forma ativa em vesículas secretoras e após estímulo é liberada pelos neurônios sensoriais podendo causar a desgranulação de mastócitos. As prostaglandinas, PGE2 e PGI2, são geradas a partir do ácido araquidônico (precursor dos ecosanóides) e provocam vasodilatação, mas também são responsáveis pela hiperalgesia (MEDZHITOV, 2008).

Ainda em relação ao fenômeno sensitivo doloroso e a cascata de sinalização, classifica-se os mediadores responsáveis pelo estímulo em dois grupos. Os primeiros mediadores liberados no início e durante a inflamação são denominados mediadores hiperalgésicos intermediários, sendo os principais e mais característicos da dor inflamatória as citocinas TNF α , IL-1 e IL-8. No outro grupo estão os mediadores hiperalgésicos finais, prostaglandinas e aminas simpáticas, que interagem diretamente com seus receptores específicos nos neurônios nociceptivos aferentes primários, causando as alterações moleculares e desencadeando a sensibilização neuronal. Então, a IL-1 e a IL-8 levam à liberação respectivamente dos mediadores finais prostaglandinas e as aminas simpatomiméticas (FERREIRA et al, 2009). No entanto, sabe-se que o TNF α também ativa diretamente os nociceptores (TAVES et al, 2013).

Há também outras células do SNC envolvidas nas respostas inflamatórias e hiperalgesia, as células gliais. Os astrócitos e as micróglia são tipos celulares gliais. Os astrócitos contêm em seu citoplasma a proteína citoplasmática fibrilar ácida da glia (GFAP), que juntamente com a vimetina formam os filamentos intermediários responsáveis pela sustentação mecânica do tecido nervoso. Estas células formam uma trama nos capilares permitindo o apoio aos neurônios. Quando os astrócitos são ativados aumenta a quantidade de GFAP na proporção de sua ativação (GAO; JI, 2010).

A micróglia desempenha importante papel no Sistema Nervoso Central (SNC) que em situação de injúria é ativada, liberam uma variedade de citocinas e exercem a função fagocítica. Esta célula ao ser ativada expressa a proteína Iba-1 – molécula adaptadora da ligação ao cálcio ionizado, considerada uma molécula chave na fagocitose, envolvida na sinalização de cálcio e na ativação de Rac (GAO; JI, 2010; OHSAWA et al., 2004).

Contudo, conclui-se que as citocinas são produzidas inicialmente pelas células residentes, macrófagos e mastócitos e, posteriormente, por leucócitos recrutados em resposta ao estímulo inflamatório e/ou por micróglia. Além disto, a produção destes mediadores, assim como as espécies reativas de oxigênio, induzem vias de sinalização responsáveis pela produção de mediadores hiperalgésicos finais envolvidos na hiperalgesia (CUNHA et al, 2008; CUNHA et al, 2005).

1.2 IL-33 e seu receptor ST2

A interleucina 33 (IL-33) foi primeiramente denominada DVS27 e como fator nuclear de vênulas do endotélio alto (NF-HEV), mais tarde foi classificada como IL1F11 ou IL-33 por sua estrutura ter homologia aos aminoácidos de IL-18 e características de membros da família IL-1 (CHEN et al, 2014; ITALIANI et al, 2014; TANG et al, 2013; MILLER, 2011).

O RNA mensageiro (RNAm) para IL-33 é expresso em muitos tecidos, no entanto, é limitado na distribuição celular (HO et al, 2013). A IL-33 é encontrada em fibroblastos, em células epiteliais, endoteliais e células imunes como macrófagos e células dendríticas (KAKKAR; LEE, 2008). Também é expresso em astrócitos no SNC (KEMPURAJ et al, 2013).

Esta interleucina é produzida biologicamente em uma forma ativa ou madura por células imunitárias após estímulos celulares, mas também por células de tecido como as células endoteliais, os queratinócitos e fibroblastos (ALI et al, 2011). Este processo de formação é diferente nos outros membros da família de IL-1, que se formam no citosol a partir de um precursor ativado pela caspase 1 mediada pela clivagem proteolítica do domínio N-terminal (NUNES; BERNARDAZZI; SOUZA, 2014). Após o estímulo inflamatório, a IL-33 é exportada extracelularmente e atua no recrutamento de leucócitos podendo induzir a resposta T *helper* 2 (Th2), Th1 e Th17 (CHEN et al, 2014; ITALIANI et al, 2014).

O gene da IL-33 localiza-se no cromossomo 9p24.1 e codifica um peptídeo de 270 aminoácidos. Esta interleucina possui peso molecular de 30 kD (ZHAO; CHEN, 2014), e pode ser clivada pelas caspases 3 e 7 dando origem a uma forma mais leve e menos ativa (20 – 22kD). Ela pode também ser clivada enzimaticamente pelos neutrófilos após exposição à elastase e catepsina G, originando uma estrutura ainda mais leve e mais ativa que o 30kD (18 – 22kD). Contudo, a IL-33 tem um processamento alternativo dos genes sem perda de atividade em comparação à forma de citocina completa. Possivelmente estas formas variantes de IL-33 são parte de um mecanismo autorregulador, onde há um ajustamento da afinidade e da atividade em resposta a diferentes níveis de inflamação (NUNES; BERNARDAZZI; SOUZA, 2014).

Atualmente a IL-33 é considerada uma citocina pleiotrópica, pois ativa células Th1; Th2; T CD8⁺ e células NK, dependendo dos estímulos, o ambiente de citocinas e o tipo de célula envolvida. Ao variar do contexto celular exerce duplo papel, atuando como protetora para infecções parasitárias e sepse ou indutora na produção de citocinas pró-inflamatórias. Desta forma, é um potente indutor de resposta imunitária Th2 e suas citocinas correspondentes, mas também participa como uma citocina de alarme ao tecido circundante, liberada em situação necrótica a fim de acionar o

sistema imune (CHEN et al, 2014; DEMYANETS et al, 2014; LI et al, 2014; LUZ et al, 2014). Então, durante a apoptose a IL-33 é retida no núcleo e ocorre a inativação das suas propriedades pró-inflamatórias, e no processo de necrose é exportada à matriz extracelular atuando como citocina de alarme (LUZ et al, 2014).

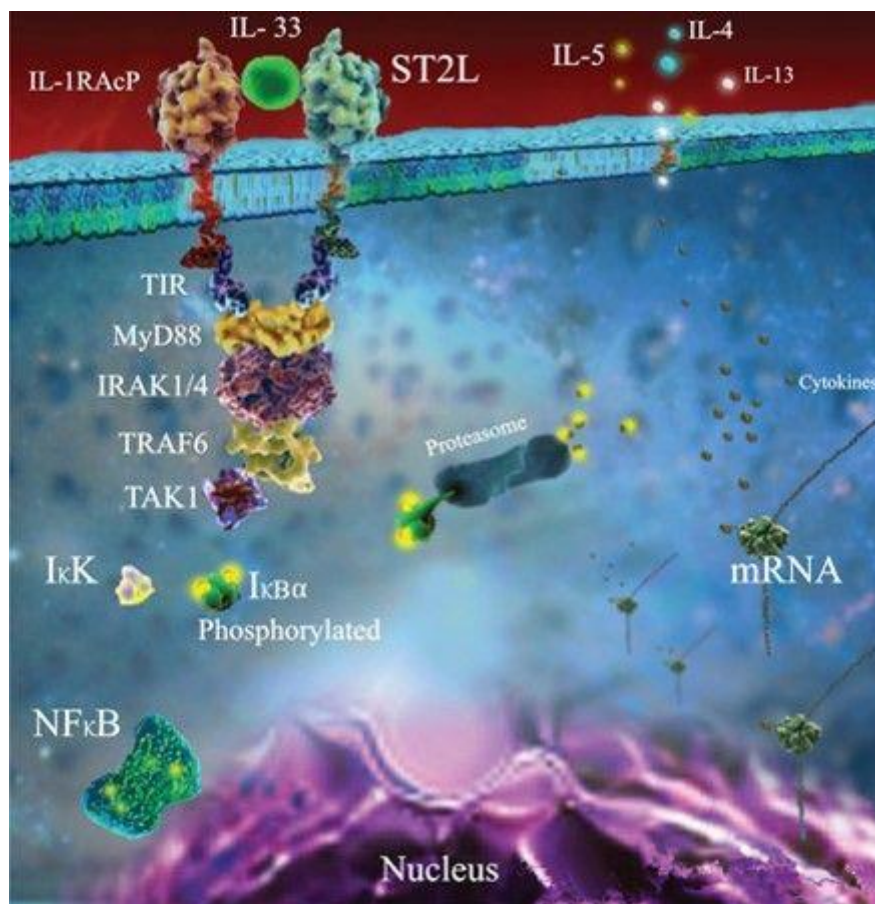
A IL-33 pode atuar tanto como citocina tradicional, por meio da ativação do complexo IL-33/ST2L, ou como um fator nuclear intracelular recrutando proteínas acessórias para sinalização de vias de transcrição (ALI et al, 2011; DEMYANETS et al, 2014; ITALIANI et al, 2014; MILLER, 2011).

Em estudo com células humanas, Ali & col (2011) demonstraram a interação da IL-33 com a via de transcrição NFκB por meio da região p65, necessária para interação com IκBα. Os resultados sugerem que o N terminal de IL-33 contém dois domínios funcionais, um necessário para interação com as histonas e o outro que interage com p65, prejudicando a ligação do NFκB no DNA. Para os autores, a IL-33 atenua a atividade de NFκB em situações que poucas moléculas de p65 são liberadas do complexo IκBα. No entanto, quando houver grande quantidade de p65 pode ocorrer efeito inverso, onde a IL-33 passa a induzir a atividade de NFκB e permite a regulação positiva de moléculas pró-inflamatórias e produção de citocinas (ALI et al, 2011).

Em resposta aos estímulos inflamatórios a IL-33 é liberada a partir de células imunes como basófilos, mastócitos e eosinófilos e liga-se ao receptor ST2L, também denominado T1; IL1RL1; DER4; ST2-RS1; Fit-1 ou Ly-84. O ST2L é uma proteína ligada a membrana que faz parte da superfamília do receptor Toll-like/IL1, e ao ligar-se a IL-33 expressa a proteína acessória IL1R (IL1 RAcP) e iniciando assim o processo de sinalização celular (LUZ et al, 2014; IMAIA et al, 2013; MILLER, 2011; NUNES; BERNARDAZZI; SOUZA, 2014).

A interação de IL-33 com o complexo ST2L/IL-1-RAcP induz o recrutamento do gene de diferenciação mielóide de resposta primária (MyD88/IRAK1/IRAK4) e do fator associado ao receptor de TNF (TRAF6), que por sua vez leva a fosforilação de NFκB e citocinas pró-inflamatórias, ou ainda a ativação da via de proteínas quinases ativadas por mitógenos - MAPK (NUNES; BERNARDAZZI; SOUZA, 2014; LUZ et al, 2014) (Figura 3).

Figura 3: Interação da IL-33 com ST2L e a proteína acessória IL-1RAcP (NUNES; BERNARDAZZI; SOUZA, 2014).



A forma transmembrana do receptor ST2 é expressa em células Th2 e ao ligar-se à IL-33 induz a resposta imunológica Th2 responsável pela fisiopatologia de várias doenças inflamatórias (BUNTING et al, 2013; HO et al, 2013). No modelo de asma induzido por ovoalbumina, Bunting & col (2013) demonstraram que a IL-33 apresenta-se em nível elevado e que promove a expressão de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos. Relatam também que a inibição de IL-33 reduz a inflamação que caracteriza a asma aguda.

Há outras duas isoformas do receptor ST2, uma delas é o polímero solúvel sST2 atuando como chamariz para IL-33 o que bloqueia seu efeito (TANG et al, 2013; MILLER, 2011). Porém, em câncer de mama, Lu & col (2014) demonstraram que os níveis séricos de sST2 estiveram mais elevados em mulheres com câncer de mama, desta forma, esta ocorrência significou associação com fatores que indicam mau prognóstico da doença. A outra isoforma é a ST2V presente no intestino humano. Em relação às outras isoformas possui uma cauda hidrofóbica em vez de terceiro domínio Ig (TANG et al, 2013; MILLER, 2011).

A forma solúvel (sST2) tem sido utilizada como biomarcador para prognóstico de dispneia aguda, síndrome coronariana aguda e como preditor de eventos cardiovasculares em indivíduos saudáveis (HO et al, 2013). Corroborando com esta linha de raciocínio, Wojtczak-Soska & col (2014) realizaram estudo com 167 pacientes cardíacos em tratamento e concluíram que a forma solúvel de ST2 pode ser útil também no prognóstico em curto prazo para pacientes com insuficiência cardíaca crônica.

Diante da literatura descrita sobre a IL-33 e considerando seu papel no processo inflamatório, é possível dizer que esta interleucina apresenta importante influencia em tal evento e que a interação de IL-33 e o receptor ST2 são alvos de potenciais tratamentos para doenças inflamatórias. Porém, permanece obscuro o mecanismo pelo qual a IL-33 é regulada.

1.3 Estímulo inflamatório induzido pelo Superóxido de Potássio

Estímulos exógenos, como substâncias irritantes ao organismo, desencadeiam a infiltração de leucócitos como evento celular da resposta inflamatória. Durante a ingestão de partículas os neutrófilos consomem altas taxas de oxigênio por um mecanismo independente da mitocôndria que culmina na produção de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio (MELLO; LAURINDO, 2000).

O superóxido de potássio (KO_2) é um doador de ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) utilizado por alguns pesquisadores para modelo de inflamação *in vitro* (RAO et al, 2008; CUNNINGHAM; LOKESH, 1983). O papel relevante do $O_2^{\bullet-}$ na fisiopatologia da inflamação tem sido demonstrado pela eficácia dos tratamentos com miméticos da SOD, mostrando a redução dos efeitos secundários indesejáveis de inflamação (WANG et al, 2004).

Entre as importantes funções pró-inflamatórias atribuídas ao ânion superóxido, merecem destaque o dano endotelial e aumento da permeabilidade microvascular, o recrutamento de neutrófilo ao local da inflamação e a destruição auto-catalítica de neurotransmissores (MUSCOLI et al, 2003).

O Laboratório de Dor, Inflamação, Neuropatia e Câncer do Departamento de Ciências Patológicas da Universidade Estadual de Londrina padronizou previamente um modelo de inflamação induzida por KO_2 para avaliar diretamente os efeitos do $O_2^{\bullet-}$ e suas ERO subsequentes (MAIOLI et al, 2015). Em alguns estudos (dados não publicados) foi possível observar a indução do estresse oxidativo plantar e hiperalgesia dependentes de citocinas $TNF\alpha$ e $IL-1\beta$, cuja produção destas está

relacionada à ativação de NFκB. Desta forma, no presente estudo, utilizou-se o modelo de inflamação induzido pelo KO₂.

1.4 Radicais Livres e o Estresse Oxidativo

Os radicais livres são átomos ou moléculas altamente instáveis e reativos que participam das reações de oxirredução. Estes agentes químicos são denominados espécies reativas de oxigênio (ERO) ou espécies reativas de nitrogênio (ERN). A produção destas espécies reativas está presente na fisiologia do metabolismo ao produzir energia, na regulação do crescimento celular, na fagocitose, na sinalização intracelular, na produção de hormônios e enzimas (CAVALCANTE; BRUIN, 2009; GRANGE et al, 2009; RAJENDRASOZHAN et al, 2008). Estas espécies participam da defesa do organismo contra as injúrias e também como mensageiro do sistema autócrino ou parácrino (RAJENDRASOZHAN et al, 2008).

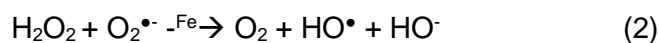
O organismo é constantemente exposto a oxidantes (ERO), que podem ser de origem endógena ou exógena. Os oxidantes de origem endógena, como O₂[•], o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e o radical hidroxila (HO[•]) são formados por peroxissomos, NADPH oxidase (extra mitocondrial), xantina oxidase, mitocôndria e citocromo P-450. Na origem exógena são formados a partir de substâncias capazes de causar a oxidação como a poluição do ar, cigarro, radiação ultravioleta e solventes orgânicos (CANO-DOMÍNGUEZ et al, 2008; FILIPPIN et al, 2008).

O excesso de formação de radicais livres endogenamente pode ser causado por ativação aumentada de fagócitos; interrupção dos processos normais de transferência de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial; escape de íons metálicos do grupo heme de proteínas em locais de lesão, ou ainda por diminuição dos níveis de antioxidantes (FILIPPIN et al, 2008).

Entre as ERO, o O₂[•] e o H₂O₂ tem um importante papel no processo inflamatório. No entanto, a interação do O₂[•] com o óxido nítrico (NO[•]) leva à formação de outra espécie altamente reativa, o peroxinitrito (ONOO⁻) que por sua vez causa depleção de antioxidantes, e quebra de DNA (GRANGE et al, 2009; BARREIROS; DAVID, 2006).

Durante o processo inflamatório o ânion superóxido é produzido, principalmente por neutrófilos e macrófagos, pela NADPH oxidase levando à formação das ERO. Nesta situação o O₂[•] pode mobilizar o ferro da ferritina e é desmutado em H₂O₂ pela SOD. O peróxido de hidrogênio reage com o ferro e gera o radical hidroxila por meio da *Reação de Fenton* (Equação 1). O radical hidroxila é o mais deletério ao organismo, pois possui meia vida curta e dificilmente é sequestrado, ele também pode

ser formado a partir da participação do $O_2^{\bullet-}$ na redução de quelatos de Fe^{+3} pela *Reação de Heber-Weiss* (Equação 2) (ALVES et al, 2010; BARBOSA; MEDEIROS; AUGUSTO, 2006; COLLINS, 2000).



Embora o H_2O_2 não seja considerado um radical livre, pela ausência de elétrons desemparelhados na última camada, está envolvido no estresse oxidativo por transpor membranas celulares com facilidade e gerar o HO^{\bullet} pela *Reação de Fenton* ou por exposição à luz ultravioleta. Quimicamente o H_2O_2 é fracamente reativo e não oxida a maioria das moléculas orgânicas como lipídeos, DNA e proteínas, exceto proteínas com metionina ou grupo tiol muito reativos, como é o caso da glutathiona (GSH) (ALVES et al, 2010).

Em condições fisiológicas o H_2O_2 é eliminado pela catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx) e peroxirredoxinas, as quais atuam em conjunto com a enzima superóxido dismutase (SOD). A CAT tem a função de dismutar H_2O_2 a água e oxigênio, e desta forma evitar o estresse oxidativo (BARBOSA; MEDEIROS; AUGUSTO, 2006).

Embora as ERO desempenhem importante função na sinalização intracelular, sua produção excessiva pode levar à lesão ou morte celular, assim como o estresse oxidativo (YU et al, 2014).

Quando há um desequilíbrio entre a quantidade de oxidantes e antioxidantes em favor aos oxidantes, denomina-se estresse oxidativo. Como consequência deste processo há o aumento de danos a biomoléculas (DNA; lipídeos e proteínas), quando não reparados podem levar a perda da função celular ou morte celular por apoptose ou necrose (FILIPPIN et al, 2008; RAJENDRASOZHAN et al, 2008; BARBOSA; MEDEIROS; AUGUSTO, 2006).

Para combater os efeitos deletérios do excesso de oxidante, o organismo coordena um sistema de defesa endógeno a partir de compostos antioxidantes. Este processo é classificado em duas principais fases de defesa: na primeira denominada primária, a transferrina e a lactoferrina tem o papel de inibir a formação dos radicais livres. Na fase secundária, enzimas como a SOD, CAT e GPx, assim como moléculas não enzimáticas – α -tocoferol; ácido ascórbico; β -caroteno; albumina; mucina; glucoase; bilirrubina e ácido úrico tem função de remover ou inativar as ERO já formadas (RAJENDRASOZHAN et al, 2008).

Ferreira & Matsubara (1997) classificam a defesa do organismo em duas linhas. Uma atua como detoxificadora dos agentes óxido-redutores (ERO) antes que causem lesão celular e a outra responsável por reparar a lesão ocorrida. A linha

detoxificadora é constituída pela GSH, SOD, CAT e GPx, e na linha de reparação atuam o ácido ascórbico, Glutathione Redutase (GR), GPx e vitamina E.

A GSH é um tripeptídeo (L-g-glutamil-L-cistenilglicina) contendo cisteína altamente sensível à oxidação, é o tiol não protéico mais abundante no citoplasma de células dos mamíferos. A GSH atua em conjunto com duas enzimas: a GPx e a GR. A GPx é uma enzima que remove H_2O_2 pela oxidação da GSH, que ao ser oxidada constitui o GSH dissulfeto (GSSG) que pode ser reduzida por uma enzima específica, a GR, regenerando a GSH a partir do GSSG (GHEZZI, 2011; BARBOSA; MEDEIROS; AUGUSTO, 2006). A NADPH tem papel importante na regulação redox, pois é utilizado pela glutathione redutase para converter GSH a GSSG (glutathione oxidada) (YU et al, 2014). Portanto, na inativação das ERO ocorre produção de GSSG e depleção de GSH, em condições de excesso das ERO, haverá desequilíbrio entre o consumo de GSH e produção de GSSG (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Em situação de estresse oxidativo a GSH pode permanecer na forma oxidada não sendo novamente reduzida. Este antioxidante é considerado um inibidor da resposta inflamatória e essencial nas funções do sistema imunitário como na proliferação de linfócitos T e atividade fagocitária de neutrófilos (GHEZZI, 2011).

As enzimas SOD são classificadas conforme sua localização na célula e sua composição. As SOD 1 e 3 tem Cu e Zn no seu centro catalítico e tem função enzimática, no entanto, a SOD 1 (Cu/Zn-SOD) é encontrada no citoplasma, compartimentos nucleares e no espaço entre a membrana da mitocôndria, já a SOD 3 é abundante no pulmão e encontrada também no plasma, linfa e líquido. A SOD 2 (MnSOD) está presente na matriz da mitocôndria, a inativação desta enzima resulta na persistência de altos níveis de superóxido. Em um processo inflamatório a quantidade produzida de ERO é maior do que a quantidade de SOD necessária para a detoxificação do organismo (MANNELLI et al, 2013; MUSCOLI et al, 2003).

O controle dos níveis das ERO é realizado não apenas pelas enzimas antioxidantes, mas também por indução coordenada da codificação genética de enzimas desintoxicantes de Fase II, seguindo uma sequência nuclear localizada na região de genes regulatórios, denominado elemento antioxidante-responsivo (ARE). O elemento alvo desta ligação é o fator nuclear eritróide 2 (Nrf2), uma importante proteína atuando como fator de transcrição nuclear (KIM; ZERIN; SONG, 2013; TANIGAWA et al, 2013). Esta proteína tem função imunomoduladora em neutrófilos e desempenha papel essencial na proteção contra várias doenças inflamatórias (ARAUJO et al, 2013; KIM et al, 2013a).

A ativação de Nrf2 ocorre principalmente pelo processo de sinalização por meio das MAPK e PI3K (TANIGAWA et al, 2013). No entanto, em recente estudo, Cuadrado & col (2014) utilizando cultura de células embrionárias de rim humano

propuseram um novo mecanismo de modulação. Estes autores afirmam que a RAC1, uma pequena proteína GTPase da família Rho, ativa o fator de transcrição NFκB e também induz a ativação de Nrf2 em um processo de retroalimentação. Neste modelo a RAC1 pode induzir a translocação de Nrf2 para o núcleo e aumentar a expressão de heme oxigenase – 1 (HO-1) por meio do eixo ARE, porém, de forma dependente de NFκB. Considerando RAC1 como um mediador no processo inflamatório para os dois fatores de transcrição, Nrf2 e NFκB, que são reguladores mestres de antioxidantes como HO-1 e pró-inflamatória como IL-1β e TNFα, respectivamente, os autores relatam a influencia destes fatores coordenando o destino final das células imunes inatas (CUADRADO et al, 2014).

Em humano o Nrf2 é codificado pelo gene *NFE2L2* e está localizado no citoplasma. Células em condições não estimuladas, o Nrf2 é controlado pela *Kelch like ECH – associado à proteína 1* (Keap 1) que leva à sua degradação no citoplasma o mantendo em baixos níveis (KIM et al, 2013a; CHOI; CHENG; KIM, 2014; TANIGAWA et al, 2013). Já Cuadrado & col (2014) acreditam que a regulação de Nrf2 independe de Keap 1, mas é dependente da RAC1 agindo no NFκB.

Em resposta ao estresse oxidativo, Nrf2 é dissociado de Keap 1, translocado e acumulado no núcleo onde forma complexos heterodiméricos com uma pequena proteína Maf (MafG, MafK, ou MafF) para ligações de alta afinidade para ARE. Ao ligar-se ao ARE é desencadeada a transcrição de enzimas desintoxicantes de Fase II como a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NAD (P) H); a quinona S-transferase (GST); a glutatona peroxidase 2 (GPX2) entre outras (KIM et al, 2013b; LEE et al, 2013; LI; KAWADA; AZUMA, 2013; KOBAYASHI; SUZUKI; YAMAMOTO, 2013).

A isoforma HO-1 é o principal alvo de Nrf2, esta é uma enzima anti-inflamatória e citoprotetora. Ela catalisa a degradação de heme para produzir biliverdina, ferro e monóxido de carbono (CO). As ações destes produtos da degradação do heme contribuem para sua função citoprotetora (CHOI; CHENG; KIM, 2014).

Outro mecanismo de defesa contra as ERO é a utilização de compostos antioxidantes presentes na dieta ou ingeridos como complemento, estes compostos são denominados antioxidantes exógenos ou dietéticos. Entre eles salientam-se a vitamina E, vitamina C, β-caroteno e os flavonoides. A ingestão de vitaminas antioxidantes e oligoelementos participam de forma especial na prevenção de câncer, doenças cardiovasculares, doenças oculares relacionadas à idade e no envelhecimento (WHAYNE; MAULIK, 2012).

A reposição de antioxidantes exógenos por meio de nutrição natural, equilibrada e consumida de forma contínua atua no combate ao estresse oxidativo,

pois os minerais como zinco, cobre, manganês e selênio, assim como as vitaminas C, E e as vitaminas do complexo B contidos na dieta fazem parte da composição estrutural das enzimas antioxidantes. Sabe-se também que alimentos ricos em fibra e componentes bioativos (antioxidantes e fitoesteróis) estão relacionados ao menor índice de desenvolvimento de doenças inflamatórias crônicas e estimulam a resposta imunológica celular (CARVALHO et al, 2012; SARNI et al, 2010; FANHANI; FERREIRA, 2006).

Portanto, os nutrientes com função antioxidante que auxiliam na prevenção do estresse oxidativo e conseqüentemente contribuem com a melhora na qualidade de vida de pacientes portadores de doenças inflamatórias devem ser amplamente conhecidos pelos profissionais de saúde para que compreendam os benefícios de medidas dietoterápicas, entre elas as ações educativas sobre hábitos alimentares saudáveis (ZIMMERMANN; KIRSTEN, 2008).

1.5 Antioxidantes do Estresse Oxidativo

O organismo possui compostos antioxidantes para reduzir o estresse oxidativo como glutatona, ácido ascórbico, ácido úrico, ou enzimas como catalase, glutatona peroxidase e superóxido dismutase. No entanto, algumas vezes este processo torna-se ineficaz. Para isto, várias substâncias foram pesquisadas com o intuito de inibir a produção das ERO e proteger o organismo, entre elas a apocinina um inibidor de NADPH oxidase (STEFANSKA; PAWLICZAK, 2008).

Apocinina (4-hidroxi-3-metoxiacetofenona) é originada da raiz da erva *Picrorhiza kurroa*, amplamente utilizada para tratamento de várias doenças atribuídas a inibição de NADPH oxidase como artrite, asma, arteriosclerose, acidente vascular cerebral entre outras. Possui ação anti-inflamatória e antioxidante por ser um potente inibidor intracelular de ânion superóxido em neutrófilos humanos ativados (JIANG et al, 2013; KLENIEWSKA; MICHALSKA; GORAÇA, 2013; PETRÔNIO et al, 2013; STEFANSKA; PAWLICZAK, 2008; WANG et al, 2013).

O mecanismo de inibição envolve o comprometimento de montagem do complexo NADPH oxidase, desta forma, as proteínas citosólicas p47phox e p67phox deixam de ser translocadas e unidas às frações da membrana (JIANG et al, 2013; KLENIEWSKA; MICHALSKA; GORAÇA, 2013; PETRÔNIO et al, 2013). Este processo ocorre em leucócitos, monócitos, células endoteliais, músculo liso e é dependente da ativação da mieloperoxidase (MPO), a apocinina é ativada pela MPO e pelo H₂O₂ para formar o radical apocinina que em seguida oxida os grupos tiois essenciais à fração de p47phox (STEFANSKA; PAWLICZAK, 2008; HEUMÜLLER et al, 2008). A apocinina

atua também na inibição da expressão de p47phox, p67phox, gp91phox, ERO, óxido nítrico sintase, citocinas pró-inflamatórias e COX-2 (PETRÔNIO et al, 2013; LAFEBER et al, 1999; MATTSSON et al, 1996).

Outra droga utilizada como antioxidante é o tempol (4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametil-piperidina-N-oxilo), membro da família de nitróxidos estáveis, é considerado um mimético da SOD por converter o $O_2^{\bullet-}$ a taxas semelhante a SOD (FRANCISCHETTI et al, 2014; CHATTERJEE et al, 2000).

O tempol é o nitróxido cíclico mais estudado em modelos de doenças animais (LINARES et al, 2013). É um radical livre estabilizado por quatro grupos metílicos. Existe principalmente em três formas; o radical nitróxido, hidroxilamina reduzida, e o cátion oxoamônio oxidado. Durante a transformação do radical nitróxido ao cátion oxoamônio, o Tempol é capaz de dismutar duas moléculas de $O_2^{\bullet-}$ (LI et al, 2013). Este nitróxido tem baixo peso molecular e permeia as membranas biológicas, ele reduz a formação de ERO e ERN por sequestro do superóxido ou por diminuição do ferro intracelular, que conseqüentemente impede a *Reação de Fenton* ou *Haber Weiss* e a formação do radical hidroxil (FRANCISCHETTI et al, 2014; CHATTERJEE et al, 2000).

O tratamento com ambas as drogas tem demonstrado a diminuição da inflamação e da hiperalgesia (KHATTAB, 2006). Portanto, estas drogas foram utilizadas no presente estudo para demonstrar o papel do ânion superóxido na dor inflamatória por meio da diminuição do estresse oxidativo e da produção das citocinas.

1.6 Fator Nuclear-kappa B (NFκB) e suas vias de sinalização

A família NFκB é composta por proteínas que são fatores de transcrição e tem papel principal na resposta imunológica pois regula a expressão de genes essenciais no processo inflamatório e defesa de micro-organismos. Este fator de transcrição está envolvido na sobrevivência e proliferação celular, apoptose e funcionamento do Sistema Nervoso Central (SNC) (OECKINGHAUS; HAYDEN; GHOSH, 2011; FRANCO, 2010).

A NFκB é composta por cinco subunidades, também conhecida por família REL por conterem em sua porção terminal (N-terminal) um domínio amino-terminal de homologia REL (RHD) sendo elas: RelA (p65), RelB, c-Rel e p50 (NF-κB1) e p52 (NF-κB2). As unidades p50 e p52 são formadas após clivagem de precursores maiores, p105 e p100, respectivamente, e, atuam como inibidores da transcrição (OECKINGHAUS; HAYDEN; GHOSH, 2011; FRANCO, 2010). Na parte N-terminal do

RHD há o domínio de ligação ao DNA, enquanto que na região do C-terminal encontra-se o sinal de localização nuclear (NLS) que é essencial ao transporte do NFκB para o núcleo celular (QIN; TAO; CHEN, 2007).

As proteínas de NFκB podem formar homodímeros ou heterodímeros, exceto RelB, que forma apenas heterodímeros. A expressão NFκB refere-se ao heterodímero p50-RelA (p50/p65), que é o principal complexo REL em grande parte das células. Os dímeros de NFκB são inibidos, no citoplasma, pelos inibidores de proteína IκB. Os principais inibidores em mamíferos são IκB-α, IκB-β, IκB-ε, e Bcl-3, sendo o IκB-α mais comumente ativado, ligando-se ao heterodímero p50/p65. A proteína IκB-α pode transportar ativamente proteínas NFκB/REL para o núcleo, assim como exportar estas proteínas do núcleo para o citoplasma, no entanto, IκB-β pode inibir a importação de proteínas ao núcleo, mas não as remove para o citoplasma (QIN; TAO; CHEN, 2007).

O complexo IκB é composto pelas subunidades catalíticas IKKα e IKKβ, responsáveis pela sua fosforilação, e a subunidade regulatória IKKγ (NEMO) (OECKINGHAUS; HAYDEN; GHOSH, 2011, QUIN; TAO, CHEN, 2007). Após um estímulo, a proteína IκB é fosforilada seguida por ubiquitinação (recebe a adição de ubiquitina, pela ação da ubiquitina ligase) e posteriormente é degradada pelo complexo proteossoma. Este processo resulta na translocação do NFκB (p50-p65) para o núcleo onde se liga à região promotora de vários genes como IL-1; TNFα e COX-2 e faz a transcrição gênica (NIEDERBERGER; GEISLINGER, 2008).

Vários estímulos são responsáveis por induzir a atividade da via NFκB, por meio da fosforilação do IκB, entre eles, infecções virais e bacterianas; interação das interleucinas pró-inflamatórias com seus receptores (IL-1β; IL-2) e fator de necrose tumoral (TNF); esgotamento da glutatona reduzida; tensões físicas; sinalizadores de apoptose e de proliferação celular; fatores de crescimento e estresse oxidativo. A desregulação desta via de sinalização está relacionada às doenças inflamatórias, doenças auto-imunes e metabólicas, e câncer (OECKINGHAUS; HAYDEN; GHOSH, 2011; FRANCO, 2010).

A sinalização de NFκB pode ocorrer por duas vias: a via clássica (ou canônica) e a alternativa (não-canônica). As distinções entre as duas vias está nos membros IKK envolvidos na degradação das selectinas de IκB que conseqüentemente leva à formação de diferentes dímeros de NFκB e à ativação de diferentes genes e suas funções biológicas (XIAO, 2004).

Na via clássica ocorre a fosforilação de duas serinas de IκBα (Ser32 e Ser36) pela IKKβ, para posterior ubiquitinação e degradação do IκB pelo proteossoma 26S. Esta via é induzida por receptores de citocinas como receptor do fator de necrose tumoral (TNFR); interleucina 1 (IL-1R); receptores de antígenos e de reconhecimento, incluindo Toll-like 4 (TLR4). Desta forma, é considerada a via mais comum, sendo

associada, por meio da expressão gênica, à inflamação, resposta imunológica inata, antiapoptose, à sobrevivência celular, assim como, no processo fisiológico de desenvolvimento embrionário. O dímero mais comum liberado por esta via é o p50-p65 que transloca para o núcleo e ativa os genes alvo (OECKINGHAUS; HAYDEN; GHOSH, 2011; CECON, 2010; FRANCO, 2010, QUIN; TAO, CHEN, 2007; XIAO, 2004).

A via de sinalização alternativa depende da fosforilação de IKK α mediada pela degradação parcial de p100 pelo proteossoma gerando o complexo p52-RelB. Este dímero transloca-se para o núcleo ativando expressão de genes envolvidos nos órgãos linfóides. Esta via é ativada por diversos sinais inflamatórios, imunoreceptores, proteínas de apresentação do antígeno, genes de resposta ao estresse, endotoxinas bacterianas entre outras (OECKINGHAUS; HAYDEN; GHOSH, 2011; CECON, 2010; FRANCO, 2010, QUIN; TAO, CHEN, 2007; XIAO, 2004).

O NF κ B está presente em neurônios centrais e periféricos, os dímeros mais comumente encontrados são p50-p65 e p50-p-50, porém, não há muitos relatos sobre quais genes são ativados no SNC, vários estímulos que ativam o NF κ B no sistema imunológico também podem atuar no SNC, entre eles, as citocinas TNF e IL-1 e o estresse oxidativo (FRANCO, 2010). Estes elementos são de grande interesse para o presente estudo, uma vez que estas citocinas estão envolvidas na nocicepção.

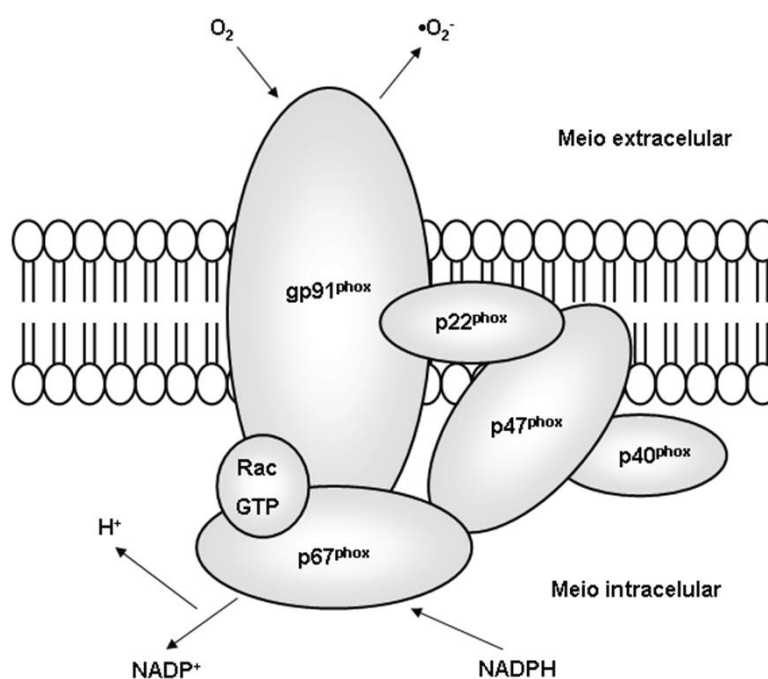
1.7 O complexo enzimático NADPH oxidase

O protótipo da Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato (NADPH) oxidase é composto por um complexo proteico que possui subunidades citosólicas, subunidades ligadas à membrana e o GTPase (Rac 1 ou Rac 2). A pequena proteína G Rac1 é expressa em monócitos e a Rac2 em neutrófilos. As proteínas citosólicas são subunidades reguladoras (p47phox; p67phox; p40phox) e as subunidades ligadas à membrana (gp91phox e p22phox) formam o flavocitocromo b558, considerado o núcleo catalítico (LASSÈGUE; GRIENDLING, 2010; EL-BENNA et al, 2009; CANO-DOMÍNGUEZ et al, 2008; BEDARD; KRAUSE, 2007) (Figura 4). A separação destas subunidades em compartimentos distintos garante a regulação do complexo enzimático (CANO-DOMÍNGUEZ et al, 2008).

A ativação da NADPH oxidase ocorre pela fosforilação de p47phox que migra para a membrana e juntamente com a Rac, liga-se ao flavocitocromo b558, iniciando a atividade catalítica da enzima (RABÊLO et al, 2010; MACÍAS-PÉREZ et al, 2013; EL-BENNA et al, 2009; CANO-DOMÍNGUEZ et al, 2008). Após sua montagem os elétrons passam do NADPH para uma flavoproteína de membrana denominada flavina-

adenina-dinucleotídeo (FAD), e posteriormente para a subunidade gp91phox que transporta os elétrons da subunidade ativa de NADPH oxidase responsável pela redução do oxigênio molecular a ânion superóxido e subsequente formação das ERO e ERN (LASSÈGUE; GRIENGLING, 2010; BEDARD; KRAUSE, 2007; DUSTING; SELEMIDIS; JIANG, 2005) (Figura 4). As ERO podem também ser liberadas para o espaço extracelular (BEDARD; KRAUSE, 2007). Sabe-se que as ERO podem ativar as enzimas NOX e aumentar sua própria produção em uma retroalimentação positiva (LASSÈGUE; GRIENGLING, 2010).

Figura 4: Estrutura da NADPH oxidase fagocítica (RABÊLO et al, 2010).



A classificação das sete subunidades deste complexo enzimático pode ser representada também como NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1 e DUOX2, estes dois últimos inicialmente reconhecidos como oxidases da tireóide (COONEY; BERMUDEZ-SABOGAL; BYRNES, 2013).

As enzimas NOX podem mediar funções distintas na mesma célula, pois respondem a diferentes estímulos, participam de diferentes mecanismos e se localizam em diferentes locais (LASSÈGUE; GRIENGLING, 2010; ZHANG et al, 2014; BEDARD; KRAUSE, 2007). Estas enzimas estão envolvidas na sinalização intracelular para regular a sobrevivência das células, no entanto, em condições patológicas

contribuem para a inflamação (MACÍAS-PÉREZ et al, 2013; LASSÈGUE; GRIENDLING, 2010).

A gp91phox/NOX2 é considerada um complexo redox transmembranar por ligar o doador de elétron NADPH (no lado citosólico da membrana) ao elétron de oxigênio (no lado externo da membrana), esta transferência de elétrons segue várias etapas. Na primeira etapa, os elétrons são transferidos de NADPH a FAD, sendo este processo regulado pela ativação de p67phox. Na segunda etapa, um único elétron é transferido FADH2 (flavina reduzida) para o grupamento heme interior da molécula. O heme interior doa seu elétron para o heme exterior e o oxigênio é ligado ao heme exterior para aceitar o elétron de NOX2 (BEDARDE; KRAUSE, 2007).

A expressão de NOX2 em células fagocíticas está presente em grande número de tecidos como o timo; intestino delgado; cólon; baço; pâncreas; ovário; placenta; próstata e testículo. Em células não fagocíticas está presente em neurônios; cardiomiócitos; miócitos do músculo esquelético; hepatócitos; células endoteliais e células-tronco (BEDARDE; KRAUSE, 2007).

Em células fagocíticas a NOX2 pode estar localizada na membrana plasmática associada a p22phox ou intracelular, particularmente nos grânulos secundários e terciários, apresenta-se neste local quando a célula está em repouso. Após estimulação do fagócito, a NOX2 transloca-se à superfície da membrana, porém, a NOX2 também pode ser ativada no interior dos grânulos sem a necessidade de fundir-se à membrana celular (YU et al, 2014; BEDARDE; KRAUSE, 2007).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Verificar a participação da IL-33 na inflamação e no estresse oxidativo induzido pelo ânion superóxido.

2.2. Objetivos específicos

Avaliar a indução de produção de IL-33 pelo superóxido de potássio (KO₂);

Avaliar se a inflamação e hiperalgesia induzida pelo KO₂ em animais deficientes para ST2 é dependente da IL-33;

Avaliar a resposta de dor manifesta e a migração leucocitária em animais deficientes para ST2 induzidos por KO₂;

Avaliar a inibição da hiperalgesia e do estresse oxidativo utilizando um inibidor da NADPH oxidase (apocinina) e um mimético da SOD (tempol);

Avaliar a produção de citocinas pró-inflamatórias em animais tratados com apocinina e tempol;

Avaliar a expressão de RNAm para preproET-1, gp91phox/NOX2, Nrf2, Gfap, Iba-1, COX-2, em animais deficientes para ST2 e animais tratados com apocinina e tempol;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais Experimentais

Os experimentos foram realizados utilizando-se camundongos da linhagem Balb-c (ST2^{+/+}) e deficientes para o receptor ST2^{-/-}, machos, com massa corpórea entre 20 e 25g. Os camundongos Balb-c e os ST2^{-/-} foram fornecidos pelo biotério central da Universidade de Medicina de Ribeirão Preto - USP de Ribeirão Preto.

Os animais Balb-c são animais isogênicos, ou seja, são considerados geneticamente iguais, pois são obtidos pelo cruzamento entre irmãos da mesma geração. Estes cruzamentos asseguram um alto grau de consanguinidade, fixando algumas características e perdendo outras. Os animais são de porte menor, e possuem menor número de filhotes por ninhada quando comparados com os animais heterogênicos (CARVALHO PINTO, 2015; USP, 2015).

A linhagem Balb-c, amplamente utilizada em diversas áreas de pesquisa, é muito utilizada em pesquisas do sistema imune por apresentar um perfil de citocinas de padrão Th2 (CARVALHO PINTO, 2015; USP, 2015).

Os camundongos foram selecionados inteiramente ao acaso, pois os animais eram similares - da mesma raça, sexo, idade e peso semelhante no início do experimento (VIEIRA; HOFFMAN, 1989). Os grupos foram formados por seis animais e os tratamentos foram feitos em duplicata. O número de animais por grupo foi definido baseando-se em literaturas já existentes e por constituir uma quantidade mínima para análise estatística (WU et al, 2007).

Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com as normas estabelecidas pelo Comitê de Ética em Experimento Animal da Universidade Estadual de Londrina. Os camundongos ficaram no biotério em ciclo claro/escuro (12h/12h), com livre acesso a água e ração. A pesquisa foi aprovada pelo Comitê sob parecer CEUA-UEL nº 7706.2013-42.

3.2 Protocolo Experimental e Tratamento

Os estímulos inflamatórios por meio do doador de ânion superóxido, o superóxido de potássio (KO₂), foram administrados por via subcutânea intraplantar ou intraperitoneal (VERRI et al, 2007). A dose administrada de KO₂ foi 30 µg em 25 µL de solução salina via intraplantar (i.pl.) e de 1000 µg por via intraperitoneal (i.p.), esta para avaliação da dor manifesta nas contorções abdominais nos grupos ST2^{+/+} e ST2^{-/-} e recrutamento de leucócitos. Estas doses foram padronizadas previamente pelo Laboratório de Dor, Inflamação, Neuropatia e Câncer do Departamento de Ciências Patológicas da Universidade Estadual de Londrina (MAIOLI et al, 2015). Animais inoculados somente com solução salina foram utilizados como controle.

Os experimentos de hiperalgesia mecânica, térmica e edema foram avaliados nos intervalos de tempo basal, 0,5, 1, 3, 5 e 7 horas para os animais deficientes para o receptor ST2 e nos intervalos de tempo basal, 1, 3 e 5 horas para os animais tratados com apocinina ou tempol. Os camundongos foram eutanasiados com isoflurano inalatório e a avaliação da migração de leucócitos na cavidade peritoneal e contagem de células foram avaliadas na sexta hora. A avaliação da atividade da mieloperoxidase (MPO) na pata foi realizada na sétima hora, enquanto o estresse oxidativo; dosagem de citocinas; expressão de preproET-1; gp91phox/NOX2, COX-2; GFAP e Iba-1 ocorreram na terceira hora.

Alguns experimentos foram realizados com tratamento prévio com apocinina 30 mg/Kg (i.p.) diluído em DMSO 1% em solução salina e tempol 100 mg/Kg (i.p.) em solução salina, 30min e 40min, respectivamente, antes da administração do estímulo KO₂ (i.pl.) nos camundongos Balb-c. Um grupo de animais Balb-c sem tratamento prévio e com administração do estímulo e um grupo apenas com solução salina foram avaliados simultaneamente nos experimentos.

As doses de apocinina e tempol utilizadas para os experimentos foram resultado de uma padronização inicial. Para determinar estas doses foram avaliados hiperalgesia mecânica e térmica e edema de ambas as drogas nas doses de 10, 30 e 100 mg/Kg induzidos por KO₂.

Estudo realizado por Yamacita (2013), dados não publicados, descreve que o DMSO a 1% não possui efeito analgésico, para isso, ela avaliou a hiperalgesia mecânica, térmica e edema em camundongos WT com solução de DMSO 1% (i.p.) + KO₂, outro grupo KO₂ e um grupo salina.

3.3 Hiperalgesia Mecânica

A avaliação da hiperalgesia mecânica foi realizada por meio de analgesímetro com filamentos de Von Frey (Modelo 1601C, Life Science Instruments). Este aparelho consiste em um transdutor de pressão adaptado a um contador digital de força expressa em gramas (g). O contato do transdutor de pressão com a pata dá-se por meio de uma ponta descartável de polipropileno. Os animais foram colocados em gaiolas de acrílico com a base inferior constituída por rede de arame não maleável 15 minutos antes da primeira medição para adaptação ao ambiente. Para realizar a medida, aplicou-se pressão linear crescente no centro da planta da pata do camundongo até que o animal produzisse uma resposta caracterizada com sacudida (*flinch*) da pata estimulada. Realizou-se uma medição antes da administração do estímulo, ou seja, no tempo zero, e posteriormente ao estímulo nos tempos determinados. Considerou-se a média de três medições. Os resultados foram relatados como o delta (Δ) da força (g), sendo calculado subtraindo o valor das medições após o estímulo do tempo zero. A intensidade de hiperalgesia foi quantificada como a variação na pressão (Δ de reação em gramas) obtida (CUNHA et al, 2004).

3.4 Hiperalgesia Térmica

A hiperalgesia induzida por estímulo térmico foi avaliada de acordo com o método descrito previamente (VERRI et al, 2005). Para este experimento, os camundongos foram transferidos para placa de metal mantida por uma fonte de calor a 55°C. A resposta ao estímulo térmico foi avaliada pelo comportamento de sacudidas da pata e sapatado ou lambida. O tempo máximo para permanência na placa quente foi de 30 segundos para evitar lesão tecidual (TRIBUTINO et al, 2010; LI et al, 2014).

3.5 Edema

Para avaliação do edema induzido pelo KO_2 , mediu-se a espessura da pata com auxílio de um paquímetro (Digimatic Caliper, Mitutoyo Corporation, Kanagawa, Japan). O edema foi calculado como a diferença entre as medidas das patas injetadas no tempo zero (sem estímulo) e medida das patas dos grupos experimentais nos diferentes intervalos de tempo após a administração do estímulo (FERREIRA, 1979).

3.6 Dor Manifesta

A avaliação da dor manifesta foi realizada por meio do teste do número de contorções abdominais. O estímulo foi injetado na cavidade peritoneal do animal, e logo após cada animal foi colocado num cilindro de vidro grande, um por vez, sendo que a intensidade do comportamento nociceptivo foi quantificada pela contagem do número total de contorções abdominais ocorridas entre 0 e 20 minutos após a administração do estímulo. A resposta de contorções abdominais consiste de uma contração do músculo abdominal, juntamente com um alongamento de membros posteriores (COLLIER et al, 1968).

No teste do número de sacudidas e tempo de lambida os animais foram colocados em compartimentos de vidro transparente, um por vez, após a administração intraplantar do estímulo. O número de elevações e o tempo gasto lambendo a pata foram determinados entre 0 e 30 minutos após a administração do estímulo (HUNSKAAR; HOLE, 1987).

3.7 Recrutamento de Leucócitos

A migração leucocitária foi analisada 6 horas após a administração do estímulo inflamatório (KO_2) via intraperitoneal. Os animais foram eutanasiados com isoflurano, e as células foram coletadas da cavidade intraperitoneal por lavagem com 2 mL de tampão fosfato. A contagem do número total de células foi realizada em câmara de Neubauer em solução de Turk. A contagem diferencial foi realizada pelo preparo, os quais foram corados pela técnica de Panótico rápido e as células diferenciadas foram contadas em microscópio óptico através da objetiva em óleo de imersão (aumento de 100x). Os resultados foram apresentados como o número de células por cavidade (VERRI et al, 2007).

3.8 Avaliação da Atividade de Mieloperoxidase

A quantificação da migração de neutrófilos ao tecido subcutâneo plantar foi realizada indiretamente pela atividade da mieloperoxidase (MPO). O método indireto utilizado foi o ensaio cinético-colorimétrico da MPO (CASAGRANDE et al, 2006). Após 7 horas da administração do estímulo, os camundongos foram eutanasiados com isoflurano e amostras de tecido subcutâneo plantar foram colhidos em 50 mM de K_2HPO_4 tampão (pH 6,0) contendo Brometo de hexadeciltrimetilamônio 0,5% (HTAB) e mantida a $-80^\circ C$ até a utilização. As amostras foram homogeneizadas utilizando um Polytron (PT3100), sendo centrifugadas a 16.100 g, $4^\circ C$, durante 2 minutos, e o sobrenadante resultante utilizado para o ensaio da atividade de MPO. As absorvâncias das amostras foram registradas em espectrofotômetro de microplacas (ThermoScientific, MultiskanGO) em comprimento de onda de 450 nm, com três leituras em 1 min. A atividade da MPO das amostras foi comparado com uma curva padrão de neutrófilos. Os resultados foram apresentados como a atividade de MPO, ou seja, número de neutrófilos por miligrama de tecido.

3.9 Avaliação da Quantificação de Citocinas

Para o teste de dosagem de citocinas, foi avaliada a quantidade de IL-1 β , TNF- α e IL-33 no tecido plantar e medula dos grupos salina; ST2; tratados com tempol e apocinina, e no grupo com estímulo. As amostras de tecido plantar foram coletadas na 3^o hora após o estímulo com KO_2 (30 μg , i.pl.), homogeneizadas (Polytron®) em tampão para dosagem de citocinas utilizando kits comerciais de ELISA de acordo com as normas do fabricante (eBioscience, Ready-SET-Go). Os resultados foram obtidos comparando a densidade óptica com as densidades das curvas padrões. As citocinas foram também quantificadas por PCR.

3.10 Avaliação do Estresse Oxidativo

3.10.1 Teste do Poder Antioxidante pela Redução do Ferro (FRAP)

Este teste é um dos ensaios que mede a capacidade antioxidante total da amostra. Testa a força antioxidante, baseia-se na habilidade de um composto em

produzir Fe^{2+} a partir de Fe^{3+} , desta forma define-se sua força antioxidante por meio de reações de transferência de elétrons (VASCONCELOS et al, 2007).

O ensaio de FRAP mede a mudança na absorvância a 593 nm devido à formação de um composto de cor azul, ferroso-tripiridiltriazina (Fe^{2+} -TPTZ), oxidado pela doação de elétrons presente na amostra. Foi utilizada 1,5 ml do reagente de trabalho FRAP aquecido até 37 °C e a leitura do reagente controle foi realizada em 593 nm. Subsequentemente, 50 μL da amostra de tecido da pata e 150 μL de água desionizada foram adicionadas ao reagente FRAP e essa mistura foi incubada a 37 °C por 4 minutos. Foi realizada leitura da absorvância após 4 minutos de incubação. A capacidade de redução do ferro foi calculada como porcentagem de reduzir o ferro à partir de uma curva padrão de Trolox (unidade de concentração). Os resultados foram expressos como equivalente Trolox por mg de peso de tecido (HOHMANN et al, 2013).

3.10.2 Teste da Capacidade de Eliminação de Radicais Livres da Amostra (ABTS)

Este ensaio é baseado na inibição da absorvância do radical catiônico 2,2 - azinobis 3-etilbenzotiazolino 6-sulfonato ($\text{ABTS}^{\bullet+}$), que se dá pela captura do radical presente na amostra. Esse radical tem espectro de absorção máxima a 734 e 820 nm. Para o estudo, a solução ABTS_+ foi diluída com tampão fosfato pH 7,4 (PBS) a uma absorvância de 734 nm e equilibrada a 30°C. Foi realizada a medição do $\text{ABTS}^{\bullet+}$ sem amostra, ou seja, controle, e após a medição do $\text{ABTS}^{\bullet+}$ contendo a amostra. A amostra foi preparada com 2,0 mL de ABTS solução diluída e 2 mL da amostra de tecido da pata. As amostras foram incubadas durante 6 minutos à 30°C e a absorvância foi determinada exatamente aos 6 minutos após incubação para todas as amostras. Todas as medições foram realizadas em quatro repetições. A porcentagem de inibição do $\text{ABTS}^{\bullet+}$ pela amostra foi calculado de acordo com a fórmula: % Inibição = $[(\text{Abs}_{\text{Branco}} - \text{Abs}_{\text{amostra}}) / \text{Abs}_{\text{Branco}}] \times 100$.

A capacidade de eliminação do radical da amostra foi calculada como porcentagem de sequestrar $\text{ABTS}^{\bullet+}$ equiparado contra uma curva padrão de Trolox (unidade de concentração). Os resultados foram expressos como equivalente Trolox por mg de peso de tecido (HOHMANN et al, 2013).

3.10.3 Produção de ânion superóxido pelo ensaio do Nitroazul de Tetrazólio (NBT)

A quantificação da produção de ânion superóxido no homogenato de tecido (10 mg / mL em 1,15% de KCl) foi realizada utilizando o ensaio de nitroazul tetrazólio (NBT) modificado por Choi et al (2006). Este ensaio consiste em incubar 50 μ L de homogeneizado com 100 μ L de NBT (1 mg / mL) em placas de 96 poços a 37° C durante 1h. O sobrenadante foi então cuidadosamente removido e o formazan solubilizado reduzido pela adição de 120 μ L de 2 M de KOH e 120 μ L de DMSO. A redução do NBT foi medida a 600 nm utilizando um espectrofotômetro leitor de microplacas (Multiskan GO, Thermo Scientific). Os resultados foram apresentados como densidade óptica (CHOI et al, 2006).

3.10.4 Ensaio do ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foram utilizadas para avaliar a peroxidação lipídica (LPO). Para este ensaio o tecido da pata e amostras da medula espinal foram recolhidos 3 horas após o estímulo com KO_2 (30 μ g em 25 μ L/ i.pl.), para determinar os níveis de TBARS utilizando um método previamente descrito (Guedes et al, 2006). O ácido tricloroacético (TCA) a 10% foi adicionado ao homogenato e a mistura foi centrifugada (1000 g, 3 min, 4 ° C) para precipitar as proteínas. O sobrenadante livre de proteína foi em seguida separada e misturada com o ácido tiobarbitúrico (TBA) a 0,67%. A mistura foi mantida em banho-maria por 15 min a temperatura de 100 ° C. Malondialdeído (MDA), um produto intermediário da peroxidação de lipídeos, foi determinado pela diferença entre as absorvâncias a 535 e 572 nm utilizando um espectrofotômetro leitor de microplacas. Os resultados são apresentados como nmol de MDA por mg de tecido.

3.11 Extração do RNA e Análise por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em Tempo Real

As amostras de tecido plantar e medular foram isoladas e estocadas a temperatura de -80°C. Materiais plásticos e soluções livres de RNase foram usados em todo procedimento. No momento do processamento, foi acrescentado 1mL de reagente Trizol (Gibco - Invitrogen Corporation, Grand Island, NY, USA) e em seguida as amostras foram homogeneizadas (Polytron Aggregate, PT 3100) para a extração do RNA total. Dois microgramas do RNA total foram transcritos por ação da enzima transcriptase reversa Superscript II (Gibco - Invitrogen Corporation, Grand Island, NY,

USA). O DNAc assim obtido foi usado para amplificação específica do RNAm de interesse (VERRI et al, 2008). A expressão quantitativa de RNAm foi analisada por meio de reações de PCR em Tempo Real, utilizando-se o sistema SYBRGreen em aparelho ABI5700 (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido). Para as reações de PCR em Tempo Real, foram utilizados 12,5µL do reagente SYBRGreen Master Mix (Applied Biosystems - que contém fluoróforo SYBRGreen 1; enzima polimerase AmpliTaq Gold; DNTPs com dUTP; fluoróforo ROX, utilizado como referência passiva para normalização dos níveis de fluorescência; e os demais componentes de tampão, (já devidamente otimizados), 5µL da solução de DNAc (sintetizado como previamente descrito), 3,5µL de água MiliQ tratada com DEPC, e 4µL da solução contendo cada *primer* (0,1 µg/µL - a partir de uma solução stock, na qual cada primer se encontra na concentração de 5 µg/µL). A reação de amplificação compreende basicamente 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, e quarenta ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 58°C, além de um ciclo final de vinte minutos, com temperatura crescente de 60 a 95°C, empregada para a obtenção de uma curva de dissociação dos produtos da reação, utilizada para a análise da especificidade de amplificação. Previamente, as reações de PCR em Tempo Real foram otimizadas com relação as concentrações ideais de cada par de *primers* e temperatura de anelamento, de modo a maximizar eficiência e a especificidade de amplificação. O sistema utilizado realiza as reações de amplificação e detecção, e quantifica as amostras (termociclador ABI5700 associado ao Software ABI Prism, Applied Biosystems) por meio da análise do nível de fluorescência gerado pela incorporação de nucleases fluorogênicas (SYBRGreen 1) aos produtos de amplificação durante o curso da reação. Os resultados foram analisados com base no valor de Ct (*cicle threshold* – ou ciclo limiar), sendo este o ponto correspondente ao número de ciclos onde a amplificação das amostras atinge um limiar (determinado entre o nível de fluorescência dos controles negativos e a fase de amplificação exponencial das amostras) que permite a análise quantitativa da expressão do fator avaliado. Todas as amostras também foram submetidas a reações para a detecção de RNA mensageiro para Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (Gapdh), um gene de expressão constitutiva, utilizado como controle positivo da reação de amplificação. Além disso, os níveis de expressão de Gapdh foram utilizados para a normalização dos níveis de expressão do gene alvo. Uma amostra negativa (água) será submetida à reação com cada par das seqüências dos *primers* utilizados (Verri et al, 2008). Foi avaliada a expressão de RNAm para: IL-1β, TNFα, preproET-1, COX-2, gp91phox/NOX2, Nrf2, Gfap e Iba-1.

3.12 Análise Estatística

A normalidade dos resultados foi testada por meio do Teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade de variância avaliada pelo Teste Levene. Os resultados obtidos são expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Os dados foram comparados estatisticamente utilizando a análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey, usando o software GraphPad Prisma 5. Em todos os cálculos foi fixado o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados foram divididos em três artigos científicos seguindo a ordem citada. O primeiro artigo será submetido à revista Neuropharmacology intitulado: **Sinalização de IL-33/ST2 induzida por ânion superóxido medeia inflamação e dor em camundongos**. As normas da revista encontram-se no **Anexo A**. O segundo artigo será submetidos à revista Inflammation Research: **Tempol, um mimético da superóxido dismutase, inibe a dor inflamatória induzida por ânion superóxido em camundongo**. As normas da revista encontram-se no **Anexo B**. O terceiro artigo intitulado: **Apocinina, um inibidor de NADPH oxidase, reduz a dor em camundongos induzidos pelo superóxido de potássio**, será submetido à revista European Journal of Pharmacology e as normas da revista encontram-se no **Anexo C**.

4.1 Primeiro Artigo Científico

Interleukin-33/ST2 Signaling Mediates Superoxide Anion-Induced Pain and Inflammation in mice

Catia C. F. Bernardy^a, Ana C. Zarpelon^b, Felipe A. Pinho-Ribeiro^b, Thacyana T. Carvalho^b, Cássia Calixto-Campos^b, Victor Fattori^b, José C. Alves-Filho^c, Thiago M. Cunha^c, Foo. Y. Liew^d, Fernando Q. Cunha^c, Waldiceu A. Verri, Jr.^{b,*}

Highlights

- KO₂-induced hyperalgesia and inflammation are dependent on IL-33/ST2 pathway.
- IL-33/ST2 activation is required for KO₂-induced oxidative stress.
- KO₂-induced COX-2, gp91^{phox}, and ppET-1 mRNA expression are dependent on IL-33/ST2.
- ST2 signaling is important to TNF- α and IL-1 β mRNA expression after KO₂ injection.
- Spinal astrocytes and microglia are activated by KO₂ in a IL-33/ST2-dependent manner.

Interleukin-33/ST2 Signaling Mediates Superoxide Anion-Induced Pain and Inflammation in Mice

Catia C. F. Bernardy^a, Ana C. Zarpelon^b, Thacyana T. Carvalho^b, Felipe A. Pinho-Ribeiro^b, Cássia Calixto-Campos^b, Victor Fattori^b, Foo. Y. Liew^d, José C. Alves-Filho^c, Thiago M. Cunha^c, Fernando Q. Cunha^c, Waldiceu A. Verri, Jr^{b,*}

^a Departamento de Enfermagem, Centro de Ciências da Saúde, Hospital Universitário, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil

^b Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil

^c Department of Pharmacology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Avenida Bandeirantes, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

^d Division of Immunology, Infection and Inflammation, Glasgow Biomedical Research Centre, University of Glasgow, Glasgow, G12 8QQ, Scotland, United Kingdom

***Author for correspondence:** Waldiceu A. Verri Jr, Departamento de Patologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina. Rod. Celso Garcia Cid Pr 445, KM 380, Londrina, Paraná, Brasil, Cx. Postal 10.011, CEP 86057-970. Fax: + 55 43 3371 4387, Tel: + 55 43 3371 4979, e-mail address: waldiceujr@yahoo.com.br; waverri@uel.br

Abstract

Reactive oxygen species (ROS) such as superoxide anion can lead to inflammatory pain. In fact, potassium superoxide (KO₂), a superoxide anion donor, induces hyperalgesia, oxidative stress, activation of nuclear factor *kappa* B (NFκB), and cytokine production. Interleukin (IL)-33 a newly discovered cytokine member of the IL-1 family has been demonstrated to be important in pain conditions through interaction with ST2/IL-1RAcP receptor complex. In the present study the role of IL-33/ST2 pathway in KO₂-induced hyperalgesia and inflammation was investigated. KO₂ injection induced IL-33 production in a time-dependent manner in the paw skin and spinal cord of mice. KO₂ induced overt pain-like behavior, mechanical and thermal hyperalgesia, edema, neutrophil recruitment to the paw tissue, and leukocyte recruitment to the peritoneum that were reduced in ST2^{-/-} mice. At peripheral and spinal cord levels, we demonstrated that KO₂-induced IL-33/ST2 production is important to the oxidative stress, lipid peroxidation, and mRNA expression of cyclooxygenase (COX)-2, prepro-Endotelin-1 (ppET-1), gp91^{phox} (NOX-2), tumor necrosis factor (TNF)-α, IL-1β, glia fibrillary acidic protein (GFAP), and of the ionized calcium binding adaptor molecule 1 (Iba-1) since it was reduced in ST2^{-/-} mice compared to WT mice. Therefore, this study showed that IL-33/ST2 signaling mediates superoxide anion-induced inflammatory pain.

Keywords: Interleukin-33, ST2, superoxide anion, inflammation, hyperalgesia

1. Introduction

IL-33 is a cytokine of the IL-1 family that binds to the ST2 receptor. Upon IL-33 binding to ST2, IL-1 receptor accessory protein (IL-1RAcP) is recruited to the receptor complex for full intracellular signaling (Chackerian et al., 2007). IL-33 activates a wide variety of cells including innate lymphoid cells type 2 (ILC2), Th2 cells, Breg cells, macrophages, mast cells, eosinophils and neutrophils (Moro et al. 2010; Verri et al., 2010; Hueber et al. 2011; Imai et al. 2013). This facts lines up well with the pleiotropic roles of IL-33. Briefly, IL-33 can initiate the development of memory Th2 cells by activating innate lymphoide cells type 2 as well as activate macrophages, mast cells, and neutrophils contributing to innate and adaptive Th1, Th2 and Th17 responses (Moro et al. 2010; Verri et al., 2010, Hueber et al. 2011; Imai et al. 2013; Da Luz et al. 2014; Murakami-Satsutani et al. 2014).

Superoxide anion is an inflammatory molecule that activates macrophages and other resident and recruited cells, including neutrophils and monocytes. The injection of potassium superoxide (KO_2 ; superoxide anion donor) induces hyperalgesia, pro-inflammatory cytokine production (IL-1 β and TNF- α), prepro-endothelin-1 mRNA expression, oxidative stress, and the activation of nuclear factor *kappa* B (NF κ B) (Maioli et al., 2015; Serafim et al., 2015; Yamacita-Borin et al., 2015). There is also evidence that IL-33/ST2 signaling mediates inflammatory and neuropathic pain via TNF α and IL-1 β production (Verri et al., 2008; Zarpelon et al., 2013; Zarpelon et al., 2016). Furthermore, human eosinophils produce superoxide anion in response to IL-33 (Cherry et al. 2008). However, it remains to be determined whether superoxide anion-induced pain and inflammation depend on IL-33/ST2 signaling.

2. Material and methods

2.1 Animals

The experiments were performed on male WT (ST2^{+/+}) and ST2-deficient (ST2^{-/-}) Balb/c mice (20-25 g) from University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. Mice were housed in standard plastic cages (six mice per cage) with free access to food and water. All behavioral testing was performed between 9:00 am and 5:00 pm in a temperature- and light-controlled room. Animals' care and handling procedures were in accordance with the International Association for Study of Pain (IASP) guidelines and with the approval of the Ethics Committee of Londrina State University (process 7706.2013-42).

2.2 Reagents

Potassium superoxide (KO₂) 96.5% was purchased from Alfa Aesar (Ward Hill, MA, USA). Phosphate buffered saline (PBS), Hexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB), *o*-dianisidine dihydrochloride, phenylmethanesulfonyl fluoride, and ABTS [2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)] were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), and NBT (nitroblue tetrazolium) was obtained from Amresco (Solon, OH, USA). ELISA kits for determination of cytokine were obtained from eBioscience (San Diego, CA, USA).

2.3 Experimental protocols

IL-33 production in the paw tissue was determined 0.5 – 24 h after KO₂ (30 µg, 25 µL, i.pl.) or sterile saline (25 µL, i.pl.) injection by ELISA, and IL-33 levels at spinal cord level were measured 3 – 7 h after KO₂ (30 µg, 25 µL, i.pl.) or sterile saline (25 µL, i.pl.) injection by ELISA. The number of abdominal contortions was measured immediately after KO₂ (1 mg, 150 µL, i.p.) or saline (150 µL, i.p.) injection for 20 min. The number

of paw flinches and the time spent licking the paw were measured immediately after a single KO₂ (30 µg, 25 µL, i.pl.) or sterile saline (25 µL, i.pl.) injection, for 30 min. Hyperalgesia to mechanical and thermal stimuli, and paw edema were induced by KO₂ (30 µg, 25 µL, i.pl.) injection, and evaluated at 0.5 – 7 h after KO₂ or sterile saline (25 µL, i.pl.) injection. The animals were euthanized 7 h after stimulus KO₂ (30 µg, 25 µL, i.pl.) or vehicle injection and samples from plantar skin were collected and used in the myeloperoxidase (MPO) activity assay. In another approach, peritoneal cells were harvested in 2 mL of PBS, 6 h after KO₂ (30 µg, 25 µL, i.p.) or sterile saline (25 µL, i.p.) injection, and the samples were used for total and differential cell counts. For the free radical scavenging ability (2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate; ABTS)), the ferric reducing antioxidant power (FRAP), the nitroblue tetrazolium (NBT) reduction, and the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) tests, samples from plantar skin and spinal cord (L4 – L6) were collected 3 h after KO₂ (30 µg, 25 µL, i.pl.) or sterile saline (25 µL, i.pl.) injection. The mRNA expression for COX-2, preproET-1, proIL-1β, TNFα, and gp91^{phox}, in the paw and spinal cord (L4-L6) tissues or for GFAP and Iba-1 spinal cord (L4-L6) tissue was performed by quantitative PCR (qPCR) analysis 3 h after KO₂ (30 µg, 25 µL, i.pl.) or sterile saline (25 µL, i.pl.) injection. The doses of KO₂ used in each test were selected based on a previous work of standardization (Maioli et al., 2015; Yamacita-Borin et al., 2015; Fattori et al., 2015; Serafim et al., 2015).

2.4 IL-33 levels

The IL-33 levels in the paw and spinal cord (L4-L6) tissue were determined at 0.5 - 24 h or 3 - 24 h, respectively, after KO₂ (30 µg, i.pl.) injection, to obtain the time-course of the cytokine production. The samples were homogenized in 500 µL of lysis buffer containing protease inhibitors, and the IL-33 concentration was determined by ELISA

(eBioscience, Ready-SET-Go), as previously described (Verri et al., 2010), accordingly with manufacturer's directions. The results are expressed as picograms (pg) of IL-33 per mg of tissue.

2.5 Writhing response test

Mice were placed individually in large glass cylinders immediately after stimulus injection, and the total number of writhings was counted for 20 min. The pain intensity was expressed as a cumulative number of writhings (Maioli et al., 2015).

2.6 Paw flinches and licking test

The number of paw flinches, and the time spent licking the stimulated paw were both determined immediately after stimulus injection for 30 min. Results were expressed as the cumulative number of paw flinches, or as the total time spent licking the paw (Maioli et al., 2015).

2.7 Electronic pressure meter test of mechanical hyperalgesia

The test consisted of evoking a hind paw reflex with a hand-held force transducer (electronic von Frey anesthesiometer; Insight, Ribeirão Preto, SP, Brazil) adapted with a 0.5 mm² polypropylene tip (Cunha et al., 2004). The results are expressed by delta (Δ) of withdrawal threshold (in g) calculated by subtracting the basal mean measurements from the mean measurements at the indicated time points after stimulus.

2.8 Hot plate test

The test was performed as reported previously (Navarro et al. 2013). Briefly, mice were placed in the hot plate apparatus (EFF 361, Insight Equipamentos, Ribeirao Preto, SP, Brazil) maintained at 55 °C. The reaction time was scored when the pain reactions of hind paw licking or flinching occurred in the injected paw. A maximum latency (cut-off) was set at 30 s to avoid tissue damage.

2.9 Paw edema

The paw edema formation was measured using a caliper (Digimatic Caliper, Mitutoyo Corporation, Kanagawa, Japan). Values of paw thickness are expressed as the difference (Δ mm) between the values obtained just before (basal) and after stimulus injection (Maioli et al., 2015).

2.10 Myeloperoxidase activity

The neutrophil recruitment to the paw skin was evaluated by the Myeloperoxidase (MPO) activity assay as described previously (Bradley et al., 1982; Casagrande et al. 2006). Seven hours after KO₂ injection, the hind paw tissue of mice was collected and homogenized using Tissue-Tearor (Biospec, USA), centrifuged at 16.100 g for 4 min, and the resulting supernatant was assayed spectrophotometrically for MPO activity determination at 450 nm (Multi Scan Go Thermo Scientific, USA). The absorbances were compared to a standard curve of neutrophils, and the results were presented as Myeloperoxidase activity (number of neutrophils X 10⁴/mg of tissue).

2.11 Leukocyte recruitment to the peritoneal cavity

Mice were euthanized 6 h after KO₂ (30 µg, 25 µL, i.p.) or saline (25 µL, i.p.) injection, and the peritoneal cells were harvested with 2 mL of PBS. Aliquots of 20 µL were mixed with 180 µL of Turk's solution, and the total cell counts were performed in Neubauer chamber. Differential cell counts were performed on microscope slides using the Panoptic staining kit for histological analysis (Laborclin, Pinhais, PR, Brazil). The values were expressed as total number of cells, polymorphonuclear cells, and mononuclear cells $\times 10^6$ per cavity. Total and differential cell counts were both performed under a light microscope (400x magnification, Olympus Optical Co., Hamburg, Germany).

2.12 FRAP and ABTS tests

The paw skin and spinal cord samples were collected 3 h after stimulus injection and homogenized with 500 µL of ice-cold KCl buffer (1.15%). The homogenates were centrifuged (200 g, 10 min, 4 °C), and the resulting supernatants were used in both assays as described previously (Campanini et al. 2013). The absorbances of FRAP and ABTS assays were measured at 595 nm and 730 nm, respectively (Multiskan GO ThermoScientific), and the results were compared to a trolox curve (0.02-20 nmol). The results are expressed as nmol of trolox equivalent/mg of tissue.

2.13 TBARS assay (Lipid Peroxidation)

Paw tissue and spinal cord samples were collected 3 h after ipl stimulus with KO₂ (30 µg/paw) to determine TBARS levels using a method previously described (Guedes et

al., 2006). For this assay, 10% TCA was added to the homogenate, and the mixture was centrifuged (1000 g, 3 min, 4°C) to precipitate proteins. The protein-free supernatant was then separated and mixed with TBA (0.67 %). The mixture was kept in a water bath (15 min, 100 °C). Malondialdehyde (MDA), an intermediate product of lipid peroxidation, was determined by the difference between absorbances at 535 and 572 nm using a microplate spectrophotometer reader. The results are presented as nmol MDA/mg of tissue.

2.14 NBT reduction test

The quantitation of superoxide anion production in tissue homogenates was performed using the NBT assay as described previously (Hohmann et al., 2013). Paw skin and spinal cord tissue samples were collected 3 h after the stimulus (KO₂ 30 µg). Briefly, 50 µL of the homogenate was incubated with 100 µL of NBT (1 mg/mL) in 96-well plates at 37°C for 1 h. The supernatant was carefully removed and the reduced formazan solubilized by adding 120 µL of 2 M KOH and 140 µL of DMSO. The NBT reduction was measured at 600 nm using a microplate spectrophotometer reader (Multiskan GO, Thermo Scientific). The tissue weight was used for data normalization; thus the results are expressed as NBT reduction (OD at 620 nm/mg of tissue).

2.15 Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR)

Mice were injected with KO₂ (30 µg, i.pl.) and after 3h samples of paw and/or spinal cord tissue were collected in TRIzol reagent. qPCR was performed as previously described (Verri et al., 2008). Samples were homogenized in TRIzol reagent, and total RNA was extracted by using the SV Total RNA Isolation System (Promega). qPCR was performed in a LightCycler Nano Instrument (Roche, Mississauga, ON, USA) sequence

detection system by using the Platinum SYBR Green qPCR SuperMix UDG (Invitrogen, USA). The primers used were COX-2 sense: 5'-GTGGAAAACCTCGTCCAGA-3', Cox-2 antisense: 5'-GCTCGGCTTCCAGTATTGAG-3'; preproET sense: 5'-TGTGTCTACTTCTGCCACCT-3', preproET antisense: 5'-CACCAGCTGCTGATAGATAC-3'; gp91^{phox} sense: 5'-AGCTATGAGGTGGTGTAGTGG-3', gp91^{phox} antisense: 5'-CACAATATTTGTACCAGACAGACTTGAG-3'; TNF sense: 5'-TCTCATCAGTTCTATGGCCC-3', TNF antisense: 5'-GGGAGTAGACAAGGTACAAC-3'; IL-1beta sense: 5'-GAAATGCCACCTTTTGACAGTG-3', IL-1beta antisense: 5'-TGGATGCTCTCATCAGGACAG-3'; Gfap sense: 5'-GGCGCTCAATGCTGGCTTCA-3', Gfap antisense: 5'-TCTGCCTCCAGCCTCAGGTT-3'; Aif1 (Iba-1) sense: 5'-ATGGAGTTTGATCTGAATGGAAAT-3', Aif1 (Iba-1) antisense: 5'-TCAGGGCAGCTCGGAGATAGCTTT-3'; Gapdh sense: 5'-CATACCAGGAAATGAGCTTG-3', Gapdh antisense: 5'-ATGACATCAAGAAGGTGGTG-3'. The expression of Gapdh mRNA was used as a control for tissue integrity in all samples.

2.16 Statistical analysis

Results are presented as means \pm SEM of measurements made on 6 mice in each group. Two-way analysis of variance (ANOVA) was used to compare the groups and doses at all times (curves). The analyzed factors were treatments, time and time versus treatment interaction. When there was a significant time versus treatment interaction, one-way ANOVA followed by Tukey's t-test was performed for each time. On the other hand,

when the nociceptive responses were presented as total values of the indicated time period, the differences between responses were evaluated by one-way ANOVA followed by Tukey's t-test. Statistical differences were considered to be significant at $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Superoxide anion-injection induces peripheral and spinal cord production of IL-33 in a time-dependent manner

The time-course of KO_2 (30 μg , 25 μL , i.pl.)-induced production of IL-33 was evaluated by ELISA in WT mice ($\text{ST2}^{+/+}$) (Fig. 1). There was significant IL-33 production in the paw skin tissue between 0.5 and 7 h after stimulus injection peaking at 5 h and returning to basal levels after 24 h (Fig. 1A). Based on this result, we have chosen the intervals of 3 – 24 h to evaluate the IL-33 production in spinal cord tissue (L4 - L6) after intraplantar injection of KO_2 (30 μg , 25 μL) (Fig. 1B). IL-33 production increased in the spinal cord between 5 - 7 h peaking at 7 h after stimulus injection and then, returning to basal concentration at 24 h (Fig. 1B). Therefore, superoxide anion induces IL-33 production in a time-dependent manner in the paw skin and spinal cord.

3.2. Superoxide anion-induced overt pain-like behavior depends on IL-33/ST2 signaling

The role of IL-33/ST2 signaling in KO_2 -induced overt pain-like behaviors of abdominal contortions (KO_2 , 1 mg, 150 μL , i.p.), paw flinches and paw licking (KO_2 , 30 μg , 25 μL , i.pl.) was evaluated in WT and $\text{ST2}^{-/-}$ mice. KO_2 administration induced abdominal contortions (Fig. 2A), paw flinches (Fig. 2B) and paw licking (Fig. 2C) in the WT mice. $\text{ST2}^{-/-}$ mice showed significant reduction of KO_2 -induced abdominal writhings (Fig. 2A), paw flinching (Fig. 2B) and time spent licking the paw (Fig. 2C) compared to

WT mice. Therefore, IL-33/ST2 mediates superoxide anion-induced overt pain-like behavior.

3.3. Superoxide anion induces hyperalgesia and inflammation in the paw in a IL-33/ST2 signaling-dependent manner

KO₂ injection (30 µg, 25 µL, i.pl.) induced mechanical hyperalgesia (Fig. 3A), thermal hyperalgesia (Fig. 3B), paw edema (Fig. 3C), and myeloperoxidase activity (MPO, an indirect marker of neutrophil counts) in the paw skin tissue (Fig. 3D) in WT mice confirming previous data of our group (Maioli et al., 2015). On the other hand, KO₂-induced mechanical (Fig. 3A) and thermal hyperalgesia (Fig. 3B) were reduced in ST2^{-/-} compared to WT mice at all time points, while paw edema was reduced between 1 – 7 h (Fig. 3C). KO₂-induced MPO activity was also reduced in the paw skin of ST2^{-/-} mice compared to WT mice (Fig. 3D). Thus, IL-33/ST2 signaling mediates superoxide anion-induced paw hyperalgesia and inflammation.

3.4. Superoxide anion-induced leukocyte recruitment to the peritoneal cavity depends on IL-33/ST2 pathway

KO₂ (30 µg, 150 µL, i.p.) administration induced significant increase of total leukocytes (Fig. 4A), polymorphonuclear (Fig. 4B), and mononuclear cells (Fig. 4C) in the peritoneal cavity 6 h after the injection of stimulus in WT mice, which were reduced in ST2^{-/-} mice (Fig. 4). These results demonstrate that IL-33/ST2 mediates superoxide anion-induced leukocyte recruitment.

3.5. Superoxide anion -induced oxidative stress depends on IL-33/ST2 signaling

KO₂ (30 µg, 25 µL, i.pl.) injection reduced the antioxidant capacity in the paw skin and spinal cord in WT mice as observed by the ferric reducing potential (FRAP) assay (Fig.

5A-B) and the ability to scavenge 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonic acid) (ABTS) assay (Fig. 5C-D) at 3 h (peak of KO₂-induced oxidative stress). KO₂-induced reduction of the antioxidant capacity was prevented in ST2^{-/-} compared to WT mice in the paw skin and spinal cord (Fig. 5A-D). Furthermore, KO₂ injection induced lipid peroxidation in WT mice as showed by the thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) assay in the paw and spinal cord tissues 3 h after stimulus injection in the paw (Fig. 5E-F). KO₂-induced lipid peroxidation in WT mice was inhibited in ST2^{-/-} mice (Fig. 5E-F). These data demonstrate that superoxide anion-triggered oxidative stress depends on IL-33 action.

3.6. Superoxide anion-induced COX-2 mRNA expression was reduced in ST2^{-/-} mice

Mice received KO₂ (30 µg, 25 µL, i.pl.) or saline (25 µL, i.pl.) injection and 3 h after paw skin and spinal cord tissues were collected to determine COX-2 mRNA expression by qPCR (Fig. 6). KO₂ stimulus induced a significant increase of COX-2 mRNA expression in WT mice compared to saline group, which was diminished in ST2^{-/-} mice paw (Fig. 6A) and spinal cord samples (Fig. 6B). Therefore, superoxide anion-induced COX-2 mRNA expression depends on IL-33/ST2 signaling.

3.7. Superoxide anion-induced prepro-endothelin (ET)-1 mRNA expression depends on IL-33/ST2 signaling

Paw skin and spinal cord samples were collected 3 h after KO₂ (30 µg, 25 µL, i.pl.) or saline (25 µL, i.pl.) injection to determine preproET-1 mRNA expression. Peripheral stimulus with the superoxide anion donor induced significant increase of preproET-1 mRNA expression in the paw skin (Fig. 7A) and spinal cord (Fig. 7B) samples of WT mice compared to saline group, an effect that was reduced in ST2^{-/-} mice (Fig. 7). These

results indicate that superoxide anion-induced preproET-1 mRNA expression depends on IL-33/ST2 signaling.

3.8. Superoxide anion donor induces pro-inflammatory cytokines mRNA expression in a IL-33/ST2-dependent manner

TNF- α and pro-IL-1 β mRNA expression in the paw and spinal cord samples were evaluated 3 h after KO₂ (30 μ g, 25 μ L, i.pl.) or saline (25 μ L, i.pl.) administration in WT and ST2^{-/-} mice (Fig. 8). KO₂ induced a significant increase of TNF- α (Fig. 8A-B, respectively) and pro-IL-1 β (Fig. 8C-D, respectively) mRNA expression in the paw skin and spinal cord samples in WT mice compared to the vehicle control group. On the other hand, ST2^{-/-} mice presented reduced TNF- α (Fig. 8A-B, respectively) and pro-IL-1 β (Fig. 8C-D, respectively) mRNA expression in the paw skin and spinal cord samples after KO₂ stimulus. Thus, the superoxide anion-induced mRNA expression of pro-hyperalgesic cytokines depends on IL-33/ST2 signaling.

3.9. KO₂-induced superoxide production and NADPH oxidase complex activation depends on IL-33/ST2 signaling

KO₂ (30 μ g, 25 μ L, i.pl.) stimulus increased superoxide anion production in WT mice in the paw skin and spinal cord samples (Fig. 10A-B) 3h after its injection. On the other hand, superoxide anion production was reduced in ST2^{-/-} mice in the paw skin and spinal cord, respectively (Fig. 10A-B). In agreement with this result, ST2 deficiency also reduced KO₂-induced gp91^{phox} (a NADPH oxidase subunit) mRNA expression in the paw skin and spinal cord samples (Fig. 10C-D, respectively).

3.10. Superoxide anion-induced activation of glial cells in the spinal cord depends on IL-33/ST2 signaling

The injection of KO₂ (30 µg, 25 µL, i.pl.) induced a significantly increase in the mRNA expression of the Ionized Calcium Binding Adaptor Molecule 1 (Iba-1, a marker of microglia) (Fig. 12A) and the Glia Fibrillary Acidic Protein (GFAP, a cell surface marker of astrocytes) (Fig. 12B) in the spinal cord of WT mice compared to saline (25 µL, i.pl.), which were reduced in the ST2^{-/-} mice (Fig. 12 A-B). Therefore, demonstrating that the peripheral stimulus with superoxide anion induces spinal cord activation of astrocytes and microglia in an IL-33/ST2-dependent manner.

4. Discussion and Conclusions

The role of IL-33/ST2 signaling in cancer pain (Zhao et al. 2013), pain in adaptive and innate inflammation (Verri Jr. et al. 2008; Zarpelon et al. 2013), in overt pain-like behavior models (Magro et al. 2013; Han et al., 2013), and in neuropathic pain (Zarpelon et al., 2016) were described. Herein, we advance in the contribution of IL-33/ST2 signaling demonstrating that superoxide anion-induced inflammation and pain depends on IL-33/ST2 signaling in peripheral and spinal cord foci.

Evidence suggests that superoxide anion activates and sensitizes nociceptive neurons through TRPV1 and TRPA1 channels (Nishio et al. 2013). This peripheral nociceptive signal reaches the spinal cord and lead to spinal sensitization. On the other hand, activation of TRPV1 channels enhances reactive oxygen species (ROS) production and induces the expression of neuronal TNF receptor 1 (TNFR1) resulting in enhanced firing of nociceptors during inflammation in which large amounts of TNF- α are produced (Ma et al. 2009). TNF- α is a classic inflammatory cytokine that induces superoxide anion production and its derivatives in phagocytes by activating NADPH oxidase complex (Gauss et al. 2007; Kim et al. 2007). IL-33 also induces superoxide anion production by human eosinophils (Cherry et al. 2008). Furthermore, we have demonstrated that superoxide anion-induced pain and inflammation depends on

TNF α /TNFR1 (Yamacita-Borin et al., 2015), IL-1 β (Fattori et al., 2015) and ET-1 (Serafim et al., 2015). IL-33 was shown to induce hyperalgesia through TNF α , IL-1 β and ET-1 (Verri Jr. et al. 2008; Zarpelon et al., 2013; Zarpelon et al., 2016). Therefore, it is reasonable to speculate whether IL-33 could be mediating superoxide anion-induced hyperalgesia through the production of such peptides.

Superoxide anion induced IL-33 production peaking at 5 h in the paw skin and at 7 h in the spinal cord. These data suggest that peripheral superoxide anion-induced cellular activation might be responsible for spinal cord activation. Evidence demonstrates that some cytokines such as TNF α can be transported from the peripheral tissues to the spinal cord through axonal transport. However, the time lapsing is too long and 2 h is not enough for this transport (Shubayev and Myers 2001). There is no evidence of axonal transport of IL-33. Therefore, it is likely that the peripheral production of IL-33 stimulates the production of spinal cord IL-33. In agreement, the superoxide anion-induced preproET-1 mRNA expression also occurs initially in the paw skin and afterwards in the spinal cord.

IL-33 also mediated the superoxide anion-induced peripheral recruitment of leukocytes to the paw skin (MPO activity) and peritoneal cavity. Therefore, confirming the role of IL-33 as a chemoattractant of leukocytes including neutrophils (Verri et al., 2010). Furthermore, the recruited leukocytes might also contribute to the nociceptive response by further producing nociceptive molecules. In fact, recruited neutrophils produce prostaglandin E₂ upon stimulation with IL-1 β . Herein, IL-33/ST2 mediated superoxide anion-induced production of IL-1 β and COX-2 mRNA expression in the paw skin and spinal cord. As mentioned above, the spinal cord effects might firstly depend on the peripheral neuronal input that induces local production of nociceptive molecules. For instance, the peripheral paw injection of IL-1 β induces dorsal root ganglia/spinal cord

COX-dependent hyperalgesia (Funez et al., 2008). COX-2 is also a source of superoxide anion production during inflammation (Kukreja et al., 1986). And, superoxide anion induced pronounced oxidative stress in the paw skin as observed by depletion of endogenous antioxidant defenses (FRAP and ABTS assays) and lipid peroxidation (TBARS assay) in a IL-33/ST2-dependent manner. Peripheral oxidative stress contributes to inflammation and hyperalgesia, and also results in promoting oxidative stress in the spinal cord by activating peripheral immune cells and directing neutrophil recruitment and directly inducing primary afferent nociceptor activation (Valerio et al., 2009; Hattori et al., 2010; Navarro et al., 2013; Maioli et al., 2015; Serafim et al., 2015).

In the spinal cord of chronic constriction injury (CCI) operated mice, IL-33/citrine expression was mainly detected in oligodendrocytes with minor expression by neurons, microglia and astrocytes. IL-33 contributed to the spinal cord glial activation and chronic hyperalgesia induced by CCI (Zarpelon et al., 2016), which is in agreement with the present data that IL-33/ST2 mediated superoxide anion activation of astrocytes (GFAP) and microglia (Iba-1). In fact, the hyperalgesia induced by intrathecal injection of IL-33 was inhibited by treatment with astrocyte and microglia inhibitors as well as IL-33 induced the activation of glial cells in the spinal cord (Zarpelon et al., 2016). It is likely, that similarly to the peripheral tissues, IL-33 might be expressed by varied cell types and that its expression depends on the disease. In this sense, IL-33 expression in the spinal cord of spared nerve injury operated mice was detected mainly in astrocytes (Liu et al., 2015).

Despite the present evidence that IL-33/ST2 mediates superoxide anion-induced hyperalgesia and inflammation, and its role in the peripheral and spinal cord foci, this pro-inflammatory role is not totally expected. IL-33 has been shown to inhibit inflammatory conditions through expanding regulatory T cells (Duan et al., 2012;

Schiering et al., 2014; Matta et al., 2014) and IL-33 treatment attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis (Jiang et al., 2012) and spinal cord contusion injury-induced inflammation (Gadani et al., 2015) by inducing M2 macrophages. However, it remains to be determined the exactly mechanisms that are essential for opposing roles of IL-33 depending on disease context.

In conclusion, superoxide anion induces inflammation and pain in a IL-33/ST2 signaling-dependent manner. IL-33/ST2 signaling seems important in the peripheral and spinal cord foci contributing to superoxide anion-induced pain and inflammation and boosting the production of ROS, cytokines and ET-1.

Disclosure

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Ministério da Ciência Tecnologia e Inovação (MCTI), Secretaria da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior (SETI), Fundação Araucária and Parana State Government grants supported this study (Brazil).

References

- Bradley, P.P., Priebat, D.A., Christensen, R.D., Rothstein, G., 1982. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J. Invest. Dermatol.* 78, 206–209.
- Campanini, M.Z., Pinho-Ribeiro, F.A., Ivan, A.L., Ferreira, V.S., Vilela, F.M., Vicentini, F.T., Martinez, R.M., Zarpelon, A.C., Fonseca, M.J.V., Faria, T.J., Baracat, M.M., Verri, W.A., Jr., Georgetti, S.R., Casagrande, R., 2013. Efficacy of topical formulations containing *Pimenta pseudocaryophyllus* extract against UVB-induced oxidative stress and inflammation in hairless mice. *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*, 127, 153–160.
- Casagrande, R., Georgetti, S.R., Verri, W.A., Jr., Dorta, D.J., Dos Santos, A.C., Fonseca, M.J., 2006. Protective effect of topical formulations containing quercetin against UVB-induced oxidative stress in hairless mice. *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*, 84, 21–27.
- Chackerian, A.A., Oldham, E.R., Murphy, E.E., Schmitz, J., Pflanz, S., Kastelein, R.A., 2007. IL-1 receptor accessory protein and ST2 comprise the IL-33 receptor complex. *J. Immunol.* 179, 2551–2555.
- Cherry, W.B., Yoon, J., Bartemes, K.R., Iijima, K., Kita, H., 2008. A novel IL-1 family cytokine, IL-33, potently activates human eosinophils. *J. Allergy Clin. Immunol.* 121, 1484–1490.
- Cunha, T.M., Verri, W.A., Jr., Vivancos, G.G., Moreira, I.F., Reis, S., Parada, C.A., Cunha, F.Q., Ferreira, S.H., 2004. An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 37, 401–407.
- Da Luz, F.A.C., Oliveira, A.P.L., Borges, D., Brígido, P.C., Silva, M.J.B., 2014. The physiopathological role of IL-33: new highlights in bone biology and a proposed role in periodontal disease. *Mediators Inflamm.* 2014, Article ID: 342410.
- Duan, L., Chen, J., Zhang, H., Yang, H., Zhu, P., Xiong, A., Xia, Q., Zheng, F., Tan, Z., Gong, F., Fang, M., 2012. Interleukin-33 ameliorates experimental colitis through promoting Th2/Foxp3⁺ regulatory T-cell responses in mice. *Mol. Med.* 18, 753–761.
- Fattori, V., Pinho-Ribeiro, F.A., Borghi, S.M., Alves-Filho, J.C., Cunha, T.M., Cunha, F.Q., Casagrande, R., Verri, W.A., Jr., 2015. Curcumin inhibits superoxide anion-induced pain-like behavior and leukocyte recruitment by increasing Nrf2 expression and reducing NF- κ B activation. *Inflamm. Res.* 64, 993–1003.
- Funez, M.I., Ferrari, L.F., Duarte, D.B., Sachs, D., Cunha, F.Q., Lorenzetti, B.B., Parada, C.A., Ferreira, S.H., 2008. Teleantagonism: a pharmacodynamic property of the primary nociceptive neuron. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105, 19038–19043.

- Gadani, S.P., Walsh, J.T., Smirnov, I., Zheng, J., Kipnis, J., 2015. The glia-derived alarmin IL-33 orchestrates the immune response and promotes recovery following CNS injury. *Neuron*. 85, 703–709.
- Gauss, K.A., Nelson-Overton, L.K., Siemsen, D.W., Gao, Y., DeLeo, F.R., Quinn, M.T., 2007. Role of NF-kappaB in transcriptional regulation of the phagocyte NADPH oxidase by tumor necrosis factor-alpha. *J. Leukoc. Biol.* 82, 729–41.
- Guedes, R.P., Bosco, L.D., Teixeira, C.M., Araújo, A.S., Llesuy, S., Belló-Klein, A., Ribeiro, M.F., Partata, W.A., 2006. Neuropathic Pain Modifies Antioxidant Activity in Rat Spinal Cord. *Neurochem. Res.* 31, 603–609.
- Han, P., Zhao, J., Liu, S.B., Yang, C.J., Wang, Y.Q., Wu, G.C., Xu, D.M., Mi, W.L., 2013. Interleukin-33 mediates formalin-induced inflammatory pain in mice. *Neurosci.* 241, 59–66.
- Hattori, H., Subramanian, K.K., Sakai, J., Jia, Y., Li, Y., Porter, T.F., Loison, F., Sarraj, B., Kasorn, A., Jo, H., Blanchard, C., Zirkle, D., McDonald, D., Pai, S.Y., Serhan, C.N., Luo, H.R., 2010. Small-molecule screen identifies reactive oxygen species as key regulators of neutrophil chemotaxis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107, 3546–3551.
- Hohmann, M.S., Cardoso, R.D., Pinho-Ribeiro, F.A., Crespigio, J., Cunha, T.M., Alves-Filho, J.C., Silva, R.V., Pinge-Filho, P., Ferreira, S.H., Cunha, F.Q., Casagrande, R., Verri, W.A., Jr., 2013. 5-lipoxygenase deficiency reduces acetaminophen-induced hepatotoxicity and lethality. *Biomed. Res. Int.* 2013, Article ID: 627046.
- Hueber, A.J., Alves-Filho, J.C., Asquith, D.L., Michels, C., Millar, N.L., Reilly, J.H., Graham, G.J., Liew, F.Y., Miller, A.M., McInnes, I.B., 2011. IL-33 induces skin inflammation with mast cell and neutrophil activation. *Eur. J. Immunol.* 41, 2229–2237.
- Imai, Y., Yasuda, K., Sakaguchi, Y., Haneda, T., Mizutani, H., Yoshimoto, T., Nakanishi, K., Yamanishi, K., 2013. Skin-specific expression of IL-33 activates group 2 innate lymphoid cells and elicits atopic dermatitis-like inflammation in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110, 13921–13926.
- Jiang, H.R., Milovanović, M., Allan, D., Niedbala, W., Besnard, A.G., Fukada, S.Y., Alves-Filho, J.C., Togbe, D., Goodyear, C.S., Lington, C., Xu, D., Lukic, M.L., Liew, F.Y., 2012. IL-33 attenuates EAE by suppressing IL-17 and IFN- γ production and inducing alternatively activated macrophages. *Eur. J. Immunol.* 42, 1804–1814.
- Kim, Y.S., Morgan, M.J., Choksi, S., Liu, Z.G., 2007. TNF-Induced Activation of the Nox1 NADPH Oxidase and Its Role in the Induction of Necrotic Cell Death. *Mol. Cell.* 26, 675–687.
- Kukreja, R.C., Kontos, H.A., Hess, M.L., Ellis, E.F., 1986. PGH synthase and lipoxygenase generate superoxide in the presence of NADH or NADPH. *Circ. Res.* 59, 612–619.

- Liu, S., Mi, W.L., Li, Q., Zhang, M.T., Han, P., Hu, S., Mao-Ying, Q.L., Wang, Y.Q., 2015. Spinal IL-33/ST2 Signaling Contributes to Neuropathic Pain via Neuronal CaMKII-CREB and Astroglial JAK2-STAT3 Cascades in Mice. *Anesthesiology*, 123, 1154-1169.
- Ma, F., Zhang, L., Westlund, K.N., 2009. Reactive oxygen species mediate TNFR1 increase after TRPV1 activation in mouse DRG neurons. *Mol. Pain*. 5:31.
- Maioli, N.A., Zarpelon, A.C., Mizokami, S.S., Calixto-Campos, C., Guazelli, C.F., Hohmann, M.S., Pinho-Ribeiro, F.A., Carvalho, T.T., Manchope, M.F., Ferraz, C.R., Casagrande, R., Verri, W.A., 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. Res.* 48, 321–331.
- Magro, D.A.C., Hohmann, M.S.N., Mizokami, S.S., Cunha, T.M., Alves-Filho, J.C., Casagrande, R., Ferreira, S.H., Liew, F.Y., Cunha, F.Q., Verri, W.A., Jr., 2013. An interleukin-33/ST2 signaling deficiency reduces overt pain-like behaviors in mice. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 46, 601–606.
- Matta, B.M., Lott, J.M., Mathews, L.R., Liu, Q., Rosborough, B.R., Blazar, B.R., Turnquist, H.R., 2014. IL-33 is an unconventional Alarmin that stimulates IL-2 secretion by dendritic cells to selectively expand IL-33R/ST2+ regulatory T cells. *J. Immunol.* 193, 4010–4020.
- Moro, K., Yamada, T., Tanabe, M., Takeuchi, T., Ikawa, T., Kawamoto, H., Furusawa, J., Ohtani, M., Fujii, H., Koyasu, S., 2010. Innate production of T(H)2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit(+)/Sca-1(+) lymphoid cells. *Nature*, 463, 540–544.
- Murakami-Satsutani, N., Ito, T., Nakanishi, T., Inagaki, N., Tanaka, A., Vien, P.T., Kibata, K., Inaba, M., Nomura, S., 2014. IL-33 Promotes the Induction and Maintenance of Th2 Immune Responses by Enhancing the Function of OX40 Ligand. *Allergol. Int.* 63, 443–455.
- Navarro, S.A., Serafim, K.G., Mizokami, S.S., Hohmann, M.S., Casagrande, R., Verri, W.A., Jr., 2013. Analgesic activity of piracetam: Effect on cytokine production and oxidative stress. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 105, 183–192.
- Nishio, N., Taniguchi, W., Sugimura, Y.K., Takiguchi, N., Yamanaka, M., Kiyoyuki, Y.Y., Yamada, H., Miyazaki, N., Yoshida, M., Nakatsuka, T., 2013. Reactive oxygen species enhance excitatory synaptic transmission in rat spinal dorsal horn neurons by activating TRPA1 and TRPV1 channels. *Neurosci.* 247, 201–212.
- Schiering, C., Krausgruber, T., Chomka, A., Fröhlich, A., Adelmann, K., Wohlfert, E.A., Pott, J., Griseri, T., Bollrath, J., Hegazy, A.N., Harrison, O.J., Owens, B.M., Löhning, M., Belkaid, Y., Fallon, P.G., Powrie, F., 2014. The alarmin IL-33 promotes regulatory T-cell function in the intestine. *Nature*, 513, 564-568.
- Serafim, K.G., Navarro, S.A., Zarpelon, A.C., Pinho-Ribeiro, F.A., Fattori, V., Cunha, T.M., Alves-Filho, J.C., Cunha, F.Q., Casagrande, R., Verri, W.A., Jr., 2015.

- Bosentan, a mixed endothelin receptor antagonist, inhibits superoxide anion-induced pain and inflammation in mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 388, 1211-1221.
- Shubayev, V.I., Myers, R.R., 2001. Axonal transport of TNF-alpha in painful neuropathy: distribution of ligand tracer and TNF receptors. *J. Neuroimmunol.* 114, 48-56.
- Valerio, D.A., Georgetti, S.R., Magro, D.A., Casagrande, R., Cunha, T.M., Vicentini, F.T., Vieira, S.M., Fonseca, M.J.V., Ferreira, S.H., Cunha, F.Q., Verri, W.A., Jr., 2009. Quercetin reduces inflammatory pain: inhibition of oxidative stress and cytokine production. *J. Nat. Prod.* 72, 1975-1979.
- Verri, W.A., Jr., Guerrero, A.T., Fukada, S.Y., Valerio, D.A., Cunha, T.M., Xu, D., Ferreira, S.H., Liew, F.Y., Cunha, F.Q., 2008. IL-33 mediates antigen-induced cutaneous and articular hypernociception in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105, 2723-2728.
- Verri, W.A. Jr., Souto, F.O., Vieira, S.M., Almeida, S.C.L., Fukada, S.Y., Xu, D., Alves-Filho, J.C., Cunha, T.M., Guerrero, A.T., Mattos-Guimaraes, R.B., Oliveira, F.R., Teixeira, M.M., Silva, J.S., McInnes, I.B., Ferreira, S.H., Louzada-Junior, P., Liew, F.Y., Cunha, F.Q., 2010. IL-33 induces neutrophil migration in rheumatoid arthritis and is a target of anti-TNF therapy. *Ann. Rheum. Dis.* 69, 1697-7103.
- Yamacita-Borin, F.Y., Zarpelon, A.C., Pinho-Ribeiro, F.A., Fattori, V., Alves-Filho, J.C., Cunha, F.Q., Cunha, T.M., Casagrande, R., Verri, W.A., Jr., 2015. Superoxide anion-induced pain and inflammation depends on TNF α /TNFR1 signaling in mice. *Neurosci. Lett.* 605, 53-58.
- Zarpelon, A.C., Cunha, T.M., Alves-Filho, J.C., Pinto, L.G., Ferreira, S.H., McInnes, I.B., Xu, D., Liew, F.Y., Cunha, F.Q., Verri, W.A., Jr., 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.
- Zarpelon, A.C., Rodrigues, F.C., Lopes, A.H., Souza, G.R., Carvalho, T.T., Pinto, L.G., Xu, D., Ferreira, S.H., Alves-Filho, J.C., McInnes, I.B., Ryffel, B., Quesniaux, V.F., Reverchon, F., Mortaud, S., Menuet, A., Liew, F.Y., Cunha, F.Q., Cunha, T.M., Verri, W.A., Jr., 2016. Spinal cord oligodendrocyte-derived alarmin IL-33 mediates neuropathic pain. *FASEB J.* 30, 54-65.
- Zhao, J., Zhang, H., Liu, S.B., Han, P., Hu, S., Li, Q., Wang, Z.F., Mao-Ying, Q.L., Chen, H.M., Jiang, J.W., Wu, G.C., Mi, W.L., Wang, YQ., 2013. Spinal interleukin-33 and its receptor ST2 contribute to bone cancer-induced pain in mice. *Neurosci.* 253, 172-182.

Figure captions

Fig. 1. IL-33 production induced by KO₂ intraplantar injection. WT mice received intraplantar injection of saline (25 μ L) or KO₂ (30 μ g/paw) and the IL-33 levels were measured by ELISA in the paw skin (A) and in the spinal cord (B) at different time points. Results are presented as means \pm S.E.M. of 6 mice per group per experiment and are representative of two separated experiments. *P < 0.05 versus saline group; #P < 0.05 versus the other intervals. (One-way ANOVA followed by Tukey's t test).

Fig. 2. KO₂-induced overt pain-like behavior is reduced in ST2^{-/-} mice. WT and ST2^{-/-} mice received saline (150 μ L/i.p. or 25 μ L/i.pl.) or KO₂ stimulus by intraperitoneal injection (1 mg/150 μ L) to induce writhing response (A), or by intraplantar injection (30 μ g/paw) to induce paw flinching (B) and licking (C). Results are presented as means \pm S.E.M. of 6 mice per group per experiment and are representative of two separated experiments. *P < 0.05 versus saline group; #P < 0.05 versus KO₂-stimulated WT group. (One-way ANOVA followed by Tukey's t test).

Fig. 3. ST2-deficient mice display reduced hyperalgesia, edema, and neutrophil recruitment to the paw after KO₂ injection. WT and ST2^{-/-} mice received saline (25 μ L) or KO₂ intraplantar injection (30 μ g/paw), and the intensity of mechanical hyperalgesia (A), thermal hyperalgesia (B), and the edema (C) were evaluated at the indicated time points. Neutrophil recruitment was evaluated in paw skin by myeloperoxidase (MPO) activity assay 7 h after KO₂ injection (D). Results are presented as means \pm S.E.M. of 6 mice per group per experiment and are representative of two separated experiments. *P < 0.05 versus saline group; #P < 0.05 versus KO₂-stimulated WT group. (One-way ANOVA followed by Tukey's t test).

Fig. 4. ST2-deficient mice demonstrated reduced leukocyte recruitment in the peritoneal cavity after KO₂ injection. WT and ST2^{-/-} mice received saline i.p. or KO₂ intraperitoneal injection (30 µg/cavity) to induce leukocyte recruitment, and peritoneal cells were harvested in 2 mL of PBS, 6 h after stimulus. Total leucocytes (A), polymorphonuclear (B), and mononuclear cells (C) were performed. Results are presented as means ± S.E.M. of 6 mice per group per experiment and are representative of two separated experiments. *P < 0.05 versus saline group; #P < 0.05 versus KO₂-stimulated WT group. (One-way ANOVA followed by Tukey's t test).

Fig. 5. KO₂ induces peripheral and spinal oxidative stress and lipid peroxidation in a ST2-dependent manner. WT and ST2^{-/-} mice received saline i.pl. or KO₂ intraplantar injection (30 µg/paw) and the antioxidant capacity by FRAP (A and B) and ABTS (C and D) assays was evaluated in paw skin (A and C) and spinal cord (B and D) tissues. Lipid peroxidation (TBARS assay) was assessed in the paw (E) and spinal cord (F) tissues. Results are presented as means ± S.E.M. of 6 mice per group per experiment and are representative of two separated experiments. *P < 0.05 versus saline group; #P < 0.05 versus KO₂-stimulated WT group. (One-way ANOVA followed by Tukey's t test).

Fig. 6. COX-2 mRNA expression induced in paw and spinal cord tissue by KO₂ i.pl. injection is reduced in ST2^{-/-} mice. Saline or KO₂ (30 µg, 25 µL) was injected in the paw of WT and ST2^{-/-} mice and after 3 h COX-2 mRNA expression was evaluated by qPCR in paw (A) and spinal cord (B) samples. Gapdh was used as a reference gene to normalize data mRNA expression. Results are presented as means ± S.E.M. of 6 mice

per group per experiment and are representative of two separated experiments. *P < 0.05 versus saline group; #P < 0.05 versus KO₂-stimulated WT group. (One-way ANOVA followed by Tukey's t test).

Fig. 7. KO₂-induced peripheral and spinal prepro-ET-1 mRNA expression is dependent on IL-33/ST2 signaling. Injection of saline i.pl. or KO₂ (30 µg/25 µL/i.pl.) was performed and after 3 h prepro-ET-1 mRNA expression was evaluated in paw (A) and spinal cord (B) tissues by qPCR. Gapdh was used as a reference gene to normalize data mRNA expression. Results are presented as means ± S.E.M. of 6 mice per group per experiment and are representative of two separated experiments. *P < 0.05 versus saline group; #P < 0.05 versus KO₂-stimulated WT group. (One-way ANOVA followed by Tukey's t test).

Fig. 8. IL-33/ST2 activation mediates mRNA expression of pro-inflammatory cytokines TNF-α and pro-IL-1β in paw and spinal cord tissues. WT and ST2^{-/-} mice received saline or KO₂ intraplantar injection (30 µg/paw) and after 3 h qPCR was realized to evaluate TNF-α (A and B) and pro-IL-1β (C and D) mRNA expression in samples of paw (A and C) and spinal cord (B and D) tissues. Gapdh was used as a reference gene to normalize data mRNA expression. Results are presented as means ± S.E.M. of 6 mice per group per experiment and are representative of two separated experiments. *P < 0.05 versus saline group; #P < 0.05 versus KO₂-stimulated WT group. (One-way ANOVA followed by Tukey's t test).

Fig. 9. Superoxide production and NADPH oxidase subunit gp91^{phox} are activated in WT but not in ST2^{-/-} mice

Samples of WT and ST2^{-/-} mice that received saline or KO₂ (30 µg) intraplantar injection were collected 3 h after stimulus to determine superoxide production (NBT assay) (A and B) and gp91^{phox} mRNA expression (C and D) in paw (A and C) and spinal cord (B and D) tissues. Gapdh was used as a reference gene to normalize data mRNA expression. Results are presented as means ± S.E.M. of 6 mice per group per experiment and are representative of two separated experiments. *P < 0.05 versus saline group; #P < 0.05 versus KO₂-stimulated WT group. (One-way ANOVA followed by Tukey's t test).

Fig. 10. Spinal glial cells are important to IL-33/ST2 signaling after KO₂ stimulus.

Saline or KO₂ (30 µg, 25 µL) was injected in the paw of WT and ST2^{-/-} mice and after 3 h GFAP (A) and Iba-1 (B) mRNA expression were performed by qPCR in spinal cord samples. Gapdh was used as a reference gene to normalize data mRNA expression. Results are presented as means ± S.E.M. of 6 mice per group per experiment and are representative of two separated experiments. *P < 0.05 versus saline group; #P < 0.05 versus KO₂-stimulated WT group. (One-way ANOVA followed by Tukey's t test).

Figure 1

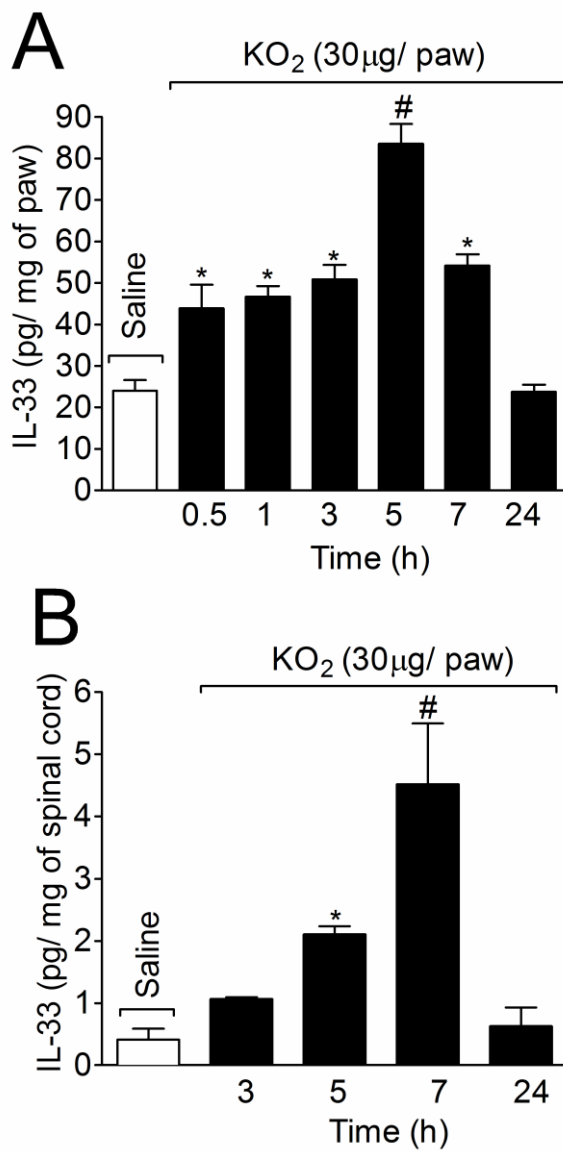


Figure 2

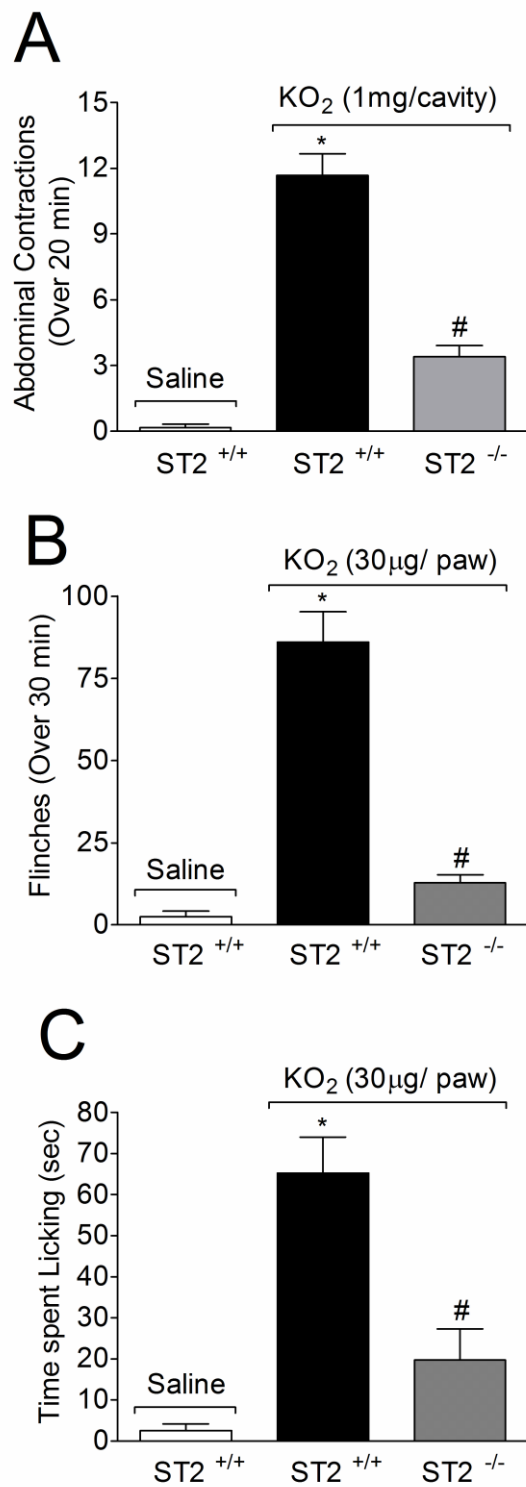


Figure 3.

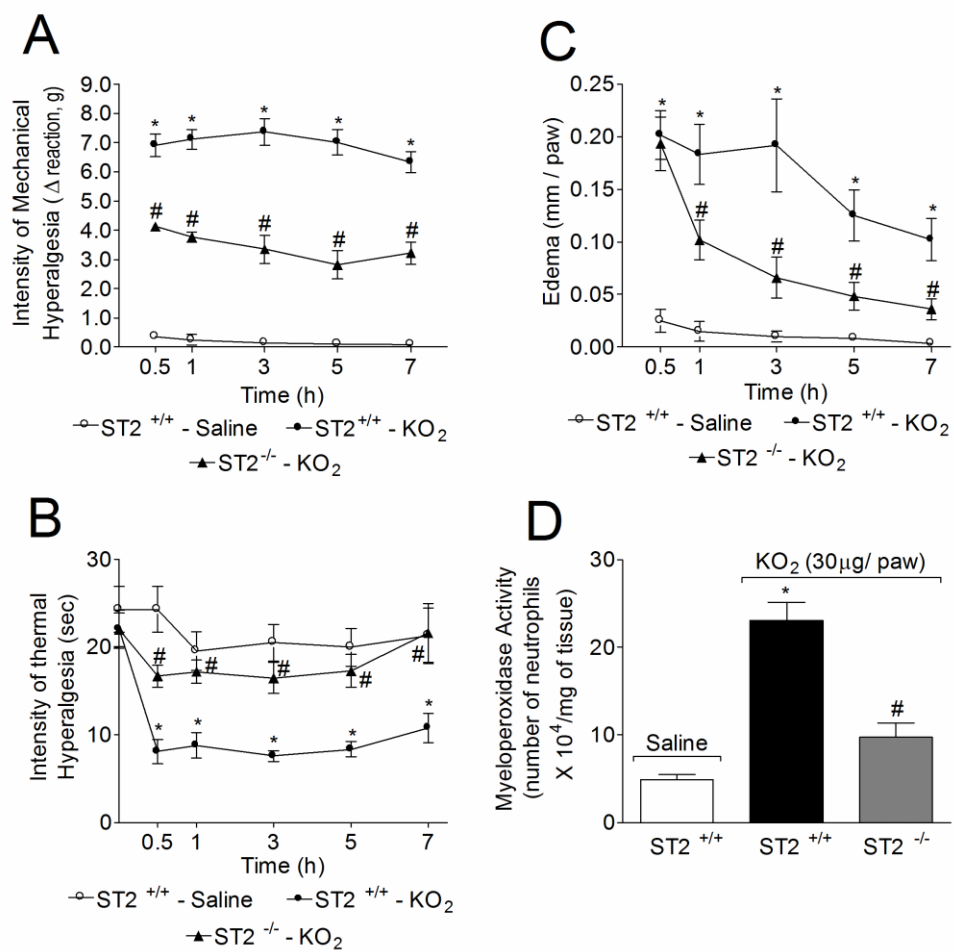


Figure 4.

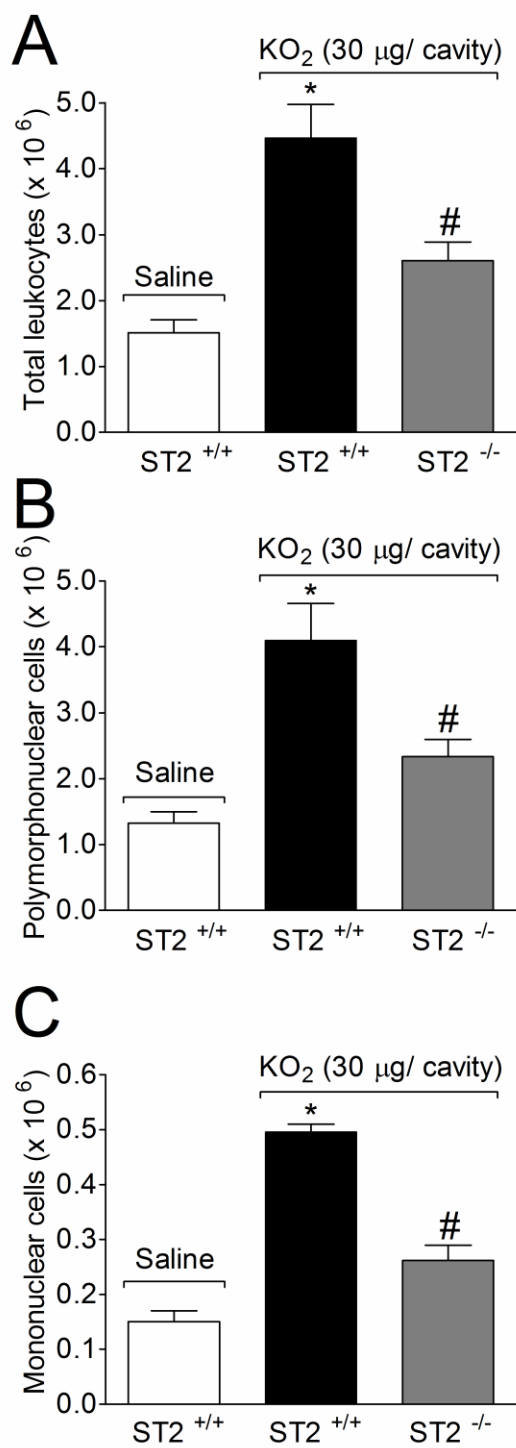


Figure 5.

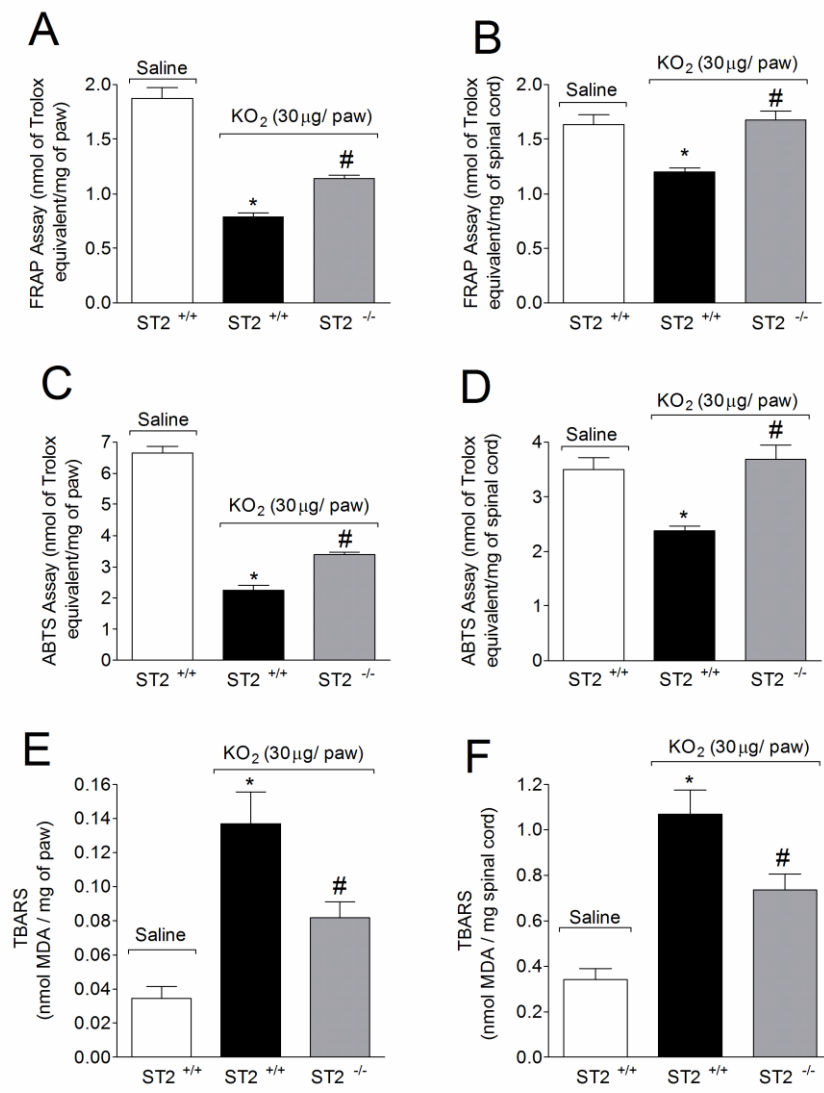


Figure 6.

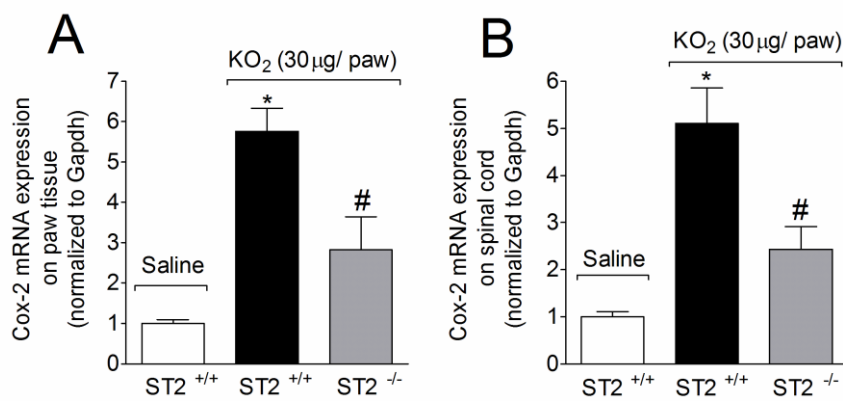


Figure 7.

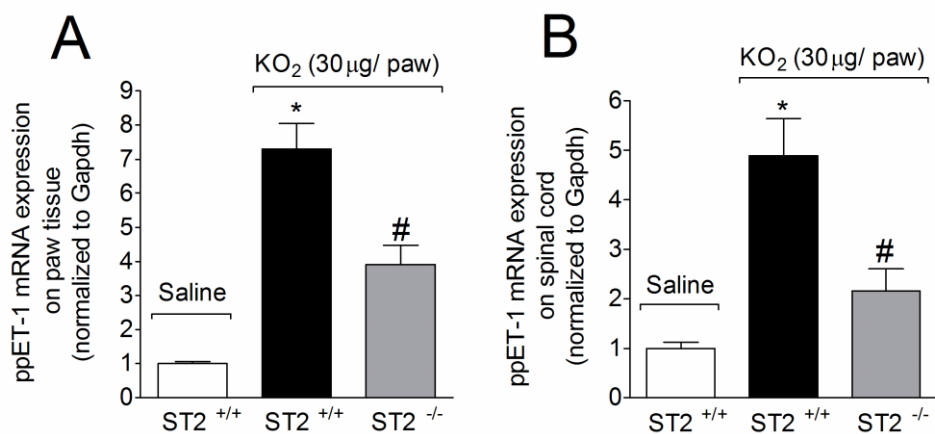


Figure 8.

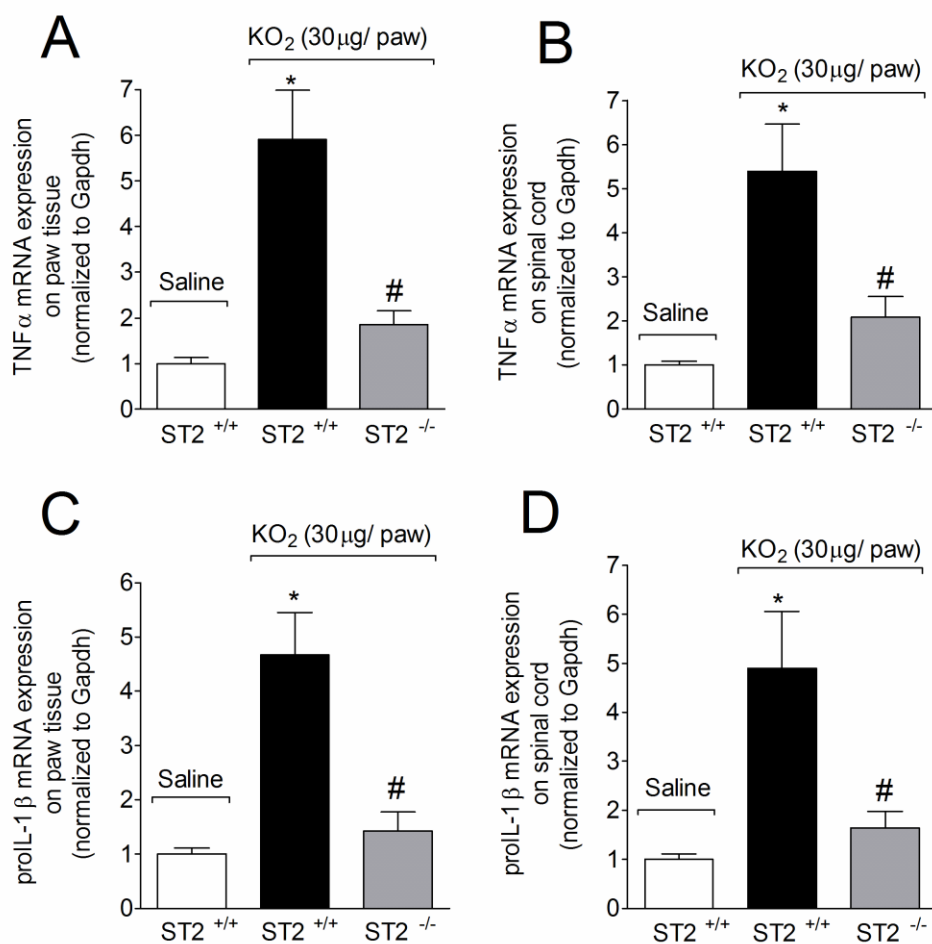


Figure 9.

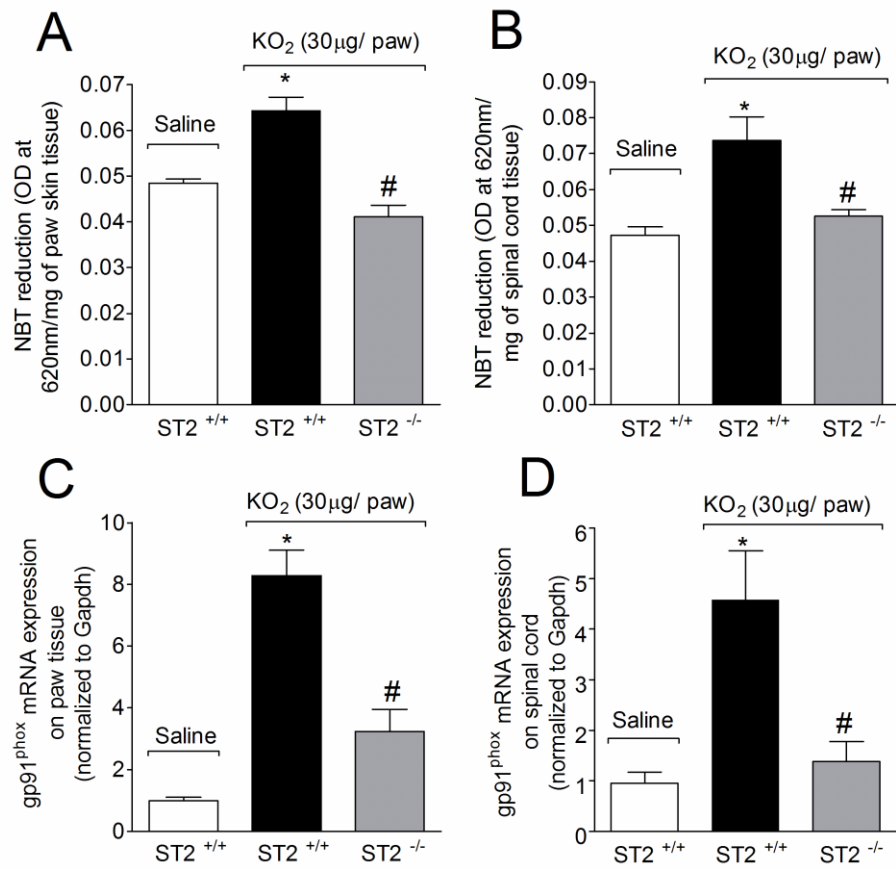
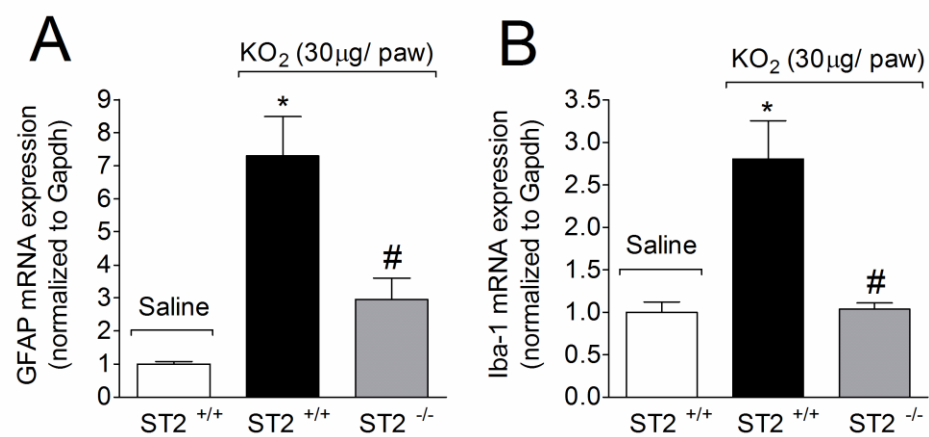


Figure 10.



4.2 Segundo Artigo Científico

TEMPOL, a superoxide dismutase mimetic, inhibits superoxide anion-induced feed forward inflammatory pain in mice

Catia C. F. Bernardy¹ · Ana C. Zarpelon² · Felipe A. Pinho-Ribeiro² · Cássia Calixto-Campos² · Thacyana Teixeira Carvalho² · Victor Fattori² · Sérgio M. Borghi² · Rubia Casagrande³ · Waldiceu A. Verri, Jr²

¹ Department of Nursing, Health Science Centre, Londrina State University, Londrina, Parana, Brazil..

² Department of Pathology, Biological Science Centre, State University of Londrina, Londrina, Parana, Brazil.

³Department of Pharmaceutical Sciences, Health Science Centre, Londrina State University, Londrina, Parana, Brazil

Correspondence: Waldiceu A. Verri Jr., Department of Pathology, Biological Sciences Centre, Londrina State University. Rod. Celso Garcia Cid Pr 445, KM 380, Londrina, Parana, Brazil, Cx. Postal 10.011, CEP 86057-970. Fax: + 55 43 33714387, Tel: + 55 43 33714979, Email address: waldiceujr@yahoo.com.br; waverri@uel.br

Abstract

Objective The anti-inflammatory and analgesic effects of tempol in superoxide anion-induced pain and inflammation were evaluated.

Treatment Tempol (10 – 100 mg/kg, i.p.) 40 min before potassium superoxide (KO₂, 30 µg, i.pl., a superoxide anion donor).

Methods Mechanical hyperalgesia, thermal hyperalgesia and paw edema were determined using an electronic anesthesiometer, hot plate, and caliper, respectively. mRNA expression was analyzed by qPCR. Reduction of antioxidant defenses was evaluated by FRAP and ABTS assays, and superoxide anion production was determined by NBT method. Data were analyzed by ANOVA followed by Tukey's post hoc and significant $p < 0.05$.

Results Tempol treatment at the dose of 100 mg/kg was effective in reducing KO₂-induced mechanical hyperalgesia, thermal hyperalgesia, and paw edema 1–5 h after stimulus injection. KO₂ induced cytokine, COX-2, preproET-1, and gp91^{phox} mRNA expression and oxidative stress in the paw skin and spinal cord, and GFAP and Iba-1 mRNA expression in the spinal cord. On the other hand, KO₂ inhibited Nrf2 mRNA expression. All KO₂ effects were inhibited by tempol treatment.

Conclusion These results demonstrate that superoxide anion induces molecular alterations resulting in pain and inflammation. The counteraction of excessive superoxide anion with tempol treatment is capable of inhibiting superoxide anion-induced inflammation and pain.

Keywords Superoxide anion · oxidative stress · spinal cord · tempol.

Introduction

Reactive oxygen species are produced during inflammatory reactions at rates that overwhelm the endogenous antioxidant capacity, leading to local tissue injury. Superoxide anion is the initial product of oxygen reduction and its inhibition represents an important step to prevent the deleterious events related to oxidative stress [1,2]. After the tissue injury and/or infection, neutrophils are recruited following inflammatory and chemotactic signals, including the inflammatory cytokine interleukin 1 beta (IL-1 β), tumor necrosis factor (TNF) [3] and reactive oxygen species [4]. These signals also activate neutrophils and the NADPH oxidase present in these cells, increasing superoxide anion production. However, the exacerbation of superoxide anion may lead to deleterious effects in inflammation [5] such as pain and neutrophil migration [6]. The terminal endings of nociceptive neurons are widespread in all tissues where they identify noxious (intense) stimuli, including trauma, heat, and cold. In fact, reactive oxygen species and cytokines activate and sensitize nociceptive neurons during the inflammatory response [7-9]. Curiously, the nociceptive transmission is enhanced by reactive oxygen species not only at the site of initial injury, but also at the spinal cord level in response to increased nociceptive transmission after a peripheral injury [10]. In this sense, the inhibition of superoxide anion production at peripheral and central sites is a promising target to inhibit inflammatory pain.

Tempol (4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-N-oxyl or 4-hydroxy-tempo) is a water-soluble superoxide dismutase (SOD) mimetic capable of passing through biological membranes due to its low molecular weight [11]. Tempol inhibits superoxide anion-induced neuronal firing, the thermal hyperalgesia and edema induced by carrageenan (Cg) in rats [10,12]. Tempol treatment also eliminates free radicals and inhibits lipid peroxidation *in vitro* [13].

In the present study, the effect of tempol in superoxide anion-triggered pain and inflammation was evaluated in mice.

Materials and methods

Animals

The experiments were performed on male Balb/c mice (20-25 g) housed in standard plastic cages (six mice per cage) with free access to food and water. All behavioral testing was performed between 9:00 am and 5:00 pm in a temperature- and light-controlled room. Animals' care and handling procedures were in accordance with the International Association for Study of Pain (IASP) guidelines and with the approval of the Ethics Committee of Londrina State University (process 7706.2013-42).

Drugs and reagents

Potassium superoxide (KO_2) 96.5% was purchased from Alfa Aesar (Ward Hill, MA, USA), 1-Oxyl-2,2,6,6-tetramethyl-4-hydroxypiperidine (tempol) 99% was purchased from Santa Cruz Biotechnoly, nitroblue tetrazolium (NBT) was purchased from Amresco (Solon, OH, USA), ferric chloride hexahydrate, 2,4,6-tripiridil-s-triazine (TPTZ) was purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) and ABTS [2,20-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)] was purchased from from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Experimental protocols

Mice were treated with tempol (10 – 100 mg/kg, 100 μL , i.p.) or vehicle (sterile saline, 100 μL , i.p.) and after 40 min received the injection of KO_2 (30 μg , 25 μL , i.pl.) or

saline (25 μ l, i.pl.) for mechanical and thermal hyperalgesia, and paw edema at 1 – 5 h. The dose of KO₂ was selected based on previous studies [14].

The cytokine (TNF α and pro IL-1 β), cyclooxygenase-2 (COX-2), prepro-endotelin-1 (preproET-1) were determined in tissue samples in paw skin and spinal cord (L4 – L6) 3 h after KO₂ (30 μ g, 25 μ L, i.pl.) or sterile saline (25 μ L, i.pl.) injection. In the same way, antioxidant capacity (FRAP and ABTS assays) was accessed. Superoxide anion production (NBT reduction assay) and 91^{phox} (gp91^{phox}) mRNA expression in paw skin and spinal cord tissues, as well as, nuclear factor erythroid 2-related factor mRNA expression also were evaluated. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and ionized calcium binding adaptor molecule 1 (Iba-1) mRNA expression was determined in spinal cord samples. .

Electronic pressure meter test of mechanical hyperalgesia

The test consisted of evoking a hind paw reflex with a hand-held force transducer (electronic von Frey anesthesiometer; Insight, Ribeirão Preto, SP, Brazil) adapted with a 0.5 mm² polypropylene tip. Detailed methodology was previously described by Cunha et al 2004 [15]. The results are expressed by delta (Δ) of withdrawal threshold (in g) calculated by subtracting the basal measurements from the measurements at the indicated time points after stimulus injection.

Hot Plate Test

The test was performed as reported previously [16]. Briefly, mice were placed the hot plate apparatus (EFF 361, Insight Equipamentos, Ribeirao Preto, SP, Brazil) maintained at 55 °C. The reaction time was scored when the pain reactions of hind paw licking or flinching occurred in the injected paw. As the basal latencies were always smaller than

20 s (between 15 and 18 s), a maximum latency (cut-off) was set at 20 s to avoid tissue damage.

Paw edema

The paw edema formation was measured using a caliper (Digimatic Caliper, Mitutoyo Corporation, Kanagawa, Japan). Values of paw thickness are expressed as the difference (Δ mm) between the values obtained just before (basal) and after stimulus injection.

Real-time PCR and quantitative PCR

Paw skin tissue and spinal cord samples were collected 3 h after KO₂ (30 μ g, 25 μ L, i.pl.) or saline (25 μ L, i.pl.) injection and homogenized in Trizol[®] reagent. The total RNA was extracted using the SV Total RNA Isolation System (Promega Biosciences, Fithburg, WI, USA). RT-PCR and quantitative PCR were performed using GoTaq[®] 2-Step RT-qPCR System (Promega) following the manufacturer's directions. Complementary DNA was reverse transcribed from 2 μ g of total RNA, and quantitative PCR was performed on a LightCycler[®] Nano Instrument (Roche). The following primer sequences were used: TNF α : sense 5'-TCTCATCAGTTCTATGGCCC-3', antisense 5'-GGGAGTAGACAAGGTACAAC-3'; IL-1 β : sense 5'-GAAATGCCACCTTTTGACAGTG-3', antisense 5'-TGGATGCTCTCATCAGGACAG-3'; IL-10: sense 5'-TCTCATCAGTTCTATGGCCC-3'; antisense 5'-GGGAGTAGACAAGGTACAAC-3'; COX-2: sense 5'-GTGGAAAAACCTCGTCCAGA-3, antisense 5'-GCTCGGCTTCCAGTATTGAG-3'; preproET-1 sense 5'-TGTGTCTACTTCTGCCACCT-3', antisense 5'-CACCAGCTGCTGATAGATAC-3'; Nrf2: sense 5'-TCACACGAGATGAGCTTAGGGCAA-3', antisense 5'-TACAGTTCTGGGCGGCG ACTTTAT-3'; gp91phox: sense 5'-

AGCTATGAGGTGGTGATGTTAGTGG-3', antisense 5' -
 CACAATATTTGTACCAGACAGACTTGAG-3'; GFAP: sense 5'-
 GGCGCTCAATGCTGGCTTCA-3', antisense 5'-TCTGCCTCCAGCCTCAGGTT-3';
 Iba-1: sense 5'-ATGGAGTTTGATCTGAATGGAAAT-3', antisense 5'-
 TCAGGGCAGCTCGGAGATAGCTTT-3'; Gapdh: sense 5'-
 CATACCAGGAAATGAGCTTG-3', antisense 5' -ATGACATCAAGAAGGTGGTG-
 3'. The expression of Gapdh mRNA was used as a reference gene to normalize data.

FRAP assay

Mice were euthanized and samples of paw skin tissue and spinal cord were collected 3 h after KO₂ (30 µg, 25 µL, i.pl.) or saline (25 µL, i.pl.) injection. The ability to reduce ferric of paw skin tissue and spinal cord were determined by FRAP assay [17,18]. The samples (30 mg approximately) were homogenized in 500 µL of KCl (1.15%) using a Tissue-Tearor (Biospec products, Bartlesville, OK, USA) and centrifuged (1.000 g, 10 min, 4°C), and the supernatant was employed to measure the antioxidant capacity of samples. The supernatant (30 µL) was mixed with the FRAP reagent (0.3 mM acetate buffer pH 3.6, 10 mM TPTZ in 40 mM hydrochloride acid, and 20 mM ferric chloride) and incubated at 37°C for 30 min. The absorbance was determined in 595 nm (Helios Alfa, Thermo Spectronic). Previously, a curve of trolox was prepared and the results are presented as nanomoles of trolox equivalent per milligram of tissue.

ABTS assay

Mice were euthanized and the tissue samples of paw skin tissue and spinal cord were collected 3 h after KO₂ (30 µg, 25 µL, i.pl.) or saline (25 µL, i.pl.) injection. The ability of samples to resist oxidative damage was determined by their ability to scavenge the ABTS radical. The supernatant was the same employed to measure the antioxidant

capacity on FRAP assay. The solution of ABTS was prepared with 7 mM of ABTS and 2.45 mM of potassium persulfate diluted with phosphate buffer pH 7.4 to an absorbance of 0.7-0.8 in 730 nm was prepared. The supernatant was mixed on ABTS solution and after 6 min the absorbance was determined in 730 nm (Helios Alfa, Thermo Spectronic) [17,18]. A curve of trolox was prepared and the results are presented as nanomoles of trolox equivalent per milligram of tissue.

Superoxide anion production

Mice were euthanized and the tissue samples of paw skin tissue and spinal cord were collected 3 h after KO₂ (30 µg, 25 µL, i.pl.) or saline (25 µL, i.pl.) injection. The measurement of superoxide anion production in tissue homogenates was performed using the NBT assay as described previously [19]. Briefly, 50 µL of homogenates were incubated with 100 µL of NBT (1 mg/ml) in 96-wells plate for 15 min. The supernatant was then carefully removed and reduced formazan solubilized by adding 120 µL of KOH 2M and 120 µL of dimethylsulfoxide (DMSO). Reduction of NBT to formazan was measured at 600 nm using a microplate spectrophotometer reader (Multiskan GO, Thermo Scientific). The tissue weight was used for data normalization and the results are expressed as NBT reduction as optical density per mg of tissue.

Statistical analysis

Results are presented as means \pm SEM of measurements made on 6 mice per group per experiment and are representative of 2 separated experiments. Two-way analysis of variance (ANOVA) was used to compare the groups and doses at all times (curves). The analyzed factors were treatments, time, and time versus treatment interaction. When there was a significant time versus treatment interaction, one-way ANOVA followed by

Tukey's *t*-test was performed for each time. Statistical differences were considered to be significant at $p < 0.05$.

Results

Tempol inhibits KO₂-induced hyperalgesia and edema.

KO₂ (superoxide anion donor) induced mechanical (Fig. 1A) and thermal hyperalgesia (Fig. 1B) and paw edema (Fig. 1C) between 1 – 5 h. On the other hand, tempol inhibited the KO₂-induced mechanical hyperalgesia (Fig. 1A), thermal hyperalgesia (Fig. 1B) and edema (Fig. 1C) in a dose- and time-dependent manner. The most effective dose was 100 mg/kg of tempol, which was selected for the next experiments.

Tempol inhibits KO₂-induced cytokine mRNA expression in the paw skin and spinal cord.

Mice were treated with tempol (100 mg/kg, 100 μ L, i.p.) 40 min before the KO₂ stimulus (30 μ g/paw) and after 3 h the paw skin and spinal cord samples were collected for cytokine mRNA expression evaluation by qPCR. Tempol inhibited the KO₂-induced TNF α and IL-1 β mRNA expression in the paw skin and spinal cord samples (Fig. 2A, 2C, 2B and 2D, respectively).

Tempol inhibits the KO₂-induced COX-2 mRNA expression

Tempol significantly inhibited KO₂-induced COX-2 mRNA expression in the paw skin and spinal cord samples (Fig. 3A and 3B).

Tempol inhibits the KO₂ induced preproET-1 mRNA expression

Tempol significantly inhibited KO₂-induced preproET-1 mRNA expression in the paw skin and spinal cord samples (Fig. 4A and 4B).

Tempol inhibits KO₂-induced oxidative stress

In this experimental setting whether the inflammation and hyperalgesia induced by superoxide anion depends on further induction of ROS including superoxide anion was evaluated effect of in the paw skin and in spinal cord samples 3h after KO₂ injection. KO₂ induced endogenous antioxidant depletion as observed by inhibition of ferric reducing antioxidant power (FRAP) in the paw skin and spinal cord samples (Fig. 5A and 5B, respectively), ABTS radical scavenging ability (Fig. 5C and 5D). On the other hand, the treatment with tempol (100 mg/kg, 100 μ L i.p) inhibited the KO₂-induced depletion of FRAP (Fig. 5A and 5B, respectively), and ABTS (Fig. 5C and 5D) in paw skin and spinal cord samples.

Tempol inhibits KO₂-induced superoxide anion production and gp91^{phox}, mRNA expression in paw skin and spinal cord

Tempol inhibited KO₂-induced increase of superoxide anion production in the paw skin and spinal cord samples (Fig. 6A and 6B). Tempol also inhibited KO₂-induced gp91^{phox} mRNA expression subunit of NADPH oxidase in the paw skin and spinal cord samples (Fig. 6C and 6D).

Tempol inhibits KO₂-induced decrease of Nrf2 mRNA expression in paw skin and spinal cord.

Tempol significantly inhibited KO₂-induced decrease of nuclear factor (erythroid-derived 2)-like (Nrf2) in paw skin and spinal cord samples (Fig. 7A and 7B). The protocol was identical as for Fig. 2.

Tempol inhibits the KO₂-induced glial cells activation in the spinal cord

Tempol inhibited KO₂-induced spinal cord activation of astrocytes (GFAP, Fig. 8A) and microglia (Iba-1, Fig. 8B). The protocol was identical as for Fig. 2.

Discussion

Overproduction of superoxide anion has been implicated in excessive inflammatory response and pain by a feed forward mechanism in which superoxide anion oxidizes SOD resulting in persistent high levels of superoxide anion [1,2,10,20]. In the present study, the effect of the SOD mimetic tempol over superoxide anion-induced pain and inflammation was tested. Tempol inhibited superoxide anion-induced pain and inflammation and reduced the production of inflammatory mediators and oxidative stress. Importantly, tempol reduced the production of superoxide anion.

There seems to be a strong interaction of inflammatory signaling to amplify superoxide anion production and vice-versa. For instance, TLR/IRAK signaling leads to a fast activation of NADPH oxidases resulting in superoxide anion production [21,22] and superoxide anion mediates TLR4-induced NF-κB activation since NF-κB is a redox-sensitive transcription factor [23]. In fact, NF-κB activation has been implicated in *de novo* superoxide anion production [23] and TLR4 activation induces inflammatory

pain [24]. Cytokine such as $\text{TNF}\alpha$ also can activate NADPH oxidases to induce superoxide anion production [25], and $\text{TNF}\alpha/\text{TNFR1}$ signaling mediates superoxide anion-triggered pain and oxidative stress as well as $\text{TNF-}\alpha$ -induced hyperalgesia depends on superoxide anion [6]. Endothelin-1 (ET-1) is also a hyperalgesic peptide [26], which mediates superoxide anion-induced pain, cytokine production and oxidative stress [27]. The activation of COX-2 induces the production of prostanoids and also of superoxide anion [28], and superoxide anion induces the expression of COX-2 [14,23]. The present data show that tempol inhibited superoxide anion-induced $\text{TNF-}\alpha$, IL-1 β , COX-2 and prepro-ET-1 mRNA expression, therefore, suggesting tempol treatment reduces the production of inflammatory molecules triggered by superoxide anion and that this mechanism might contribute to reduce superoxide anion-induced pain and inflammation.

It is also important to mention that superoxide anion activates terminal endings of nociceptive neurons through the redox-sensitive transient receptor potential (TRP)A1 [9,29] and reduces the threshold of nociceptive neurons through PKC ϵ -mediated TRPV1 activation [30]. Therefore, superoxide anion can directly activate nociceptive neurons to induce pain. Interestingly, neurotransmission seems to have a role in inducing superoxide anion production since glutamate triggers it [31]. Taking into account this evidence and the present data, it is likely that superoxide anion can present direct and indirect effect in nociception, which would be the direct nociceptive neuron activation as well as indirect activation via hyperalgesic molecules such as cytokines, ET-1 and prostanoids [32].

Inflammatory response at peripheral sites increases the nociceptive inputs at the spinal cord, which results in a process known as pain-induced or activity-dependent sensitization [33]. Spinal glial cells respond to increased neurotransmission producing

inflammatory cytokines and reactive oxygen species, including superoxide anion [34]. Considering that tempol is cell-permeable and also cross the blood-spinal cord barrier due to its low molecular weight, it is possible that the anti-hyperalgesic effects of tempol reported here also reflect its activity at spinal cord level, what need to be further investigated. Nevertheless, the peripheral inhibition of nociceptive input also reduces the spinal cord activation [33]. Herein, tempol inhibited the inflammatory molecules mRNA expression and oxidative stress in the paw skin and spinal cord. It is reasonable that this overall reduction of inflammation in the periphery and spinal cord resulted in reduced activation of spinal cord. The glial cell markers GFAP and Iba-1 reflect the activation of astrocytes and microglia in the spinal cord. These cells contribute to hyperalgesia by producing nociceptive molecules and amplifying the nociceptive transmission through cytokine production [35].

In addition to nitration of MnSOD, it is possible that superoxide anion induces its own production via NADPH oxidase. In fact, KO_2 induced gp91^{Phox} mRNA expression and KO_2 -induced NBT reduction, and both effects were inhibited by tempol. Importantly, the superoxide anion production by NBT was observed 3h after KO_2 injection. In saline solution superoxide anion vanishes in up to 10 min. Therefore, it is unlikely that the superoxide anion production observed 3 h after KO_2 injected reflected the superoxide anion that was injected, but rather superoxide anion that was produced in response to the inflammatory stimulus. Thus, in addition to the increase of superoxide anion by the inhibition of SOD [36], superoxide anion increases its own levels.

Summing up, evidence shows that superoxide anion induces hyperalgesia by inducing nitration of SOD, which results in increasing levels of superoxide anion [36]. The present data contribute to the superoxide anion mechanisms showing that superoxide anion also induces its own production at later time points and up-regulates

the NADPH oxidase system as observed by increase of gp91^{phox} mRNA expression. Corroborating, the SOD mimetic tempol inhibited superoxide anion-induced superoxide anion production and gp91^{phox} mRNA expression. Furthermore, superoxide anion effects are not entirely dependent on direct activation of nociceptive neurons, but rather also depends on further production of inflammatory molecules including cytokines, prostanoids and ET-1 (present data, 6,14,20,27). In fact, targeting cytokines, prostanoids and ET-1 (present data, 6,14,20,27), and tempol treatment (present data) reduce superoxide anion-induced pain and inflammation. Finally, the superoxide anion-induced peripheral inflammation results in spinal cord activation of astrocytes and microglia, which contribute to chronification of pain, and importantly, tempol treatment inhibited the superoxide anion-induced spinal cord glial cell activation.

Acknowledgments

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Ministério da Ciência Tecnologia e Inovação (MCTI), Secretaria da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior (SETI), Fundação Araucária and Parana State Government grants supported this study (Brazil).

Compliance with ethical standards

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Henderson LM, Chappel JB. NADPH oxidase of neutrophils. *Biochim Biophys Acta*. 1996; 1273: 87–107
2. Nathan, C. Immunology: Oxygen and the inflammatory cell. *Nature*. 2003; 422: 675–76.
3. Sadik CD, Kim ND, Luster AD. Neutrophils cascading their way to inflammation. *Trends Immunol*. 2011, 32: 452–60.
4. Niethammer P, Grabher C, Look AT, Mitchison TJ. A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish. *Nature*. 2009; 459: 996–999.
5. El-Benna J, Dang PMC, Gougerot-Pocidallo MA. Priming of the neutrophil NADPH oxidase activation: Role of p47phox phosphorylation and NOX2 mobilization to the plasma membrane. *Semin Immunopathol*. 2008; 30: 279–289.
6. Yamacita-Borin F, Zarpelon AC, Pinho-Ribeiro F, Fattori V, Alves-Filho JC, Cunha FQ, Cunha TM, Casagrande R, Verri Jr WA. Superoxide anion-induced pain and inflammation depends on TNF α /TNFR1 signaling in mice. *Neuroscience Letters*. 2015; 605: 53–58.
7. Ustinova EE, Schultz HD. Activation of cardiac vagal afferents by oxygen-derived free radicals in rats. *Circ Res*. 1994; 74: 895–903.
8. Schultz HD, Ustinova EE. Capsaicin receptors mediate free radical-induced activation of cardiac afferent endings. *Cardiovasc Res*. 1998; 38: 348–355.
9. Caceres AI, Brackmann M, Elia MD, Bessac BF, Del Camino D, D'Amours M, Witek JS, Fanger CM, Chong JA, Hayward NJ, Homer RJ, Cohn L, Huang X, Moran MM, Jordt SE. A sensory neuronal ion channel essential for airway inflammation and hyperreactivity in asthma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106: 9099-104.

10. Wang ZQ, Porreca F, Cuzzocrea S, Galen K, Lightfoot R, Masini E, Muscoli C, Mollace V, Ndengele M, Ischiropoulos H, Salvemini D. A newly identified role for superoxide in inflammatory pain. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2004; 309: 869-878.
11. Laight DW, Andrews TJ, Haj-Yehiab AI, Carriera MJ, Änggarda EE. Microassay of superoxide anion scavenging activity in vitro. *Environ Toxicol Pharmacol*. 1997; 3: 65–68.
12. Khattab MM. TEMPOL, a membrane-permeable radical scavenger, attenuates peroxynitrite- and superoxide anion-enhanced Cg-induced paw edema and hyperalgesia: a key role for superoxide anion. *Eur J Pharmacol*. 2006; 548: 167–73.
13. Nilsson UA, Olsson L-I, Carlin G, Bylund-Fellenius A-C. Inhibition of Lipid Peroxidation by Spin Labels. *Journal of Biological Chemistry*. 1989; 264: 11131-11135.
14. Maioli NA, Zarpelon AC, Mizokami SS, Calixto-Campos C, Guazelli CFS, Hohmann MSN, Pinho-Ribeiro FA, Carvalho TT, Manchope MF, Ferraz CR, Casagrande R, Verri Jr WA. 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*. 2015; 48: 321-331.
15. Cunha TM, Verri Jr WA, Vivancos GG, Moreira IF, Reis S, Parada CA, Cunha FQ, Ferreira SH. An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. *Braz J Med Biol Res*. 2004; 37: 401–7.
16. Navarro SA, Serafim KGG, Mizokami SS, Hohmann MSN, Casagrande R, Verri Jr WA. Analgesic activity of piracetam: Effect on cytokine production and oxidative stress. *Pharmacol Biochem Behav*. 2013; 105: 183–192.

17. Katalinic V, Modun D, Music I, Boban M. Gender differences in antioxidant capacity of rat tissues determined by 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate; ABTS) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2005; 140: 47–52.
18. Ivan ALM, Campanini MZ, Martinez RM, Ferreira VS, Steffen VS, Vicentini FT, Vilela FM, Martins FS, Zarpelon AC, Cunha TM, Fonseca MJ, Baracat MM, Georgetti SR, Verri Jr WA, Casagrande R. Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits UVB-induced skin inflammation and oxidative stress in hairless mice and exhibits antioxidant activity in vitro. *J Photochem Photobiol B Biol*. 2014; 138: 124–33.
19. Hohmann MSN, Cardoso RDR, Pinho-Ribeiro FA, Crespigio J, Cunha TM, Alves-Filho JC, Silva RV, Pinge-Filho P, Ferreira SH, Cunha FQ, Casagrande R, Verri Jr WA. 5-Lipoxygenase Deficiency Reduces Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity and Lethality. *Biomed Res Int*. 2013; doi: 10.1155/2013/627046.
20. Salvemini D, Little JW, Doyle T, Neumann WL. Roles of reactive oxygen and nitrogen species in pain. *Free Radic Biol Med*. 2011; 51: 951–966.
21. Pacquelet S, Johnson JL, Ellis BA, Brzezinska AA, Lane WS, Munafo DB, Catz SD. Cross-talk between IRAK-4 and the NADPH oxidase. *Biochem J*. 2007; 403: 451–461.
22. Maitra U, Singh N, Gan L, Ringwood L, Liwu L. IRAK-1 contributes to lipopolysaccharide-induced reactive oxygen species generation in macrophages by inducing NOX-1 transcription and Rac1 activation and suppressing the expression of antioxidative enzymes. *J Biol Chem*. 2009; 284: 35403–35411.
23. Ndengele MM, Muscoli C, Wang ZQ, Doyle TM, Matuschak GM, Salvemini, D. Superoxide potentiates NF-kappaB activation and modulates endotoxin-induced cytokine production in alveolar macrophages. *Shock*. 2005; 23: 186–193.

24. Calil IL, Zarpelon AC, Guerrero AT, Alves-Filho JC, Ferreira SH, Cunha FQ, Cunha TM, Verri Jr WA. Lipopolysaccharide induces inflammatory hyperalgesia triggering a TLR4/MyD88-dependent cytokine cascade in the mice paw. *PLoS One*. 2014; 9: e90013.
25. Kilpatrick LE, Sun S, Li H, Vary TC, Korchak HM. Regulation of TNF-induced oxygen radical production in human neutrophils: role of delta-PKC. *J Leukoc Biol*. 2010; 87:153-164.
26. Verri Jr WA, Guerrero ATG, Fukada SY, Valerio DA, Cunha TM, Xu D, Ferreira SH, Liew FY, Cunha FQ. IL – 33 mediates antigen – induced cutaneous and articular hypernociception in mice. *PNAS*. 2008; 105:2723-2728.
27. Serafim KGG, Navarro SA, Zarpelon AC, Pinho-Ribeiro FA, Fatori V, Cunha TM, Alves-Filho JC, Cunha FQ, Casagrande R, Verri Jr WA. Bosentan, a mixed endothelin receptor antagonist, inhibits superoxide anion-induced pain and inflammation in mice. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 2015; 388:1211–1221
28. Kukreja, R.C., Kontos, H.A., Hess, M.L., Ellis, E.F., 1986. PGH synthase and lipoxygenase generate superoxide in the presence of NADH or NADPH. *Circ. Res*. 59, 612–619.
29. Bessac BF, Sivula M, Von Hehn CA, Escalera J, Cohn L, Jordt SE. TRPA1 is a major oxidant sensor in murine airway sensory neurons. *J Clin Invest*. 2008; 118: 1899–1910.
30. Susankova K, Tousova K, Vyklicky L, Teisinger J, Vlachova V. Reducing and oxidizing agents sensitize heat-activated vanilloid receptor (TRPV1) current. *Mol Pharmacol*. 2006; 70: 383–94.
31. Muscoli C, Mollace V, Wheatley J, Masinic E, Ndengelea M, Wanga Z-Q, Salvemina D. Superoxide-mediated nitration of spinal manganese superoxide

- dismutase: A novel pathway in N-methyl-D-aspartate-mediated hyperalgesia. *Pain*. 2004; 111: 96–103.
32. Verri Jr WA, Cunha TM, Parada CA, Poole S, Cunha FQ, Ferreira SH. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: Targets for analgesic drug development?. *Pharmacology & Therapeutics*. 2006; 112: 116–138.
33. Ji RR, Kohno T, Moore KA, Woolf CJ. Central sensitization and LTP: do pain and memory share similar mechanisms? *Trends Neurosci*. 2003; 26: 696–705.
34. Tavares S, Berta T, Chen G, Ji RR. Microglia and spinal cord synaptic plasticity in persistent pain. *Neural Plast*. 2013; doi: 10.1155/2013/753656
35. Zarpelon AC, Rodrigues FC, Lopes AH, Souza GR, Carvalho TT, Pinto LG, Xu D, Ferreira SH, Alves-Filho JC, McInnes IB, Ryffel B, Quesniaux VFJ, Reverchon F, Mortaud S, Menuet A, Liew FY, Cunha FQ, Cunha TM, Verri Jr WA. Spinal cord oligodendrocyte-derived alarmin IL-33 mediates neuropathic pain. *FASEB Journal*. 2016; 30: 54-65.
36. Salvemini D, Riley DP, Cuzzocrea S. SOD mimetics are coming of age. *Nature review*. 2002; 5: 367-374.

Figures legends

Fig. 1 Superoxide anion-induced hyperalgesia and edema is inhibited by tempol.

Mice were treated with tempol (10 – 100 mg/kg, 100 μ L, i.p.) or vehicle (saline, 100 μ L, i.p.) 40 min before KO₂ injection (30 μ g, 25 μ L, i.pl.) or saline (25 μ l). The nociceptive thresholds to mechanical (A) and thermal (B) stimuli, and the paw edema (C) were measured 1 – 5 h after KO₂ injection. Results are expressed as means \pm SEM, ($n = 6$ per group per experiment, representative of two separate experiments) [$*p < 0.05$ vs. saline group); $^{\#}p < 0.05$ vs. KO₂ group + vehicle; $^{**}p < 0.05$ vs. KO₂ group + tempol 10 mg/kg; $^{###}p < 0.05$ vs. KO₂ group+ tempol 30 mg/kg, (ANOVA followed by Tukey's t test)].

Fig. 2 Tempol inhibited KO₂-induced pro-inflammatory cytokine expression in paw skin and spinal cord tissues.

Mice were treated with tempol (100 mg/kg, 100 μ L, i.p.) or vehicle (saline, 100 μ L, i.p.) 40 min before KO₂ injection (30 μ g, 25 μ L, i.pl.). Paw skin and spinal cord tissues (L4-L6) were collected 3 h after KO₂-stimulus and TNF α mRNA of paw skin or spinal cord tissue (A and B, respectively) and IL-1 β (C and D) were evaluated for qPCR. Results were normalized with Gapdh and expressed as means \pm SEM, ($n = 6$ per group per experiment, representative of two separate experiments) [$*p < 0.05$ vs. saline group); $^{\#}p < 0.05$ vs. KO₂ group, (one-way ANOVA followed by Tukey's t test)].

Fig 3. Tempol inhibited KO₂-induced COX-2 expression in paw skin and spinal cord tissues.

Mice were treated with tempol (100 mg/kg, 100 μ L, i.p.) or vehicle (saline, 100 μ L, i.p.) 40 min before KO₂ injection (30 μ g, 25 μ L, i.pl.). Paw skin and spinal cord tissues (L4-L6) were collected 3 h after KO₂-stimulus and COX-2 mRNA expression of paw skin or spinal cord tissues (A and B, respectively), were evaluated for qPCR. Results were normalized with Gapdh and expressed as means \pm SEM, ($n = 6$ per

group per experiment, representative of two separate experiments) [$*p < 0.05$ vs. saline group); $\#p < 0.05$ vs. KO₂ group, (one-way ANOVA followed by Tukey's *t* test)].

Fig 4. Tempol inhibited KO₂-induced preproET-1 expression in paw skin and spinal cord tissues. Mice were treated with tempol (100 mg/kg, 100 μ L, i.p.) or vehicle (saline, 100 μ L, i.p.) 40 min before KO₂ injection (30 μ g, 25 μ L, i.pl.). Paw skin and spinal cord tissues (L4-L6) were collected 3 h after KO₂-stimulus and preproET-1 mRNA expression of paw skin or spinal cord tissues (A and B, respectively), were evaluated for qPCR. Results were normalized with Gapdh and expressed as means \pm SEM, ($n = 6$ per group per experiment, representative of two separate experiments) [$*p < 0.05$ vs. saline group); $\#p < 0.05$ vs. KO₂ group, (one-way ANOVA followed by Tukey's *t* test)].

Fig. 5 KO₂-induced oxidative stress in paw skin and spinal cord tissues depends on superoxide anion production. Mice were treated with tempol (100 mg/kg, 100 μ L, i.p.) or vehicle (saline, 100 μ L, i.p.) 40 min before the , KO₂ (30 μ g, 25 μ L, i.pl.), or saline (25 μ L, i.pl.) injection. Tissue samples from paw skin and spinal cord (L4-L6) were collected 3 h after the stimulus injection, and the oxidant capacity was evaluated by FRAP test (A and B, respectively) and ABTS test (C and D). Results are expressed as means \pm SEM, ($n = 6$ per group per experiment, representative of two separate experiments) [$*p < 0.05$ vs. saline group; $\#p < 0.05$ vs. KO₂ group, (one-way ANOVA followed by Tukey's *t* test)].

Fig 6. KO₂-induced superoxide anion production for active the NADPH oxidative which is inhibited by tempol. Mice were treated with tempol (100 mg/kg, 100 μ L, i.p.) or vehicle (saline, 100 μ L, i.p.) 40 min before KO₂ injection (30 μ g, 25 μ L, i.pl.). Paw skin and spinal cord tissue (L4-L6) were collected 3 h after KO₂-stimulus and the NBT reduction (A and B, respectively) or gp91^{phox} mRNA expression (C and D) were

evaluated for OD and qPCR, respectively. Results were normalized with Gapdh and expressed as means \pm SEM, ($n = 6$ per group per experiment, representative of two separate experiments) [$*p < 0.05$ vs. saline group); $^{\#}p < 0.05$ vs. KO₂ group, (one-way ANOVA followed by Tukey's t test)].

Fig 7. Tempol increases Nrf2 mRNA expression decreased by KO₂ in paw skin and spinal cord tissue. Mice were treated with tempol (100 mg/kg, 100 μ L, i.p.) or vehicle (saline, 100 μ L, i.p.) 40 min before KO₂ injection (30 μ g, 25 μ L, i.pl.). Paw skin and spinal cord tissues (L4-L6) were collected 3 h after KO₂-stimulus and Nrf2 mRNA expression of paw skin or spinal cord tissues (A and B, respectively) were evaluated for qPCR. Results were normalized with Gapdh and expressed as means \pm SEM, ($n = 6$ per group per experiment, representative of two separate experiments) [$*p < 0.05$ vs. saline group); $^{\#}p < 0.05$ vs. KO₂ group, (one-way ANOVA followed by Tukey's t test)].

Fig 8. KO₂-induced astrocytes and microglia activation which is inhibited for tempol treatment. Mice were treated with tempol (100 mg/kg, 100 μ L, i.p.) or vehicle (saline, 100 μ L, i.p.) 40 min before KO₂ injection (30 μ g, 25 μ L, i.pl.). Spinal cord tissues (L4-L6) were collected 3 h after KO₂-stimulus and the mRNA expression of astrocytes (GFAP) and microglia (Iba-1) (A and B, respectively) were evaluated for qPCR. Results were normalized with Gapdh and expressed as means \pm SEM, ($n = 6$ per group per experiment, representative of two separate experiments) [$*p < 0.05$ vs. saline group); $^{\#}p < 0.05$ vs. KO₂ group, (one-way ANOVA followed by Tukey's t test)].

Figure 1

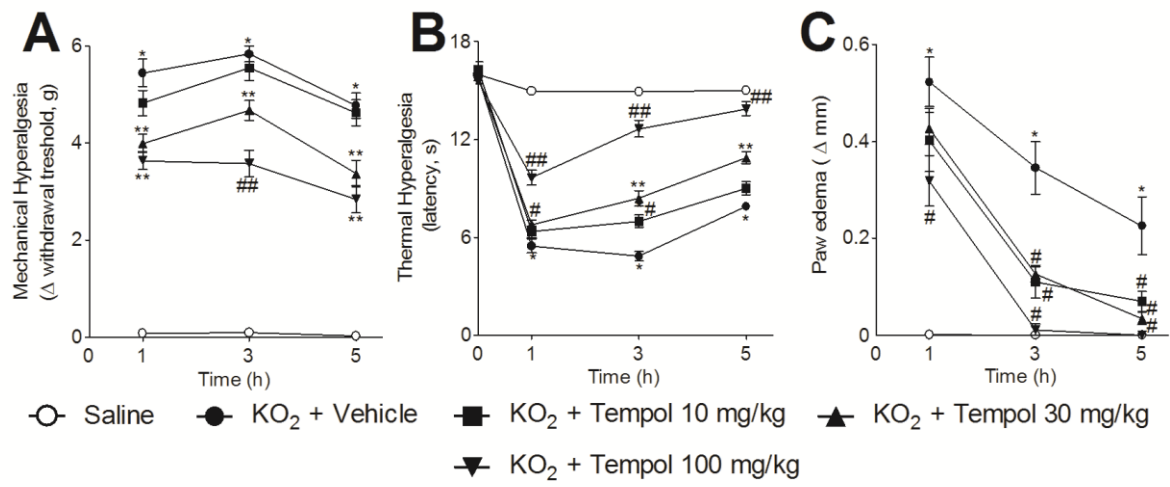


Figure 2

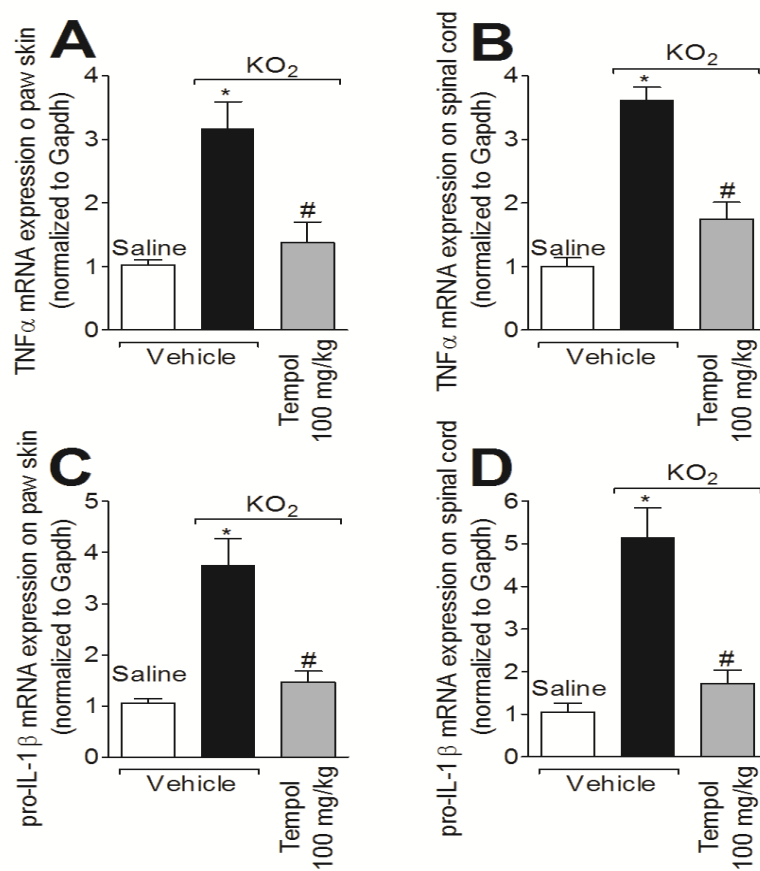


Figure 3

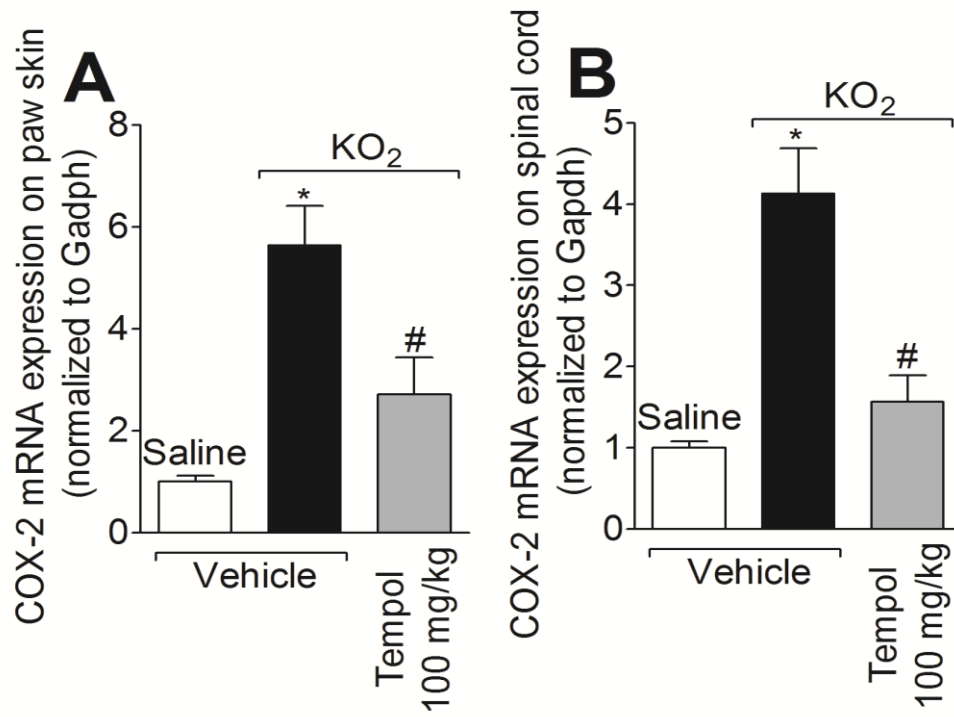


Figure 4

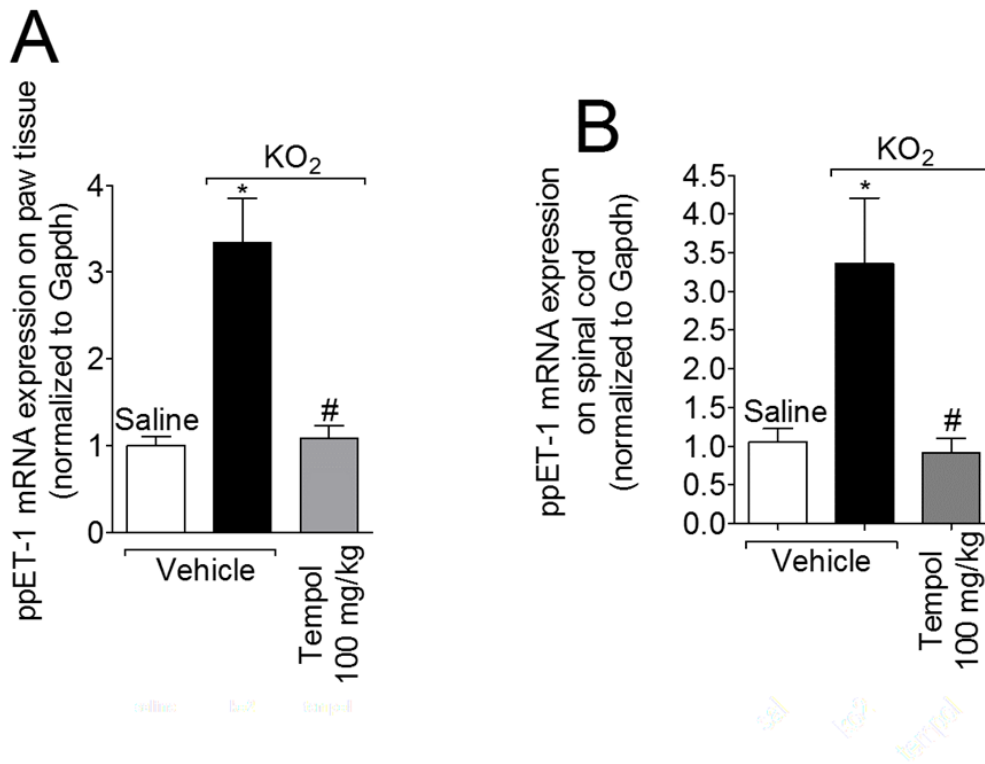


Figure 5

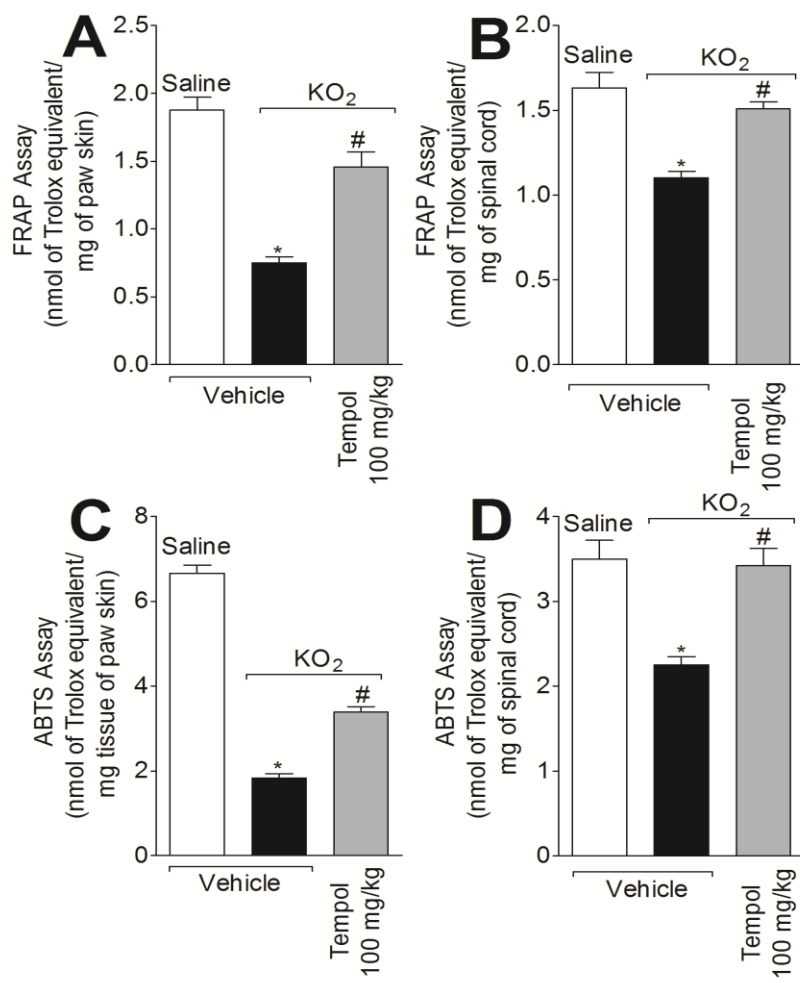


Figure 6

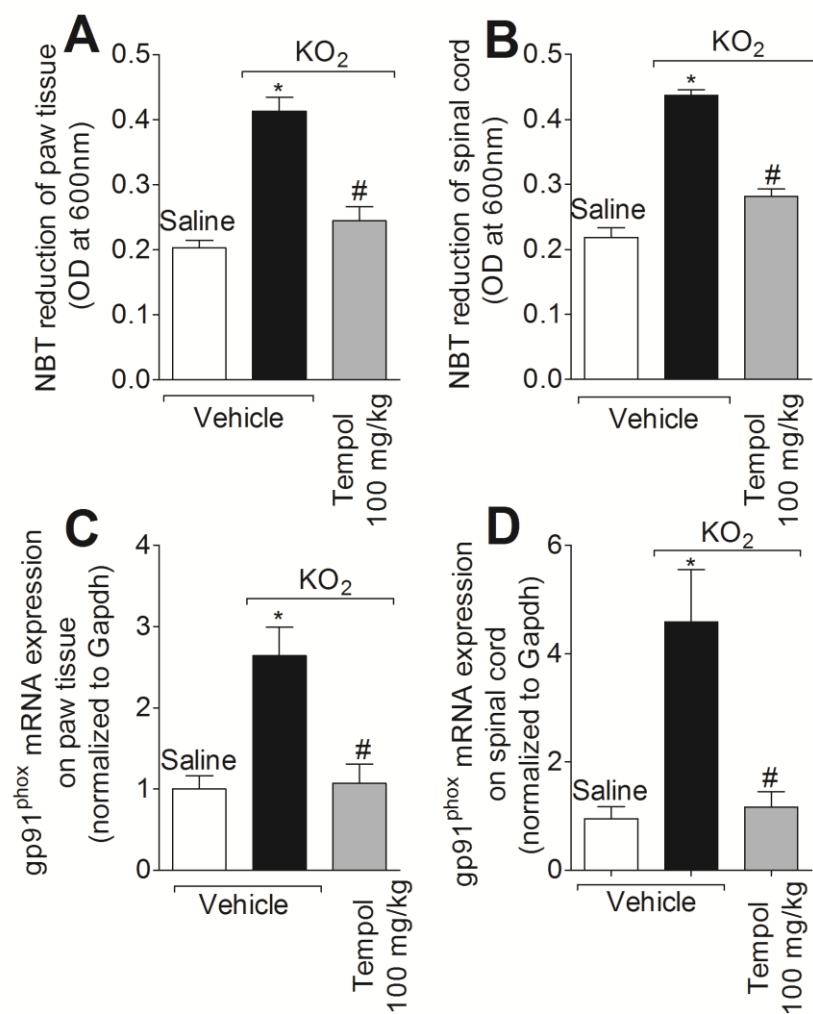


Figure 7

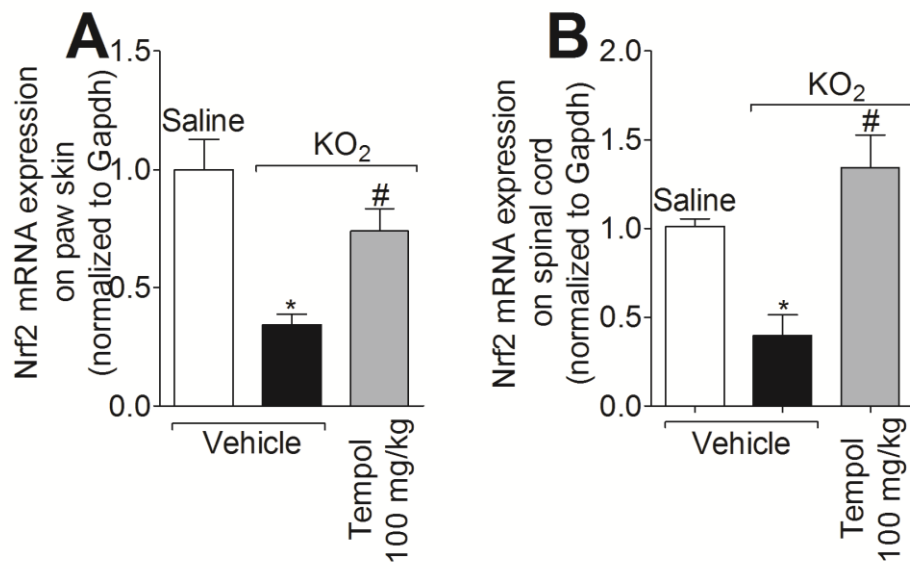
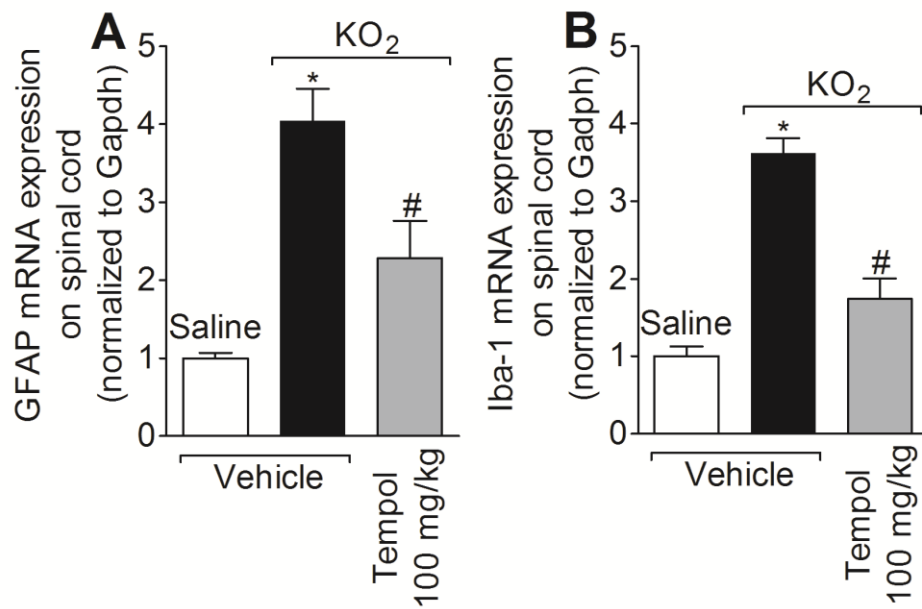


Figure 8



4.3 Terceiro Artigo Científico

Revista: European Journal of Pharmacology

Apocynin, a NADPH oxidase inhibitor, reduces potassium superoxide-induced pain in mice.

C C F Bernardy¹, A C Zarpelon², C Calixto-Campos², T T Carvalho², F A Pinho-Ribeiro², R Casagrande³, W A Verri, Jr^{2*}

¹Departamento de Enfermagem, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, Rod. Celso Garcia Cid PR445 KM380, 86051-990, Londrina, Parana, Brasil,

²Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Rod. Celso Garcia Cid PR445 KM380, 86057-970, Londrina, Parana, Brasil.

³Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Londrina Londrina-UEL, Avenida Robert Koch, 60, Hospital Universitário, 86038-350, Londrina, Paraná, Brasil.

***Author for correspondence:** Waldiceu A. Verri Jr, Departamento de Patologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina. Rod. Celso Garcia Cid Pr 445, KM 380, Londrina, Parana, Brazil, Cx. Postal 10.011, CEP 86057-970. Fax: + 55 43 3371 4387, Tel: + 55 43 3371 4979, e-mail address: waldiceujr@yahoo.com.br; waverri@uel.br

Abstract (250 words)

NADPH (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) oxidase is an important enzymatic complex responsible for superoxide anion production resulting in pain. Superoxide anion-induced pain depends on inactivation of superoxide dismutase, increasing its levels. However, whether superoxide anion also affects its own production remained to be determined. In the present study, the effect of apocynin (a NADPH oxidase inhibitor) in potassium superoxide (superoxide anion donor)-induced pain. Apocynin reduced in a dose-dependent manner superoxide anion-induced mechanical and thermal hyperalgesia, paw edema and oxidative stress in the paw skin and spinal cord as observed by prevention of decrease of FRAP (ferric reducing antioxidant power), ABTS [2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate)] and GSH (glutathione) activities/levels. Apocynin also reduced superoxide anion-induced increase of the ability to reduce NBT (nitro blue tetrazolium; superoxide anion production). Superoxide anion-induced TNF α and IL-1 β production in the paw skin and spinal cord tissue was also reduced by apocynin. Apocynin also reduced superoxide anion-induced COX-2, prepro-ET-1, Nrf2, HO-1, and gp91phox mRNA expression. The present data demonstrate that superoxide-induced hyperalgesia depends on boosting its own production since the NADPH oxidase inhibitor, apocynin, inhibited superoxide anion-induced pain and inflammation by mechanisms involving reduction of cytokine production, oxidative stress by targeting COX-2, prepro-ET-1, Nrf2, HO-1, gp91phox mRNA expression.

Keywords: Apocynin, NADPH- oxidase, oxidative stress, cytokines.

1. Introduction (500 words)

ROS (reactive oxygen species) are highly oxidative molecules which can deregulated the homeostasis causing oxidative signaling and cell damage. ROS have pivotal role in oxidative cellular damage and cellular signaling in inflammatory diseases such as atherosclerosis, chronic granulomatous disease, nephritis and arthritis (Zhao et al., 2014).

Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)-oxidase (NOX) is a family of enzyme complexes dedicated to superoxide anion production via reduction of molecular oxygen, thus producing superoxide anion (O_2^-). Members of NADPH oxidase family include 5 types of NOX, and dual oxidases 1 and 2. NADPH oxidase complex is composed by a membrane-bound section which consists of a large glycosylated protein, gp91phox, and a smaller adapter protein, p22phox, and cytosolic subunits p47phox, p67phox and p40phox (Lassègue & Griendling, 2010; El-Benna et al, 2009; Cano-Domínguez et al, 2008; Bedard et al., 2007). The NOX isoforms have been identified in various cells types, including neurons, endothelial and glial cells (Bedard et al., 2007). Moreover, various stimuli activate this family including proteases, nucleotides such as ATP, N-formylated peptides (fMLP), lipid mediators (e.g. platelet activation factor), and cytokines (Interleukin [IL]-8) (Stefanska and Pawliczak, 2008). Furthermore, ROS can activate the enzyme NADPH oxidase and increase its own production in a positive feedback (Lassègue & Griendling, 2010).

Superoxide anion (O_2^-) has a crucial role in pain and inflammation. For instance, administration of potassium superoxide (KO_2), a superoxide anion donor, induces mechanical and thermal hyperalgesia, edema, overt-pain like behavior such as writhing response and paw flinching and licking, leukocyte recruitment and oxidative stress (Maioli et al., 2015). Superoxide anion has been implicated in the genesis of

many painful conditions such as neuropathic pain, neurogenic pain, and inflammatory pain. This free radical is involved in carrageenan-induced acute inflammation, and in the neutrophil infiltration and ROS production that is essential to the beginning and persistence of inflammatory pain (Grace et al., 2011). There is also controversial evidence on the hyperalgesic role of superoxide anion may be direct or indirect. The direct mechanism considers that superoxide anion per se is an active molecule independently of nitric oxide. The indirect mechanism depends on superoxide anion reaction with nitric oxide generating peroxynitrite, which is ultimately responsible for the pathophysiological effects (Keeble et al., 2009). Independently of direct or indirect actions of superoxide anion, it induces and enhances pain by the activation of NF κ B, cytokine production, activation of neuronal ion channels and translocation of PKC ϵ in dorsal root ganglia (DRG) neurons resulting in enhancing TRPV1 activity and sensitivity to painful stimuli in a Nox-1/NADPH oxidase manner (Ibi et al., 2008). In addition to the roles of superoxide anion and NOX enzymes in inflammatory pain, they also participate in neuropathic pain conditions as observed by their expression, activity and the resultant analgesia by pharmacological targeting or genetic ablation of NOX enzymes (Kim et al., 2010). Furthermore, NOX enzymes participate in nociceptor sensitivity development by triggering peripheral, DRG and spinal cord mechanisms (Kallenborn-Gerhardt et al., 2012).

The apocynin mechanisms of action involves blockade of the translocation of cytosolic subunits (p47^{phox}) to the membrane, thus inhibiting NADPH complex activation. However, the complete mechanism of inhibition is not fully known (Barbiere et al., 2004, Peters et al., 2001). Studies are increasing concerning the therapeutic action of apocynin treatment on inflammatory diseases because of low toxicity, selectivity and absence of collateral effects (Stefanska and Pawliczak, 2008). In the present study Apocynin was used as a pharmacological tool to investigate if superoxide anion-induced

pain depends on further activation of NADPH oxidase and the inflammatory and oxidative stress mechanisms modulated by NADPH oxidase.

2. Materials and methods

2.1. Animals

The experiments were performed on male Balb/c mice (20-25 g) housed in standard plastic cages (six mice per cage) with free access to food and water. All behavioral testing was performed between 9:00 am and 5:00 pm in a temperature- and light-controlled room. Animals' care and handling procedures were in accordance with the International Association for Study of Pain (IASP) guidelines and with the approval of the Ethics Committee of Londrina State University (process 7706.2013-42).

2.2. Drugs and reagents

Potassium superoxide (KO_2) 96.5% was purchased from Alfa Aesar, MA, USA. HTAB (Bromide, hexadecyl trimethyl ammonium), dihydrochloride O-dianisidine, GSH (reduced glutathione), EDTA sodium salt, ferric chloride hexahydrate, TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazine), 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) (ABTS), and Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-11 carboxylic) were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA).

2.3. Experimental protocols

Mechanical hyperalgesia and thermal hyperalgesia were determined 1, 3 and 5 h after superoxide anion (KO_2 , a superoxide anion donor) injection. Mice were treated with apocynin (10, 30 and 100 mg/kg, i.p.) 30 min before intraplantar (i.pl.) injection of KO_2 (30 $\mu\text{g/paw}$ in a final volume of 25 μL). In another set of experiments, mice were

treated with apocynin (30 mg/kg, i.p.) 30 min before the i.pl of KO₂, and 3 h after samples of paw skin were collected for cytokine (TNF α , IL-1 β , IL-10) mRNA expression by qPCR. Plantar paw tissue and spinal cord (L4-L6) sample were collected (3h) and analyzed by qPCR for COX-2, prepro-ET-1, Nrf-2, HO-1, and gp91phox mRNA expression. Furthermore, mice were treated with apocynin (30mg/Kg, i.p.) and received i.pl. injection of KO₂, and 3 h latter, the paw skin and spinal cord tissue were collected for evaluation of antioxidant status by FRAP, ABTS, and NBT assays. The spinal cord activation of glial cells was also analyzed by qPCR for GFAP and Iba-1 mRNA expression. Results are presented as means \pm SEM of measurements of 6 mice per group per experiment, and are representative of 2 independent experiments. It is noteworthy that different experimenters prepared the solutions, made the administrations and performed the testing procedures.

2.4. Quantitative PCR (qPCR)

Paw skin and spinal cord samples were homogenized in TRIzol® reagent (Life Technologies), and total RNA was isolated according to the manufacturer's directions. RNA purity was confirmed by the 260/280 ratio. RT-PCR and quantitative PCR were performed using GoTaq® 2-Step RT-qPCR System (Promega) following the manufacturer's directions. Complementary DNA was reverse transcribed from 2 μ g of total RNA, and quantitative PCR was performed on a LightCycler® Nano Instrument (Roche). The following primers sequences were used: gp91^{phox} sense: 5'-AGCTATGAGGTGGTGATGTTAGTGG-3', antisense: 5'CACAATATTTGTACCAGACAGACTTGAG-3'; preproET sense: 5'TGTGTCTACTTCTGCCACCT-3', antisense: 5'-CACCAGCTGCTGATAGATAC-3'; Nrf2 sense: 5'TCACACGAGATGAGCTTAGGGC

AA-3', antisense: 5'TACAGTTCTGGGCGGCGACTTTAT-3'; Heme Oxygenase-1 (HO-1) sense: 5'-CCCAAAACTGGCCTGTAAAA-3', antisense: 5'-CGTGGTCAGTCAACATGGAT-3'; Cox-2 sense: 5'-GTGGAAAAACCTCGTCCAGA-3', antisense: 5'GCTCGGCTTCCAGTATTGAG-3'; TNF sense: 5'-TCTCATCAGTTCTATGGCCC-3', antisense: 5'GGGAGTAGACAAGGTACAAC-3'; IL-1beta sense: 5'-GAAATGCCACCTTTTGACAGTG-3', antisense: 5'-TGGATGCTCTCATCAGGACAG-3'; Gfap sense: 5'GGCGCTCAATGCTGGCTTCA-3', antisense: 5'-TCTGCCTCCAGCCTCAGGTT-3'; Aif1 (Iba-1) sense: 5'-ATGGAGTTTGATCTGAATGGAAAT-3', antisense: 5'TCAGGGCAGCTCGGAGATA

GCTTT-3'; Gapdh sense: 5'-CATACCAGGAAATGAGCTTG-3', antisense: 5'-ATGACATCAAGAAGGTGGTG-3'. The expression of Gapdh mRNA was used as a control for tissue integrity in all samples.

2.5. Electronic pressure meter test of mechanical hyperalgesia

The test consisted of evoking a hind paw reflex with a hand-held force transducer (electronic von Frey anesthesiometer; Insight, Ribeirão Preto, SP, Brazil) adapted with a 0.5 mm² polypropylene tip. Detailed methodology was previously described by our group (Cunha et al., 2004). The results are expressed by delta (Δ) of withdrawal threshold (in g) calculated by subtracting the basal measurements from the measurements at the indicated time points after stimulus injection.

2.6. Hot Plate Test

The test was performed as reported previously (Navarro et al., 2013). Briefly, mice were placed the hot plate apparatus (EFF 361, Insight Equipamentos, Ribeirao Preto, SP,

Brazil) maintained at 55 °C. The reaction time was scored when the pain reactions of hind paw licking or flinching occurred in the injected paw. As the basal latencies were always smaller than 20 s (between 15 and 18 s), a maximum latency (cut-off) was set at 20 s to avoid tissue damage.

2.7. Paw edema

The paw edema formation was measured using a caliper (Digimatic Caliper, Mitutoyo Corporation, Kanagawa, Japan). Values of paw thickness are expressed as the difference (Δ mm) between the values obtained just before (basal) and after stimulus injection.

2.8. FRAP assay

The reducing ability of paw and spinal tissues was determined by FRAP assay (Katalinic et al., 2005; Ivan et al., 2014). The samples (30 mg approximately) were homogenized in 500 μ L of KCl (1.15%) using a Tissue-Tearor (Biospec) and centrifuged (1,000 g, 10 min, 4°C), and the supernatant was employed to measure the antioxidant capacity of skin. The supernatant (30 μ L) was mixed with the FRAP reagent (0.3 mM acetate buffer pH 3.6, 10 mM TPTZ in 40 mM hydrochloride acid, and 20 mM ferric chloride) and incubated at 37°C for 30 min. The absorbance was determined in 595 nm (Helios Alfa, Thermo Spectronic). Previously, a curve of trolox was prepared and the results are presented as trolox equivalent per mg of tissue.

2.9. ABTS assay

This assay is based on the inhibition of the absorbance of the radical ABTS. The supernatant was the same employed to measure the antioxidant capacity on FRAP assay. The solution of ABTS was prepared with 7 mM of ABTS and 2.45 mM of potassium persulfate diluted with phosphate buffer pH 7.4 to an absorbance of 0.7-0.8 in 730 nm was prepared. The supernatant was mixed on ABTS solution and after 6 min

the absorbance was determined in 730 nm (Helios Alfa, Thermo Spectronic) (Katalinic et al., 2005; Ivan et al., 2014). A curve of trolox was prepared and the results are presented as trolox equivalent per mg of tissue.

2.10. Superoxide anion production

The measurement of superoxide anion production in tissue homogenates was performed using the NBT assay as described previously (Hohmann et al., 2013). Briefly, 50 μ L of homogenates were incubated in 96-wells plate for 1 h. The supernatant was carefully removed and the cells were incubated with 100 μ L of NBT (1 mg/ml) for 15 min. The supernatant was then carefully removed and the cells were fixed in methanol 100%. Formazan particles were dissolved by adding 120 μ L of KOH 2M and 140 μ L of dimethylsulfoxide. Reduction of NBT to formazan was measured at 600 nm using a microplate spectrophotometer reader (Asys Expert Plus, Biochrom) and the results are presented as optical density (OD) per mg of skin.

2.11. Statistical analysis

Results are presented as means \pm SEM of measurements made on 6 mice per group per experiment and are representative of 2 separated experiments. Two-way analysis of variance (ANOVA) was used to compare the groups and doses at all times (curves). The analyzed factors were treatments, time, and time versus treatment interaction. When there was a significant time versus treatment interaction, one-way ANOVA followed by Tukey's *t*-test was performed for each time. Statistical differences were considered to be significant at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Apocynin inhibits KO₂-induced mechanical hyperalgesia, thermal hyperalgesia and edema in a dose-dependent manner

In the first series of experiments, KO₂ injection was performed in the paw followed by evaluation of mechanical hyperalgesia, thermal hyperalgesia and paw edema. Mice were treated with apocynin (10, 30 and 100 mg/kg, i.p.) 30 min before i.pl. injection of KO₂ (30 µg, i.pl.). Mechanical hyperalgesia (Figure 1A), thermal hyperalgesia (Figure 1B) and paw edema (Figure 1C) were evaluated 1-5 h after stimulus. The dose of 10 mg/kg of apocynin did not alter KO₂-induced mechanical hyperalgesia (Figure 1A) and thermal hyperalgesia (Figure 1B), and paw edema (Figure 1C) was reduced only at 1 and 3 h. The dose of 30 and 100 mg/Kg inhibited the mechanical (Figure 1A) and thermal hyperalgesia at all times after stimulus injection (Figure 1B), and edema at 3 and 5 h (Figure 1C). No statistically difference was found between 30 and 100 mg/kg treatments, indicating that a maximal effect of apocynin was achieved with the dose of 30 mg/kg. Thus, the dose of 30 mg/kg was chosen for the following experiments.

3.2. Apocynin inhibits KO₂- induced pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β) mRNA expression

Mice were treated with apocynin (30 mg/kg, i.p) before i.p. injection of KO₂ (30µg, i.pl.) in the paw tissue, and samples of paw and spinal cord tissue (L4-L6 segment) were collected 3 h after for TNF- α and IL-1 β mRNA expression by qPCR (Fig. 2). KO₂ injection induced a significant increase of IL-1 β and TNF- α mRNA expression in the paw skin and spinal cord. The pre-treatment with apocynin inhibited

the IL-1 β (Fig. 2A and B) and TNF- α (Fig. 2C and D) mRNA expression in the paw skin and spinal cord, respectively.

3.3. Superoxide anion induces COX-2 mRNA expression in a NADPH-oxidase dependent-manner

Mice were treated with apocynin (30 mg/kg, i.p) before the administration of KO₂ (30 μ g, i.pl.). The COX-2 mRNA expression was evaluated by qPCR in samples of paw skin and spinal cord (L4-L6). Apocynin inhibited KO₂-induced COX-2 mRNA expression in the paw skin (Fig. 3A) and spinal cord (Fig. 3B). Therefore, superoxide anion-induced COX-2 mRNA expression depends on NADPH oxidase activity.

3.4. Apocynin reduces KO₂-induced prepro-endothelin-1 mRNA expression

Mice were treated with apocynin (30 mg/kg, i.p) before the administration of KO₂ (30 μ g, i.pl.). The prepro-endothelin-1 mRNA expression was evaluated by qPCR in paw skin and spinal cord (L4-L6) samples. Apocynin inhibited KO₂-induced prepro-ET-1 mRNA expression in the paw skin (Fig. 4A) and spinal cord (Fig. 4B).

3.5. Apocynin inhibits KO₂-induced oxidative stress

KO₂ was administered and the paw skin and spinal cord were collected after 3 h for FRAP and ABTS assays. This time was established previously (Maioli et al., 2015). Mice were treated with apocynin (30mg/Kg), 30 minutes, i.p.. The KO₂ induced a significant decrease of FRAP (Fig. 5A and B) and ABTS (Fig. 5C and D) compared to the control group (saline), and apocynin inhibited the KO₂-induced depletion.

3.6. Apocynin inhibits KO₂-induced Nrf-2 mRNA expression

Mice were treated with apocynin (30 mg/kg, i.p.) 30 min before i.pl. stimulus with KO₂ (30 µg/25 µL). Plantar paw tissue and spinal cord segments (L4-L6) samples were collected 3 h after stimulus injection and used to evaluate the Nrf-2 mRNA expression (Fig. 6 A and B). Apocynin treatment inhibited KO₂-induced reduction of Nrf-2 mRNA expression.

3.7. KO₂ induces gp91-phox mRNA expression and NBT reduction (superoxide anion production)

Mice were treated with apocynin (30 mg/kg, i.p.) 30 min before i.pl. stimulus with KO₂ (30 µg/25 µL). Paw skin and spinal cord (L4-L6) samples were collected 3 h after stimulus injection and used to evaluate the gp91phox mRNA expression and NBT reduction (Fig. 7). The apocynin treatment inhibited KO₂-induced gp91phox mRNA expression (Fig. 7 A and B), a subunit of NADPH-oxidase. Importantly, KO₂ induced superoxide anion production as determined by the NBT assay, which was inhibited in the paw skin (Fig. 7C) and spinal cord (Fig. 7D) by apocynin treatment.

3.8. Apocynin inhibits KO₂- induced spinal cord activation of microglia and astrocytes

Mice were treated with apocynin (30 mg/kg, i.p.) 30 min before i.pl. stimulus with KO₂ (30 µg/25 µL). Spinal cord tissue was harvested 3 h after KO₂ injection (Fig. 8), and GFAP and Iba-1 mRNA expression was determined by qPCR. KO₂ induced a

significant increase of GFAP (astrocytes marker) (Fig. 8A) and Iba-1 (microglial marker) (Fig. 8B) mRNA expression, which was inhibited by apocynin treatment.

4. Discussion (1500 words)

Superoxide anion is an important mediator of pain (Wang et al. 2004, Khattab et al., 2006, Salvemini et al., 2011). In the present study, the analgesic effect of a NADPH oxidase inhibitor, apocynin, was investigated in the potassium superoxide (superoxide anion donor)-induced inflammatory pain in mice. Superoxide-induced hyperalgesia was amenable by apocynin concomitantly with reduced oxidative stress and cytokine production, which suggests that superoxide anion induces pain, at least in part, by inducing its own production via NADPH oxidase.

There is evidence that ROS can activate nociceptors (Nishio et al., 2013). Intrathecal administration of tert-butyl hydroperoxide (ROS donor) increases the frequency of spontaneous excitatory postsynaptic currents in neurons dependent on activation of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) and transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) (Kress et al., 1995, Zhao et al., 2014). These literature data suggest that the reduction of superoxide-induced oxidative stress in the paw skin and spinal cord observed by apocynin treatment might be a contributing analgesic mechanism.

Superoxide anion is a precursor of additional ROS that can contribute to inflammation through activation of transcription factors including activating protein-1 (AP-1) and nuclear factor kappa-B (NF κ B) (Dichtl et al., 2003). This fact, explains the superoxide anion-induced up-regulation of pro-IL-1 β and also by the promotion of the

genes to COX-2 (Niederberger & Geisslinger, 2008) that results in the production of prostanoids such as PGE₂ (Díaz-Gandarilla et al., 2013).

KO₂ injection reduced the nuclear factor erythroid-2 (Nrf-2) mRNA expression. Nrf2 is a primary regulator of cellular antioxidants in response to diverse stimuli, including LPS (Kensler et al., 2007). Supporting our study, Kim et al., (2013) demonstrated that Nrf-2 is dissociated of Keap-1 in response to oxidative stress thereby translocating to the cellular nucleus where it induces the transcription of detoxifying enzymes responsible for adaptation to excessive oxidative stress and cell survival. Therefore, the apocynin inhibition of superoxide anion-induced decrease of Nrf2 mRNA expression was a beneficial effect. Furthermore, COX-2 and nitric oxide (NO) signaling can activate Nrf2 (Kobayashi et al., 2013). The Nrf-2 deficiency can lead to the development of oxidative and inflammatory disorders (Malhotra et al, 2008; Kensler et al., 2007). Furthermore, macrophages of Nrf2-deficient mice produce larger amounts of NADPH oxidase-dependent ROS, resulting in an elevation of pro-inflammatory cytokine production due to NFκB activation (Kong et al., 2010).

Our group demonstrated that ET-1 mediates superoxide anion-induced inflammation and pain. The i.pl. injection of a superoxide anion donor, induces local and spinal cord prepro-endothelin-1 mRNA expression (ppET-1). Moreover, bosentan, an endothelin receptor antagonist inhibited superoxide anion-induced pain and inflammation (Serafim et al., 2015). Furthermore, a selective ETA receptor antagonist prevented ROS-dependent glomeruli damage in sickle cell disease patients with nephropathy by inhibiting NADPH oxidase subunits mRNA expression. Therefore, this evidence supports our data demonstrating that inhibition of NADPH oxidase by apocynin reduces superoxide anion-induced pain and inflammation.

The analgesic effect of apocynin related to its inhibitory effect over NADPH oxidase has been demonstrated in models of neuropathic pain. The ROS can be implicated in the genesis of neuropathic pain, and the neurons are especially sensitive to this damage (Bell, 2013). Contrasting with a neuronal effect of ROS in inflammatory pain and hyperalgesia, superoxide anion and hydrogen peroxide secondarily generated as reaction products from pyrogallol and Fe-EDTA, respectively, did not induce ongoing activity or sensitize (Kress et al., 1995). Nevertheless, superoxide anion can act in the cells surrounding the nociceptive neurons to induce the production of nociceptive molecules and not by directly activating nociceptors, which is in line with the data demonstrating that superoxide anion-induced pain depends on further production of nociceptive molecules in a NADPH oxidase-dependent manner.

5. Conclusions

The present data demonstrate that superoxide anion induces hyperalgesia in a NADPH oxidase-dependent manner since was inhibited by apocynin. Therefore, in addition to the previous evidence of a feed forward hyperalgesic mechanism of superoxide anion through inhibition of SOD, superoxide anion also triggers its own production via NADPH oxidase to induce pain-like behavior.

Conflict of interest

There is no conflict of interest to declare.

References

Barbieri SS, Cavalca V, Eligini S, et al. Apocynin prevents cyclooxygenase 2 expression in human monocytes through NADPH oxidase and glutathione redox-dependent mechanisms. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 37, n. 2, p. 156–165, 2004.

Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. **Physiological Reviews**, Bethesda, v. 87, p. 245-313, 2007.

Bell KF. Insight into a neuron's preferential susceptibility to oxidative stress. **Biochem. Soc. Trans**, v. 41, p. 1541–1545, 2013.

Borghi SM, Carvalho TT, Staurengo-Ferrari L, et al. Vitexin inhibits inflammatory pain in mice by targeting TRPV1, oxidative stress, and cytokines. **J Nat Prod**, v. 76, n. 6, p. 1141-9, 2013.

Cano-Domínguez N, Alvarez-Delfin K, Hansberg W, et al. Oxidases NOX-1 and NOX-2 require the regulatory subunit NOR-1 to control cell differentiation and growth in *Neurospora crassa*. **Eukaryotic Cell**, Washington, v. 7, n. 8, p.1352-1361, Aug. 2008.

Campanini MZ, Pinho-Ribeiro FA, Ivan AL, et al. Efficacy of topical formulations containing *Pimenta pseudocaryophyllus* extract against UVB-induced oxidative stress and inflammation in hairless mice. **J Photochem Photobiol B** 127C: 153–160, 2013.

Cunha TM. et al. An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. **Brazilian Journal of Medical and Biology Research**, Ribeirão Preto, v. 37, n. 3, p. 401-407, 2004.

Díaz-Gandarilla JA, Osorio-Trujillo C, Hernández-Ramírez VI, Talamás-Rohana, P. PPAR Activation Induces M1 Macrophage Polarization via cPLA2-COX-2 Inhibition, Activating ROS Production against *Leishmania mexicana*. **Biomed Res Int**, 2013.

Dichtl W, Dulak J, Frick M, et al. HMG-CoA reductase inhibitors regulate inflammatory transcription factors in human endothelial and vascular smooth muscle cells. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 23, p. 58–63, 2003.

El-Benna J. et al. p47 phox, the phagocyte NADPH oxidase/NOX2 organizer: structure, phosphorylation and implication in diseases. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 41, n. 4, p. 217-225, 2009.

Grace PM, Rolan PE, Hutchinson MR. Peripheral immune contributions to the maintenance of central glial activation underlying neuropathic pain. **Brain Behav Immun**, v. 25, n.7, p. 1322-32, 2011.

Hohmann, MSN. et al. 5-lipoxygenase deficiency reduces acetaminophen-induced hepatotoxicity and lethality. **Biomed Research International**, New York, v. 2013. doi.org/10.1155/2013/627046.

Ibi M, Matsuno K, Shiba D, et al. Reactive oxygen species derived from NOX1/NADPH oxidase enhance inflammatory pain. **Journal of Neuroscience**, v. 28, p. 9486-94, 2008.

Ivan ALM, Campanini MZ, Martinez RM, et al (2014) Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits UVB-induced skin inflammation and oxidative stress in hairless mice and exhibits antioxidant activity in vitro. **J Photochem Photobiol B Biol** 138:124–133. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2014.05.010

Kallenborn-Gerhardt W, Schröder K, Del Turco D, et al. NADPH oxidase-4 maintains neuropathic pain after peripheral nerve injury. **Journal of Neuroscience**, v. 32, p. 10136-45, 2012.

Katalinic V, Modun D, Music I, Boban M. (2005) Gender differences in antioxidant capacity of rat tissues determined by 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate; ABTS) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol** 140:47–52. doi: 10.1016/j.cca.2005.01.005.

Keeble JE, Bodkin JV, Liang L, et al. Hydrogen peroxide is a novel mediator of inflammatory hyperalgesia, acting via transient receptor potential vanilloid 1-dependent and independent mechanisms. **PAIN**, v. 141, p. 135–142, 2009.

Kensler TW, Wakabayashi N, Biswal, S. Cell Survival Responses to Environmental Stresses Via the Keap1-Nrf2-ARE Pathway. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 47, p. 89-116, 2007.

Khattab MM. TEMPOL, a membrane-permeable radical scavenger, attenuates peroxynitrite- and superoxide anion-enhanced carrageenan-induced paw edema and hyperalgesia: a key role for superoxide anion. **Eur J Pharmacol**, v. 548, n. 1-3, p. 167-173, 2006.

Kim D, You B, Jo EK, et al. NADPH oxidase 2-derived reactive oxygen species in spinal cord microglia contribute to peripheral nerve injury-induced neuropathic pain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, p. 14851-6, 2010.

Kim KH, et al. Therapeutic effect of Chung-Pae, an experimental herbal formula, on acute lung inflammation is associated with suppression of NF- κ B and activation of

Nrf2. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, Oxford, 2013:659459, 2013. doi: 10.1155/2013/659459.

Kobayashi E, Suzuki T, Yamamoto M. Roles Nrf2 Plays in Myeloid Cells and Related Disorders. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, New York, 2013:529219, 2013. doi: 10.1155/2013/529219.

Kong X, Thimmulappa R, Kombairaju P, Biswal S. NADPH Oxidase-Dependent Reactive Oxygen Species Mediate Amplified TLR4 Signaling and Sepsis-Induced Mortality in Nrf2-deficient Mice. **J Immunol**, v. 185, n. 1, p. 569-677, 2010.

Kress M, Riedl B, Reeh PW. Effects of oxygen radicals on nociceptive afferents in the rat skin in vitro. *Pain*, v. 62, n. 1, p. 87-94, 1995.

Lassègue B, Griendling KK. NADPH oxidases: functions and pathologies in the vasculature. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, Dallas, v. 30, n.4, p. 653-661, Apr. 2010.

Malhotra D, Thimmulappa R, Navas-Acien A, et al. Decline in NRF2-regulated antioxidants in chronic obstructive pulmonary disease lungs due to loss of its positive regulator, DJ-1. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 178, p. 592–604, 2008.

Maioli NA, Zarpelon AC, Mizokami SS, et al. The superoxide anion donor, potassium superoxide, induces pain and inflammation in mice through the production of reactive oxygen species and cyclooxygenase-2. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, n. 4, p. 321-331, 2015.

Navarro SA, Serafim KG, Mizokami SS, et al. Analgesic activity of piracetam: Effect on cytokine production and oxidative stress. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 105, p. 183-192, 2013.

Niederberger E, Geisslinger G. The IKK-NF- κ B pathway: a source for novel molecular drug targets in pain therapy? **FASEB Journal**, v. 22, p. 3432-3442, 2008.

Nishio N, Taniguchi W, Sugimura YK, et al. Reactive oxygen species enhance excitatory synaptic transmission in rat spinal dorsal horn neurons by activating TRPA1 and TRPV1 channels. **Neuroscience**, v. 247, p. 201-212, 2013.

Peters EA, Hiltermann JTN, and Stolk J. Effect of apocynin on ozone-induced airway hyperresponsiveness to methacholine in asthmatics. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 31, n. 11, p. 1442–1447, 2001.

Salvemini D, Little JW, Doyle T, Neumann WL. Roles of reactive oxygen and nitrogen species in pain. **Free Radic Biol Med**, v. 51, n. 5, p. 951-66, 2011.

Serafim GGK, Navarro SA, Zarpelon AC. Bosentan, a mixed endothelin receptor antagonist, inhibits superoxide anion-induced pain and inflammation in mice. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, 2015.

Stefanska J, Pawliczak R. Apocynin: molecular aptitudes. **Mediators of Inflammation**, Oxford, 2008:106507, 2008. doi: 10.1155/2008/106507.

Valério DA, Georgetti SR, Magro DA, et al. Fructose-1,6-bisphosphate reduces inflammatory pain-like behaviour in mice: role of adenosine acting on A1 receptors. **J. Nat. Prod**, v. 72, n. 1975-1979, 2009.

Wang ZQ, Porreca F, Cuzzocrea S, et al. A newly identified role for superoxide in inflammatory pain. **Pharmacol. Exp. Ther**, v. 309, p. 869-878, 2004.

Zhao WC, Zhang B, Liao MJ, et al. Curcumin ameliorated diabetic neuropathy partially by inhibition of NADPH oxidase mediating oxidative stress in the spinal cord. **Neurosci Lett**, v. 7, n. 560, p. 81-5, 2014.

Figures and legends

Figure 1. Apocynin inhibits KO₂-induced mechanical hyperalgesia, thermal hyperalgesia and paw edema. Mice were treated with apocynin (30 mg/kg, i.p) before the administration of KO₂ (30 µg, 25 µL, i.pl.) or saline injection. The intensity of mechanical hyperalgesia (A), thermal hyperalgesia (B) and paw edema (C) were measured 1 – 5 h after stimulus. Data are presented as means ± SEM of six mice per group per experiment, and representative of two independent experiments. **p* < 0.05 vs. saline control; #*p* < 0.05 vs. KO₂; ***p* < 0.05 vs. the lower dose, (One-way ANOVA followed by Tukey's test).

Figure 2. Apocynin inhibits KO₂-induced cytokine production. Mice were treated with apocynin (30 mg/kg, 150 µL, i.p.) or vehicle 30 min before KO₂ (30 µg, 25 µL, i.pl.) or saline (25 µL, i.pl.) injection. Samples of paw skin and spinal cord were collected 3 h after stimulus. IL-1β (Panel A and B) and TNF-α (panel C and D) mRNA expression were determined by qPCR. Data are presented as means ± SEM of six mice per group per experiment, and representative of two independent experiments. **p* < 0.05 vs. saline control; #*p* < 0.05 vs. KO₂ (One-way ANOVA followed by Tukey's test).

Figure 3. Apocynin inhibits KO₂-induced COX-2 mRNA expression. Mice were treated with apocynin (30 mg/kg, 150 µL, i.p.), or vehicle 30 min before KO₂ (30 µg, 25 µL, i.pl.) or saline (25 µL, i.pl.) injection. Samples of paw skin (Panel A) and spinal cord (Panel B) were collected 3 h after stimulus injection, and qPCR was performed. Data are presented as means ± SEM of six mice per group per experiment, and representative of two independent experiments. **p* < 0.05 vs. saline control; #*p* < 0.05 vs. KO₂ (One-way ANOVA followed by Tukey's test).

Figure 4. Apocynin inhibits KO₂-induced prepro-ET-1 mRNA expression. Mice were treated with apocynin (30 mg/kg, 150 μ L, i.p.) or vehicle 30 min before KO₂ (30 μ g, 25 μ L, i.pl.) or saline (25 μ L, i.pl.) injection. Samples of paw skin (Panel A) and spinal cord (Panel B) were collected 3 h after stimulus injection, and PCR was performed. Data are presented as means \pm SEM of six mice per group per experiment, and representative of two independent experiments. * p < 0.05 vs. saline control; # p < 0.05 vs. KO₂ (One-way ANOVA followed by Tukey's test).

Figure 5. Apocynin inhibits KO₂-induced oxidative stress in the paw skin and spinal cord. Mice were treated with apocynin (30mg/Kg, i.p) and 30 minutes after received KO₂ (30 μ g, 25 μ L, i.pl.) or saline injection. The antioxidant capacity and oxidative stress were assessed by determining the ferric reducing antioxidant power (Panel A and B; FRAP assay) and ABTS radical scavenging ability (panel C and D; ABTS assay) 3 h after stimulus injection. Data are presented as means \pm SEM of six mice per group per experiment, and representative of two independent experiments. * p < 0.05 vs. saline control; # p < 0.05 vs. KO₂, (One-way ANOVA followed by Tukey's test).

Figure 6. Apocynin inhibits KO₂-induced Nrf-2 mRNA expression. Mice were treated with apocynin (30 mg/kg, 150 μ L, i.p.) or vehicle 30 min before KO₂ (30 μ g, 25 μ L, i.pl.) or saline (25 μ L, i.pl.) injection. Samples of paw skin (Panel A) and spinal cord (Panel B) were collected 3 h after stimulus injection, and qPCR was performed. Data are presented as means \pm SEM of six mice per group per experiment, and representative of two independent experiments. * p < 0.05 vs. saline control; # p < 0.05 vs. KO₂ (One-way ANOVA followed by Tukey's test).

Figure 7. Apocynin inhibits KO₂-induced gp91-phox mRNA expression and induces superoxide anion production. Mice were treated with apocynin (30 mg/kg, 150 μ L, i.p.) or vehicle 30 min before KO₂ (30 μ g, 25 μ L, i.pl.) or saline (25 μ L, i.pl.) injection.

Samples of paw skin and spinal cord were collected 3 h after stimulus injection, and qPCR was performed to determine the gp91phox mRNA expression (Panel A and B) and NBT reduction assay was performed to determine superoxide anion production (Panel C and D). Data are presented as means \pm SEM of six mice per group per experiment, and representative of two independent experiments. * $p < 0.05$ vs. saline control; # $p < 0.05$ vs. KO₂ (One-way ANOVA followed by Tukey's test).

Figure 8. Apocynin inhibits KO₂-induced astrocytes and microglia activation in the spinal cord. Mice were treated with apocynin (30 mg/kg, 150 μ L, i.p.) or vehicle 30 min before KO₂ (30 μ g, 25 μ L, i.pl.) or saline (25 μ L, i.pl.) injection. Samples of spinal cord were collected 3 h after stimulus injection, and qPCR for GFAP (Panel A) and Iba-1 (Panel B) mRNA expression was performed. Data are presented as means \pm SEM of six mice per group per experiment, and representative of two independent experiments. * $p < 0.05$ vs. saline control; # $p < 0.05$ vs. KO₂ (One-way ANOVA followed by Tukey's test).

Figure 1

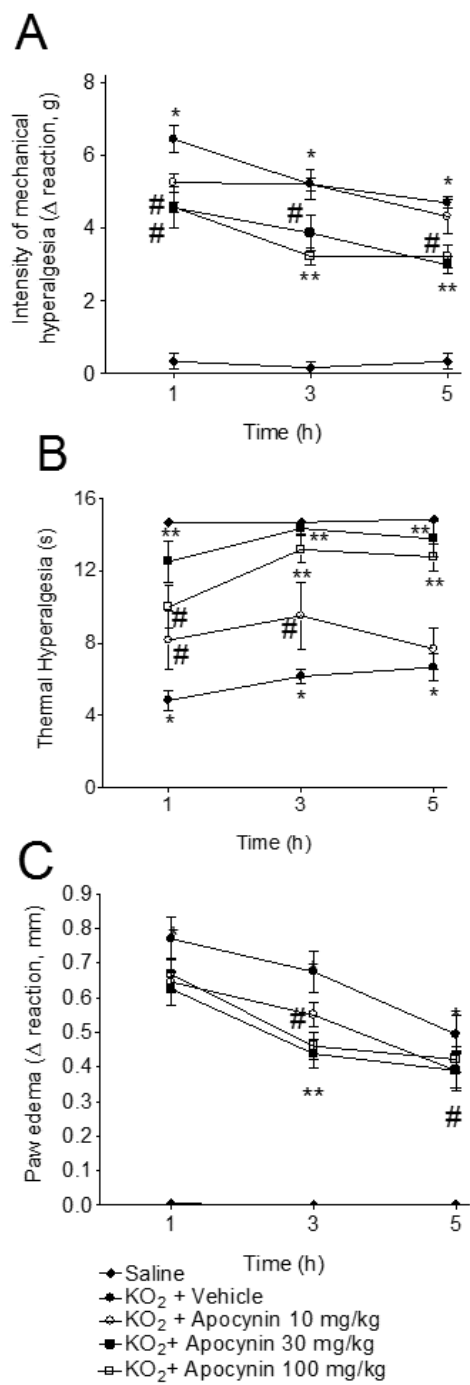


Figure 2

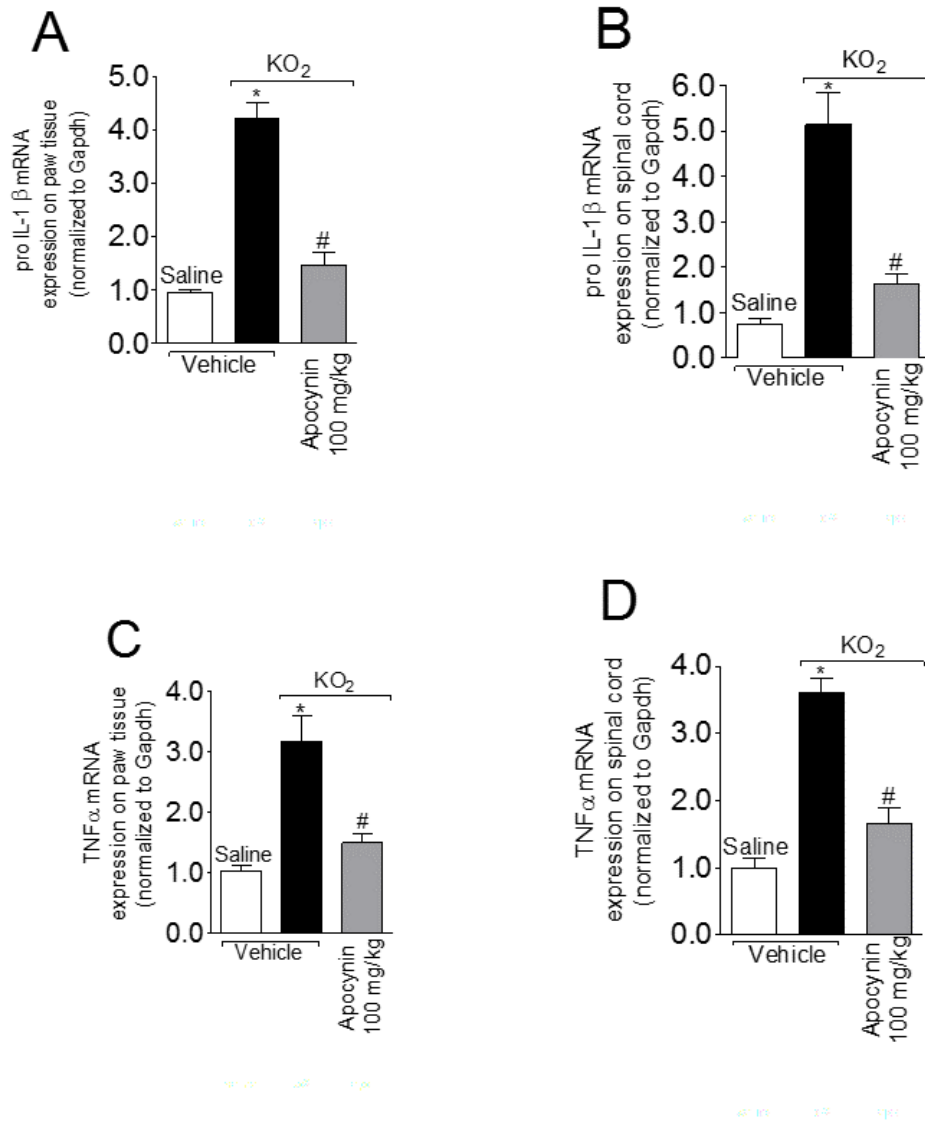


Figure 3

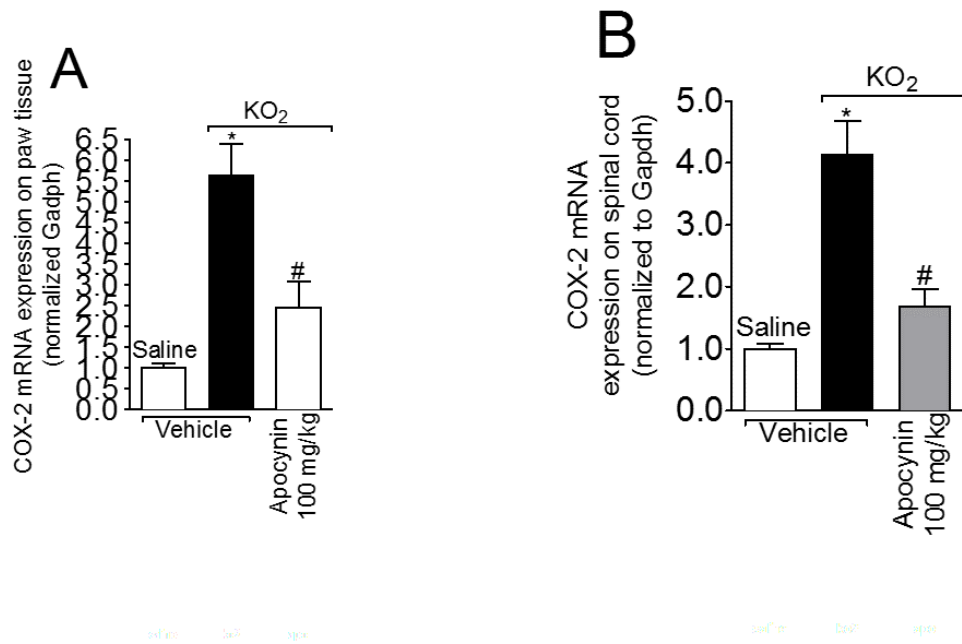


Figure 4

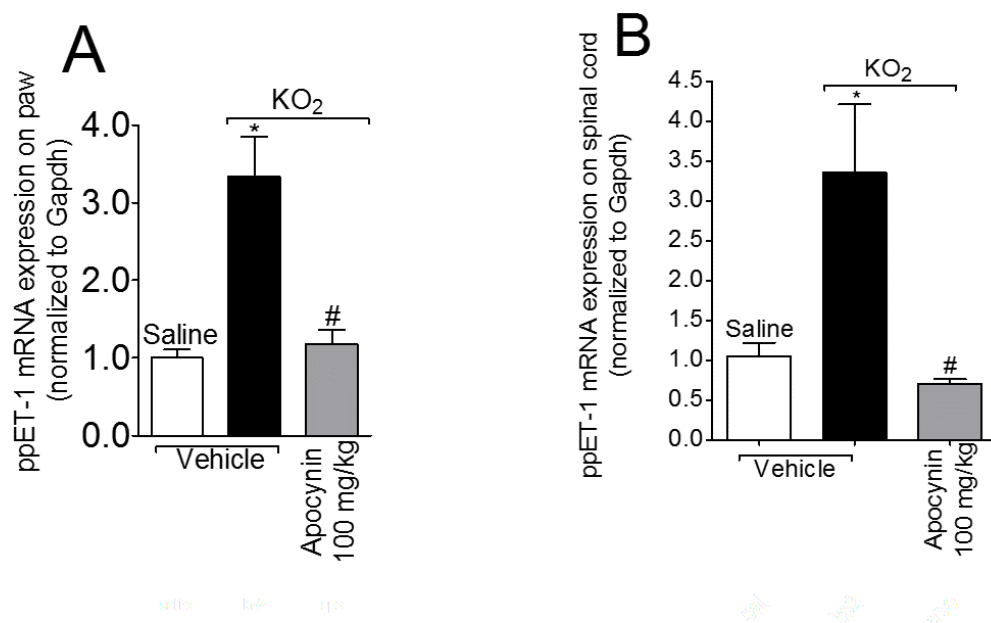


Figure 5

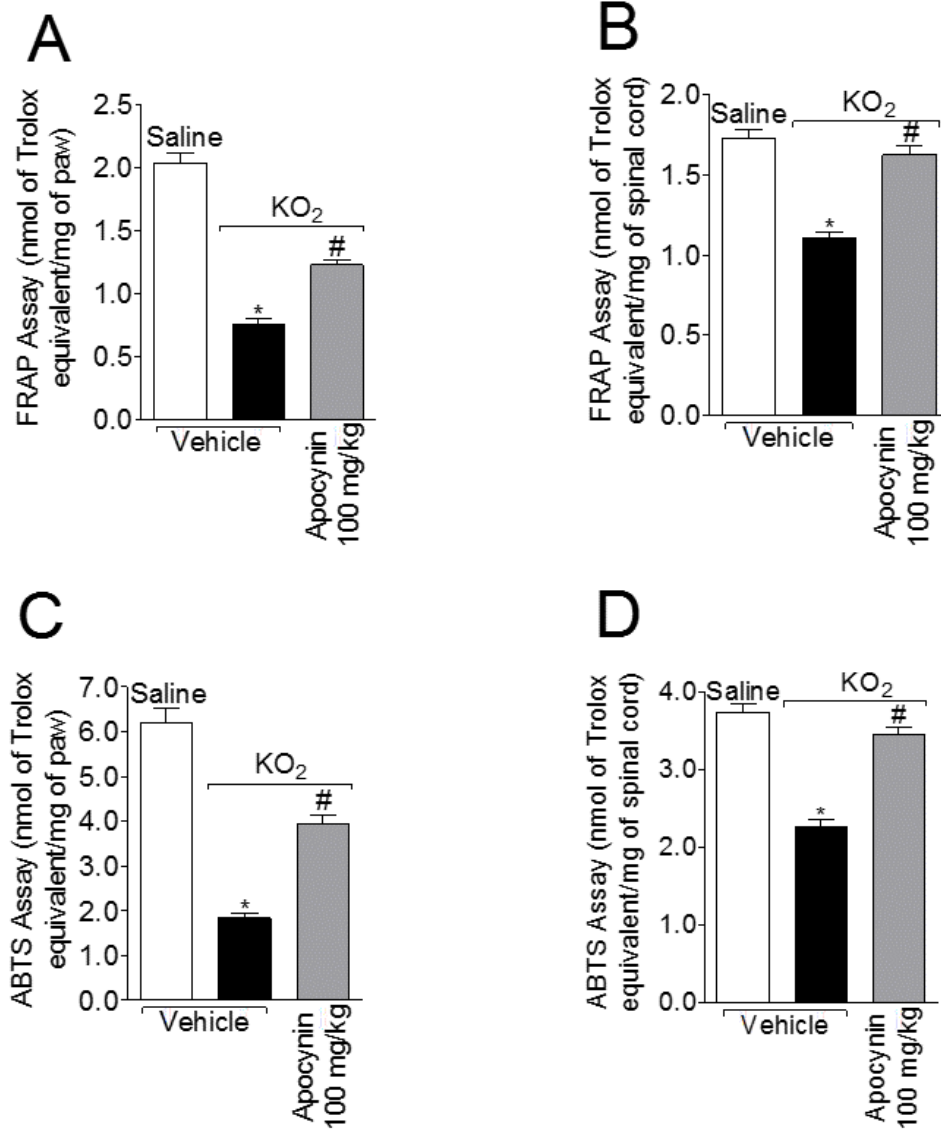


Figure 6

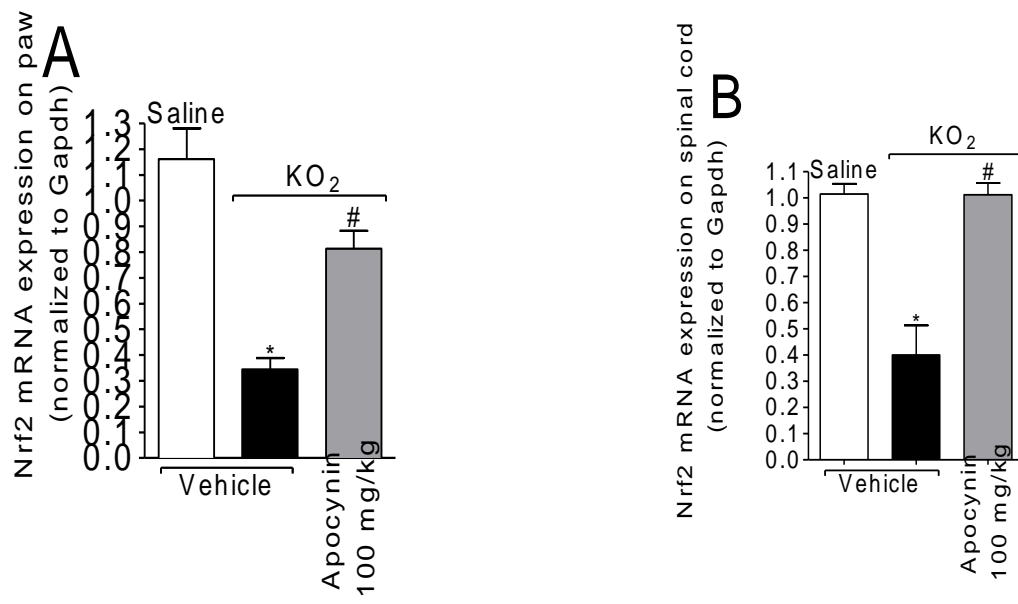


Figure 7

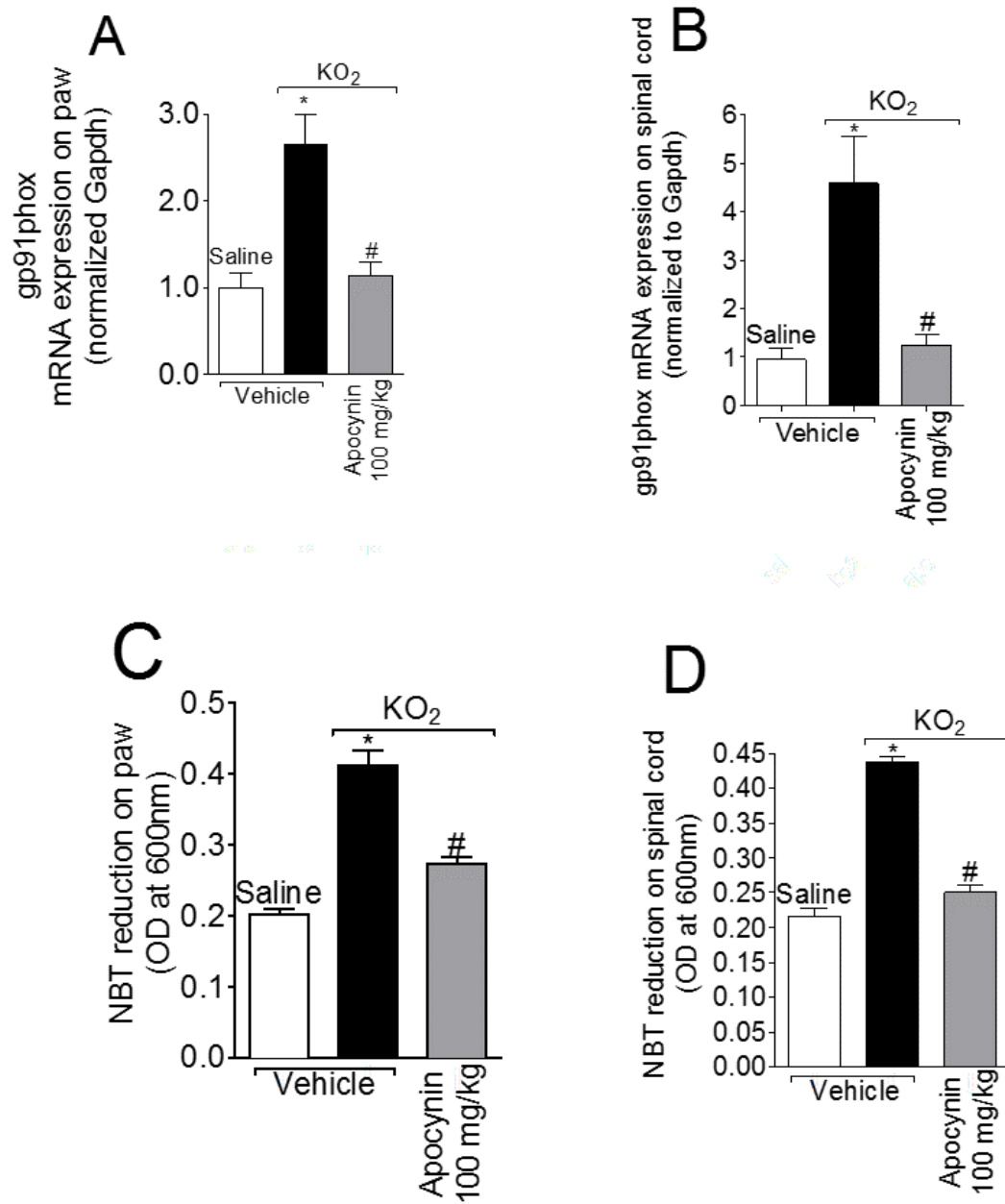
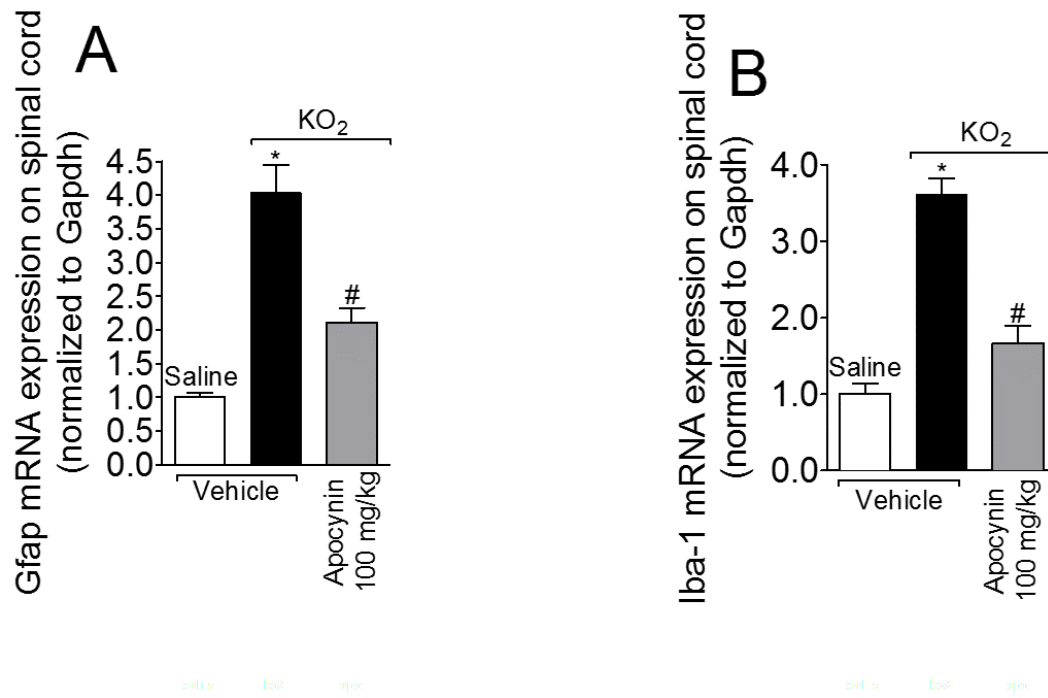


Figure 8



5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O superóxido de potássio é um doador eficaz de ânion superóxido, o qual mimetiza os efeitos deletérios das espécies reativas de oxigênio na dor inflamatória. Os dados apresentados permitem dizer que o ânion superóxido depende da sinalização de IL-33/ST2 para induzir hiperalgesia e inflamação. A interação de IL-33/ST2 parece ser essencial para as alterações fisiológicas no foco da lesão e também na medula espinal.

Este estudo demonstrou que o estímulo inflamatório induzido pelo KO_2 causa hiperalgesia e estresse oxidativo dependente da NADPH oxidase com consequente regulação positiva na produção de ânion superóxido, manutenção do estresse oxidativo e hiperalgesia inflamatória.

O ânion superóxido também foi responsável por induzir a produção de citocinas pró-hiperalgésicas representadas pelo aumento dos níveis de $TNF\alpha$ e IL-1 β e IL-33. Ainda, foi responsável também pela peroxidação lipídica, evento este, reduzido em animais deficientes para o receptor da IL-33. Desta forma parece haver um ciclo entre produção de citocinas e estas influenciando a produção de ERO.

A hiperalgesia, o estresse oxidativo e a produção de citocinas induzidos pelo KO_2 foram reduzidos pelo tratamento com apocinina e tempol. Portanto, modular o metabolismo do ânion superóxido parece ser uma estratégia promissora para controlar a dor inflamatória, a qual pode ser conseguida utilizando miméticos de superóxido dismutase (por exemplo, M40403, tempol) e inibição da NADPH-oxidase (por exemplo, apocinina).

REFERÊNCIAS

AGUIAR, A. et al. Mecanismos e aplicações da reação de fenton assistida por compostos fenólicos redutores de ferro. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 3, p. 623-628, 2007.

ALI, S. et al. The dual function cytokine IL-33 interacts with the transcription factor NF- κ B to dampen NF- κ B – stimulated gene transcription. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 187, n. 4, p. 1609-1616, 2011.

ALVES, C. Q. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.

ARAÚJO, V. C. et al. Neutrophils in oral paracoccidioidomycosis and the involvement of Nrf2. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, n. 10, e76976, 2013.doi: 10.1371/journal.pone.0076976.eCollection 2013.

BARBOSA, L. F.; MEDEIROS, M.H.G.; AUGUSTO, O. Danos oxidativos e neurodegeneração: o que aprendemos com animais transgênicos e nocautes?. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 6, p. 1352-1360, 2006.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BEDARD, K.; KRAUSE, K. H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. **Physiological Reviews**, Bethesda, v. 87, p. 245-313, 2007.

BUCKLEY, J. M. et al. Increased Susceptibility of ST2-deficient mice to polymicrobial sepsis is associated with an impaired bactericidal function. **Journal Immunology**, Baltimore, v. 187, n. 8, p. 4293-4299, 2011.

BUNTING, M. M. et al. Interleukin-33 drives activation of alveolar macrophages and airway inflammation in a mouse model of acute exacerbation of chronic asthma. **BioMed Research International**, Sydney, v.13, p. 1-10, 2013.

BURGESS, R. J.; AGATHOCLEOUS, M.; MORRISON, S. J. Metabolic regulation of stem cell function. **Journal of Internal Medicine**, England, v. 276, n. 1, p. 12-24, 2014.

CANO-DOMÍNGUEZ, N. et al. Oxidases NOX-1 and NOX-2 require the regulatory subunit NOR-1 to control cell differentiation and growth in *Neurospora crassa*. **Eukaryotic Cell**, Washington, v. 7, n. 8, p.1352-1361, Aug. 2008.

CARVALHO, I. M. M. et al. O consumo de castanhas pode reduzir o risco de processos inflamatórios e doenças crônicas. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer, Goiânia, v. 8, n. 15, p. 1977-96, 2012.

CARVALHO PINTO, C. E. de. **Classificação Genética dos Animais de Laboratório**. Universidade Federal Fluminense. Disciplina: Animais de Laboratório. Disponível em: <www.uff.br/animaislab/ap6.doc>. Acesso em: 30 jun. 2015.

CASAGRANDE, R. et al. Protective effect of topical formulations containing quercetin against UVB-induced oxidative stress in hairless mice. **Journal of Photochemistry and Photobiology B. Biology**, Lausanne, v. 84, n.1, p. 21-27, 2006.

CAVALCANTE, A. G. M.; BRUIN, P. F. C. O papel do estresse oxidativo na DPOC: conceitos atuais e perspectivas. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, Brasília, v. 35, n. 12, p. 1227-1237, 2009.

CECON, E. **Fator de transcrição NFkB em glândulas pineais de ratos**. 2010. 138 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Fisiologia, São Paulo, 2010.

CHATTERJEE, P. K. et al. Tempol, a membrane-permeable radical scavenger, reduces oxidant stress-mediated renal dysfunction and injury in the rat. **Kidney International**, New York, v. 58, n. 2, p. 658-673, 2000.

CHEN, X. J. et al. Correlations between serum IL33 and tumor development: a meta-analysis. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, Bangkok, v. 15, n. 8, p. 3503-3505, 2014.

CHOI, H.S. et al. A quantitative nitroblue tetrazolium assay for determining intracellular superoxide anion production in phagocytic cells. **Immunoassay Immunochem**, v. 27, n.1, p. 31-44, 2006.

CHOI, R. J.; CHENG, M. S.; KIM, Y. S. Desoxyrhapontigenin up-regulates Nrf2-mediated heme oxygenase-1 expression in macrophages and inflammatory lung injury. **Redox Biology**, [Amsterdam], v. 2, p. 504-512, 2014.

COLLIER, H.O.J. et al. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **Br. J. Pharmac. Chemother.** v. 32, p. 295-310, 1968.

COLLINS, T. Inflamação aguda e crônica. In: COTRAN, R. S. et al. **Patologia estrutural e funcional**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. Cap. 3 , p.44-78.

COONEY, S. J.; BERMUDEZ-SABOGAL, S. L.; BYRNES, K. R. Cellular and temporal expression of NADPH oxidase (NOX) isoforms after brain injury. **Journal of Neuroinflammation**, London, v. 10, p.1-13, 2013.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoides: potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química**, Niterói, v. 1, n. 3, p. 241-256, 2009. Disponível em: <<http://www.uff.br/RVQ/index.php/rvq/article/viewFile/51/98>>. Acesso em: 23 set. 2014.

CRUZ, W. A. S. **Atividade de mieloperoxidase e produção de oxigênio singlete em neutrófilos e células monocíticas**. 2010. 60 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo, 2010.

CUADRADO, A. et al. Transcription factors NRF2 and nf-kb are coordinated effectors of the RHO family, GTP binding protein rac1 during inflammation. **Journal Biological Chemistry**, Baltimore, v. 289, n. 22, p. 15244-15258, 2014.

CUNHA, F. Q. et al. The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. **British Journal of Pharmacology**, London, v. 107, n. 3, p. 660-664, 1992.

CUNHA, T. M. et al. An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. **Brazilian Journal of Medical and Biology Research**, Ribeirão Preto, v. 37, n. 3, p. 401-407, 2004.

CUNHA, T. M. et al. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. **PNAS**, Washington, v. 102, n. 5, p. 1755-1760, 2005.

CUNHA, T. M. et al. Role of cytokines in mediating mechanical hypernociception in a model of delayed-type hypersensitivity in mice. **European Journal of Pain**, London, v. 12, n. 8, p. 1059-1068, Nov. 2008.

CUNNINGHAM, M. L.; LOKESH, B. R. Superoxide anion generated by potassium superoxide is cytotoxic and mutagenic to Chinese hamster ovary cells. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 121, n. 3/4, p. 299-304, Sep.1983.

DEMYANETS, S. et al. Soluble ST2 and interleukin-33 levels in coronary artery disease: relation to disease activity and adverse outcome. **PloS One**, San Francisco, v. 9, n. 4, e95055, Apr. 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0095055.eCollection 2014.

DUSTING, G. J.; SELEMIDIS, S.; JIANG, F. Mechanisms for suppressing NADPH oxidase in the vascular wall. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, vol. 100, suppl. I, p. 97-103, 2005.

EL-BENNA, J. et al. p47 phox, the phagocyte NADPH oxidase/NOX2 organizer: structure, phosphorylation and implication in diseases. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 41, n. 4, p. 217-225, 2009.

FANHANI, A. P. G.; FERREIRA, M. P. Agentes antioxidantes: seu papel na nutrição e saúde dos atletas. **SaBios-Rev Saúde e Biol**, v. 1, n. 2, p. 33-41, 2006.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev Ass Med Brasil**, v. 43, n. 1, p. 61-8, 1997.

FERREIRA, S. H. A new method for measuring variations of rats paw volumes. **Journal Pharmacy and Pharmacology**, v. 31, p. 648, 1979.

FERREIRA, S. H. et al. Dor Inflamatória. In: *Dor: princípios e prática*. 1. ed. São Paulo: Artmed, 2009, cap. 19, p. 265-279.

FERREIRA, S. H.; VANE J. R. Br. Control of pain. **J Pharmacol**, v.30 (2), p.417-24, 1967.

FILIPPIN, L.I. et al. Influência de Processos Redox na Resposta Inflamatória da Artrite Reumatóide. **Rev Bras Reumatol**, v. 48, n. 1, p. 17-24, 2008.

FRANCISCHETTI, I. M. B. et al. Tempol, an intracellular antioxidant, inhibits tissue factor expression, attenuates dendritic cell function, and is partially protective in a

- murine model of cerebral malaria. **PloS One**, San Francisco, v. 9, n. 2, e87140, Feb. 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0087140.
- FRANCO, D. G. Fator de transcrição nuclear kappa B no sistema nervoso central: do fisiológico ao patológico. **Revista da Biologia**, [São Paulo], v. 4, p. 35-39, jun. 2010. doi: 10.7594/revbio.
- GAO, YJ.; JI, RR. Targeting Astrocyte Signaling for Chronic Pain. **Neurotherapeutics**, v. 7, n. 4, p. 482-493, October. 2010. doi:10.1016/j.nurt.2010.05.016.
- GHEZZI, P. Role of glutathione in immunity and inflammation in the lung. **International Journal of General Medicine**, [Auckland], v. 4, p. 105-113, Jan 2011. doi: 10.2147/IJGM.S15618.
- GUEDES, R.P. et al. Neuropathic Pain Modifies Antioxidant Activity in Rat Spinal Cord. **Neurochem Res**. v. 31, n. 5, p. 603-609, May 2006.
- GRANGE, P. A. et al. Production of superoxide anions by keratinocytes initiates P. acnes-induced inflammation of the skin. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 5, n. 7, e1000527, Jul. 2009. doi 10.1371/journal.ppat.1000527.
- HEUMÜLLER, S. et al. Apocynin is not an inhibitor of vascular NADPH oxidases but an antioxidant. **Hypertension**, Dallas, v. 51, n. 2, p. 211-217, Feb. 2008.
- HO, J. E. et al. Common genetic variation at the IL1RL1 locus regulates IL33/ST2 signaling. **Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 123, n. 10, p. 4208-4218, Oct. 2013.
- HOHMANN, M. S. N. et al. 5-lipoxygenase deficiency reduces acetaminophen-induced hepatotoxicity and lethality. **Biomed Research International**, New York, v. 2013. doi.org/10.1155/2013/627046.
- HSU, C. C. et al. Yuwen02f1 suppresses LPS-induced endotoxemia and adjuvant-induced arthritis primarily through blockade of ROS formation, NFkB and MAPK activation. **Biochem Pharmacol**, v. 85, n. 3, p. 385-395, 2013.
- HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v. 30, n. 1, p. 103-14, 1987.
- IMAIA, Y. et al. Skin-specific expression of IL-33 activates group 2 innate lymphoid cells and elicits atopic dermatitis-like inflammation in mice. **PNAS**, Washington, v. 110, n. 34, p. 13921-13926, Aug. 2013.
- ITALIANI, P. et al. Evaluating the levels of interleukin-1 family cytokines in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. **Journal of Neuroinflammation**, London, v. 11, May 2014. doi: 10.1186/1742-2094-11-94.
- JIANG, J. et al. A model of interaction between nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase and apocynin analogues by docking method. **International Journal of Molecular Science**, Basel, v.14, n.1, p. 827-840, Jan. 2013. doi:10.3390/ijms14010807.

- JIN, X.; GEREAU, RW. Acute p38-mediated modulation of tetrodotoxin-resistant sodium channels in mouse sensory neurons by tumor necrosis factor-alpha. **J Neurosci**, v. 26, n. 1, p. 246-55, 2006.
- KAKKAR, R.; LEE, R. T. The IL-33/ST2 pathway: therapeutic target and novel biomarker. **Nature Reviews Drug Discovery**, London, v. 7, n. 10, p. 827-840, Oct. 2008. doi: 10.1038/nrd2660.
- KEMPURAJ, D. et al. Glia maturation factor induces interleukin-33 release from astrocytes: implications for neurodegenerative diseases. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, New York, v. 8, n. 3, p. 643-650, 2013. doi: 10.1007/s11481-013-9439-7.
- KHATTAB, M.M. TEMPOL, a membrane-permeable radical scavenger, attenuates peroxynitrite- and superoxide anion-enhanced carrageenan-induced paw edema and hyperalgesia: a key role for superoxide anion. **Eur J Pharmacol**, n. 548, v. 1-3, p. 167-73, 2006.
- KIM, K. H. et al. Nrf2 is essential for the expression of lipocalin-prostaglandin D synthase induced by prostaglandin D2. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 65, p. 1134-1142, Dec. 2013. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013a.08.192.
- _____. Therapeutic effect of Chung-Pae, an experimental herbal formula, on acute lung inflammation is associated with suppression of NF-kB and activation of Nrf2. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, Oxford, 2013b:659459, 2013. doi: 10.1155/2013/659459.
- KIM, Y. S.; ZERIN, T.; SONG, H. Y. Antioxidant action of ellagic acid ameliorates paraquat-induced A549 cytotoxicity. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 36, n. 4, p. 609-615, 2013.
- KLENIEWSKA, P.; MICHALSKA, M.; GORACA, A. Influence of NADPH oxidase inhibition on oxidative stress parameters in rat hearts. **Pharmacological Reports**, Kraków, v. 65, n. 4, p. 898-905, 2013.
- KOBAYASHI, E.; SUZUKI, T.; YAMAMOTO, M. Roles Nrf2 Plays in Myeloid Cells and Related Disorders. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, New York, 2013:529219, 2013. doi: 10.1155/2013/529219.
- LAFEBER, F. P. et al. Apocynin, a plant-derived, cartilage-saving drug, might be useful in the treatment of rheumatoid arthritis. **Rheumatology**, v. 38, n. 11, p.1088-93, 1999.
- LASSÈGUE, B.; GRIENDLING, K. K. NADPH oxidases: functions and pathologies in the vasculature. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, Dallas, v. 30, n.4, p. 653-661, Apr. 2010.
- LEE, J. W. et al. 3,4,5-trihydroxycinnamic acid inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory response through the activation of Nrf2 pathway in BV2 microglial cells. **Biomolecules & Therapeutics**, Seoul, v. 21, n. 1, p. 60-65, Jan. 2013. doi: 10.4062/biomolther.2012.091.

LI, C. et al. Interleikin-33 increases antibacterial defense by activation of inducible nitric oxide synthase in skin. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 10, n. 2, e1003918, Feb. 2014. doi: 10.1371/journal.ppat.1003918.eCollection 2014.

LI, F. et al. Stable isotope- and mass spectrometry-based metabolomics as tools in drug metabolism: a study expanding tempol pharmacology. **Journal of Proteome Research**, Washington, v. 12, n. 3, p. 1369-1376, Mar. 2013. doi: 10.1021/pr301023x.

LI, Y. J.; KAWADA, T.; AZUMA, A. Nrf2 Is a protective factor against oxidative stresses induced by diesel exhaust particle in allergic asthma. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, Austion, 2013:323607, 2013. doi: 10.1155/2013/323607.

LINARES, E. et al. Tempol moderately extends survival in a hSOD1 G93A ALS rat model by inhibiting neuronal cell loss, oxidative damage and levels of non-native hSOD1 G93A forms. **PloS One**, San Francisco, v. 8, n. 2, e55868, Feb. 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0055868.

LU, D. et al. Serum soluble ST2 is associated with ER-positive breast cancer. **BMC Cancer**, London, v.14, 2014. doi: 10.1186/1471-2407-14-198.

LUZ, F. A. C. et al. The physiopathological role of IL-33: new highlights in bone biology and a proposed role in periodontal disease. **Mediators of Inflammation**, Oxford, 2014:342410, 2014. doi: 10.1155/2014/342410.

MACÍAS-PÉREZ, M. E. et al. Ethers and esters derived from apocynin avoid the interaction between p47phox and p22phox subunits of NADPH oxidase: evaluation *in vitro* and *in silico*. **Bioscience Report**, London, v. 33, n. 4, Aug. 2013. doi: 10.1042/BSR20130029.

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, n. 4, p. 321-331, 2015.

MANNELLI, L. D. C. et al. Therapeutic effects of the superoxide dismutase mimetic compound MnIIIme2DO2A on experimental articular pain in rats. **Mediators of Inflammation**, Oxford, 2013:905360, 2013. doi: 10.1155/2013/905360.

MATTSSON, E. et al. Intracellular pathways involved in tumor necrosis factor-alpha release by human monocytes on stimulation with lipopolysaccharide or staphylococcal peptidoglycan are partly similar. **J Infect Dis**, v. 173, n. 1, p.212-8, 1996.

MELLO, S. B. V.; LAURINDO, I. M. M. A resposta inflamatória. In: YOSHINARI, N.H.; BONFÁ, E.S.D.O. **Reumatologia para o clínico**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2000. p. 1-9.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, Basingstoke, v. 454, n. 7203, p. 428-435, Jul. 2008. doi: 10.1038/nature07201.

MILLER, A. M. Role of IL-33 in inflammation and disease. **Journal of Inflammation**, London, v. 8, n. 1, Aug. 2011. doi: 10.1186/1476-9255-8-22.

MUSCOLI, C. et al. On the selectivity of superoxide dismutase mimetics and its importance in pharmacological studies. **British Journal of Pharmacology**, London, v. 140, n.3, p. 445-460, Oct. 2003.

NIEDERBERGER, E.; GEISLINGER, G. The IKK-NF- κ B pathway: a source for novel molecular drug targets in pain therapy? **FASEB Journal**, [Bethesda], v. 22, n. 10, p. 3432-3442, Oct. 2008.

NUNES, T.; BERNARDAZZI, C.; DE SOUZA, H. S. Interleukin-33 and inflammatory bowel diseases: lessons from human studies. **Mediators of Inflammation**, Oxford, 2014:423957, 2014. doi: 10.1155/2014/423957.

OECKINGHAUS, A.; HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. Crosstalk in NF- κ B signaling pathways. **Nature Immunology**, New York, v.12, n. 8, p.695-708, 2011. doi: 10.1038/ni.2065.

OHSAWA, K. et al. Microglia/macrophage-specific protein Iba1 binds to fimbrin and enhances its actin-bundling activity. **Journal of Neurochemistry**, v. 88, p. 844–856, 2004. doi:10.1046/j.1471-4159.2003.02213.x.

PETRÔNIO, M.S. et al. Apocynin: chemical and biophysical properties of a NADPH oxidase inhibitor. **Molecules**, Basel, v. 18, n. 3, p. 2821-2839, Mar. 2013. doi: 10.3390/molecules18032821.

QIN, Z. H.; TAO, L. Y.; CHEN, X. Dual roles of NF- κ B in cell survival and implications of NF- κ B inhibitors in neuroprotective therapy. **Acta Pharmacologica Sinica**, Beijing, v. 28, n. 12, p. 1859-1872, Dec. 2007.

RABÊLO, L.A. et al. Desbalanço redox: NADPH oxidase como um alvo terapêutico no manejo cardiovascular. **Arq Bras Cardiol**, v. 94, n. 5, p. 684-693, 2010.

RAJENDRASOZHAN, S. et al. Deacetylases and NF- κ B in redox regulation of cigarette smoke induced lung inflammation: implications in pathogenesis of COPD. **Antioxidants & Redox Signaling**, Larchmont, v. 10, n. 4, p. 799-811, 2008.

RAO, A. K. et al. Effects of Cu/Zn superoxide dismutase on estrogen responsiveness and oxidative stress in human breast cancer cells. **Molecular Endocrinology**, Baltimore, v. 22, n. 5, p. 1113-1124, May 2008. doi: 10.1210/me.2007-0381.

SARNI, R. O. S. et al. Micronutrientes e sistema imunológico. **Rev Bras Alerg Immunopatol**, v. 33, n. 1, 2010.

SERHAN, C. N. et al. Novel anti-inflammatory – pro-resolving mediators and their receptors. **Current Topics Medicinal Chemistry**, Hilversum, v. 11, n. 6, p. 629-647, 2011.

SOEHNLEIN, O.; LINDBOM, L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. **Nature Reviews Immunology**, London, v. 10, n. 6, p. 427-439, Jun. 2010. doi: 10.1038/nri2779.

STEFANSKA, J.; PAWLICZAK, R. Apocynin: molecular aptitudes. **Mediators of Inflammation**, Oxford, 2008:106507, 2008. doi: 10.1155/2008/106507.

SLIWINSKA-MOSSON, M. et al. The effect of endothelin-1 on pancreatic diseases in patients who smoke. **Advances in Clinical and Experimental Medicine**, Wroclaw, v. 22, n. 5, p. 745-752, Sep./Oct. 2013.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern recognition receptors and inflammation. **Cell**, Cambridge, v. 140, n. 6, p. 805-820, Mar. 2010. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.022.

TANG, S. et al. Increased IL-33 in synovial fluid and paired serum is associated with disease activity and autoantibodies in rheumatoid arthritis. **Clinical and Developmental Immunology**, Cario, 2013:985301, 2013. doi: 10.1155/2013/985301.

TANIGAWA, S. et al. Jun dimerization protein 2 is a critical component of the Nrf2/MafK complex regulating the response to ROS homeostasis. **Cell Death and Disease**, London, v. 4, e921, 2013. doi: 10.1038/cddis.2013.448.

TAVES, S. et al. Microglia and spinal cord synaptic plasticity in persistent pain. **Neural Plast**, Volume 2013, Article ID 753656, 10 pages. doi: 10.1155/2013/753656.

TEIXEIRA, M. J. Fisiopatologia da dor. In: ALVES NETO, O. et al. **Dor: princípios e práticas**. Porto Alegre: Artmed, 2009. Cap. 12, p. 145-175.

TRIBUTINO, J.L.M. et al. LASSBio-881: an N-acylhydrazone transient receptor potential vanilloid subfamily type 1 antagonist orally effective against the hypernociception induced by capsaicin or partial sciatic ligation. **British Journal of Pharmacology**, London, v. 159, n. 8, p. 1716-1723, Apr. 2010.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO (USP). DTAPEP Premium Biotério Central. **SPF - Balb/c**. Disponível em: <http://www.bioterio.fm.usp.br/index.php?mpg=03.00.00&tip=CAMUNDONGO&id_ani=1¶metros=sim>. Acesso em: 30 jun. 2015.

VALÉRIO, D. A. et al. Anti-inflammatory and analgesic effects of the sesquiterpene lactone budlein A in mice: inhibition of cytokine production-dependent mechanism. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 562, n.1-2, p. 155-63, May 2007.

VALÉRIO, D. A. et al. Quercetin reduces inflammatory pain: inhibition of oxidative stress and cytokine production. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 72, n.11, p. 1975-9, Nov. 2009. doi: 10.1021/np900259y.

VASCONCELOS, S. M. L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VERRI, W. A. et al. Nociceptive effect of subcutaneously injected interleukin-12 is mediated by endothelin (ET) acting on ETB receptors in rats. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Baltimore, v. 315, n. 2, p. 609-615, Nov. 2005.

VERRI, W. A. et al. IL-15 mediates antigen-induced neutrophil migration by triggering IL-18 production. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v. 37, n. 12, p. 3373-3380, Dec. 2007.

VERRI, W. A. et al. IL ONB– 33 mediates antigen – induced cutaneous and articular hypernociception in mice. **PNAS**, Washington, v. 105, n. 7, p. 2723-2728, Feb. 2008. doi: 10.1073/pnas.0712116105.

VERRI, W. A. et al. IL – 33 induces neutrophil migration in rheumatoid arthritis and is a target of anti – TNF therapy. **Annals of the Rheumatic Diseases**, London, v.69, n. 9, p.1697-1703, May 2010. doi: 10.1136/ard.2009.122655.

VIEIRA, S.; HOFFMAN, R. **Estatística experimental**. São Paulo: Atlas, 179p. 1989.

WANG, Z. Q. et al. A newly identified role for superoxide in inflammatory pain. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Baltimore, v. 309, n. 3, p. 869-878, Jun. 2004.

WANG, K. et al. Improvement of pharmacokinetics behavior of apocynin by nitrore derivatization: comparative pharmacokinetics of nitrore-apocynin and its parent apocynin in rats. **PloS One**, San Francisco, v. 8, n. 7, e70189, Jul. 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0070189.

WHAYNE JR, T. F.; MAULIK, N. Nutrition and the healthy heart with an exercise boost. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, Ottawa, v. 90, n. 8, p. 967-976, Aug. 2012. doi: 10.1139/y2012-074.

WOJTCZAK-SOSKA, K. et al. Soluble ST2 protein in the short-term prognosis after hospitalization in chronic systolic heart failure. **Polish Heart Journal**, Warszawa, v. 72, n. 8, p. 725-734, 2014. doi: 10.5603/KP.a2014.0085.

WU, H.J. et al. Inflammatory arthritis can be reined in by CpG-induced DC-NK cell cross talk. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v.204, n. 8, p. 1911-1922, Ago. 2007.

XIAO, W. Advances in NF- κ B signaling transduction and transcription. **Cellular & Molecular Immunology**, Beijing, v. 1, n. 6, p. 425-435, 2004.

YU, P. et al. Unique role of NADPH oxidase 5 in oxidative stress in human renal proximal tubule cells. **Redox Biology**, [Amsterdam], v. 2, p. 570-579, Feb. 2014. doi: 10.1016/j.redox.2014.01.020.eCollection 2014.

ZANATTA, C. M. et al. Papel do sistema endotelina na nefropatia diabética. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, São Paulo, v. 52, n. 4, jun. 2008. doi: org/10.1590/S0004-27302008000400003.

ZARPELON, A. C. et al. IL-33/ST2 signalling contributes to carrageenin-induced innate inflammation and inflammatory pain: role of cytokines, endothelin-1 and prostaglandin E2. **British Journal of Pharmacology**, v. 169, p. 90-101, 2013. doi:10.1111/bph.12110.

ZHANG, R. et al. Mitochondrial regulation of NADPH oxidase in hindlimb unweighting rat cerebral arteries. **PloS One**, San Francisco, v. 9, n. 4, e95916, Apr. 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0095916.eCollection 2014.

ZHAO, Q.; CHEN, G. Role of IL-33 and its receptor in T cell-mediated autoimmune diseases. **BioMed Research International**, New York, 2014:587376, 2014. doi: 10.1155/2014/587376.

ZIMMERMANN, A. M.; KIRSTEN, V. R. Alimentos com função antioxidante em doenças crônicas: uma abordagem clínica. **Disc Scientia. Série: Ciências da Saúde**, Santa Maria, v. 9, n. 1, p. 51-68, 2008.

ANEXO A

<http://www.journals.elsevier.com/neuropharmacology/>

ANEXO B

<http://www.springer.com/biomed/immunology/journal/11>

ANEXO C

<http://www.journals.elsevier.com/european-journal-of-pharmacology/>