



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

BEATRIZ HOFFMANN SALLES BIANCHINI

**MARESINA 2 REDUZ A DOR E INFLAMAÇÃO INDUZIDAS
PELO ÂNION SUPERÓXIDO EM CAMUNDONGOS**

BEATRIZ HOFFMANN SALLES BIANCHINI

**MARESINA 2 REDUZ A DOR E INFLAMAÇÃO INDUZIDAS
PELO ÂNION SUPERÓXIDO EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Patologia Experimental.

Orientador: Waldiceu Aparecido Verri Junior.

Londrina
2022

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

B577p Bianchini, Beatriz Hoffmann Salles.

Maresina 2 reduz a dor e inflamação induzidas pelo ânion superóxido em camundongos / Beatriz Hoffmann Salles Bianchini. - Londrina, 2022.

49 f. : il.

Orientador: Waldiceu Aparecido Verri Junior.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2022.

Inclui bibliografia.

1. Inflamação - Tese. 2. Dor - Tese. 3. ERO - Tese. 4. Mediadores lipídicos pró-resolução - Tese. I. Aparecido Verri Junior, Waldiceu . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. III. Título.

CDU 616

BEATRIZ HOFFMANN SALLES BIANCHINI

**MARESINA 2 REDUZ A DOR E INFLAMAÇÃO INDUZIDAS
PELO ÂNION SUPERÓXIDO EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Patologia Experimental.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Sérgio Marques Borghi
Universidade Norte do Paraná – Unopar

Londrina, 04 de abril de 2022.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha mãe, Priscila Hoffmann Salles Tavares, ao meu esposo Ariste Orlando Bonfain da Silva e toda a minha família que esteve do meu lado. Agradeço ao pelo apoio desde a graduação, sempre incentivando para a minha realização profissional.

Agradeço ao Prof. Dr. Waldiceu Ap. Verri Junior pela orientação, direcionamento e pela oportunidade de fazer parte do laboratório de Dor, Inflamação, Neuropatia e Câncer (LADINC).

Aos professores Dr. Fábio Henrique Kwasniewskie e Dr. Sérgio Marques Borghi, por aceitarem o convite e comporem minha banca examinadora. Sinto-me honrada pela presença dos dois e pelas contribuições neste trabalho.

A todos os membros do LADINC, por toda colaboração, amizade, paciência e ensinamentos. Sem dúvidas foram peças importantes no desenvolvimento deste trabalho, contribuindo para um melhor desempenho em minha jornada acadêmica.

A CAPES pelo apoio financeiro que permitiu a realização do mestrado.

Agradeço também a UEL, em especial, ao departamento de Ciências Patológicas e ao programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental por todo apoio.

“O maior laboratório de ciências é a natureza, e o maior método de estudá-la é observando ela.”

(Herbert Alexandre Galdino Pereira)

RESUMO

BIANCHINI, Beatriz Hoffmann Salles. **Maresina 2 reduz a dor e inflamação induzidas por ânion superóxido em camundongos**. 2022. 50 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

Espécies reativas de oxigênio (EROs) induzem inflamação e dor através da liberação de mediadores inflamatórios e sensibilização dos neurônios via ativação de canais iônicos, como por exemplo o receptor de potencial transitório vanilóide subtipo 1 (TRPV1). Mediadores pró-resolução especializados (SPMs) têm efeitos analgésicos e anti-inflamatórios desempenhando suas funções via seus receptores, ou atuando de forma alostérica em canais iônicos impedindo a ativação neuronal. Apesar disso, ainda não se sabe se SPMs como a maresina 2 (MaR2) inibem a dor causada por EROs. Portanto, neste trabalho avaliamos o efeito analgésico e anti-inflamatório da MaR2 na inflamação induzida pelo superóxido de potássio (KO₂, um doador de ânion superóxido). Para isso foram utilizados camundongos swiss machos (20-25g, n=6 por grupo). Os animais foram tratados com 4 doses de MaR2 [10, 30, 100 ou 300 pg/animal, intraperitoneal (i.p)] ou veículo [1% etanol em salina, intraperitoneal (i.p)], 30 minutos antes do estímulo inflamatório com KO₂ [30 µg/animal, intraplantar (i.pl.)]. A hiperalgesia mecânica foi determinada com uma versão eletrônica dos filamentos de von Frey nos tempos 0 (basal), 0,5, 1, 3, 5 e 7h após o estímulo. A hiperalgesia térmica foi avaliada através do teste de Hargreaves nos tempos 0 (basal), 1,3 e 7h e placa quente aquecida à 52°C nos tempos 0 (basal), 0,5, 1, 3, 5 e 7h após o estímulo. A dor manifesta foi avaliada pelo número de contorções abdominais, sacudidas da pata (*flinches*) e tempo de lambida expressos cumulativamente ao longo de 20 e 30 minutos, respectivamente. A disfunção na distribuição do peso corporal nas patas traseiras foi determinada utilizando o aparato de *static weight bearing* nos tempos 0 (basal) e 3h após o estímulo. O recrutamento leucocitário foi determinado a partir da contagem das células presentes no tecido plantar dos animais 7h após o estímulo. A MaR2 reduziu a hiperalgesia mecânica apresentando analgesia em todos os tempos de análise de maneira dose-dependente, além de reduzir a hiperalgesia térmica, comportamentos de dor espontânea, desbalanço da distribuição do peso e o recrutamento de leucócitos totais no tecido plantar induzidos pelo KO₂. Concluindo, a MaR2 tem efeito analgésico e anti-inflamatório na inflamação iniciada pelo ânion superóxido.

Palavras-chave: mediadores lipídicos pró-resolução; inflamação; dor.

ABSTRACT

BIANCHINI, Beatriz Hoffmann Salles. **Maresin 2 reduces superoxide anion-induced pain and inflammation in mice.** 2022. 50 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Mestrado em Patologia Experimental) – Centro Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

Reactive oxygen species (ROS) induce inflammation and pain by triggering the release of inflammatory mediator and the sensitization of ion channels expressed by neurons, such as TRPV1 (transient receptor potential vanilloid type 1). Specialized pro-resolving mediators (SPMs) have analgesic and anti-inflammatory effects by acting via its receptors, or allosterically via TRPV1 channels, for example. Despite of that, it remains unknown if SPMs such as maresin 2 (MaR2) inhibits ROS-induced pain. Therefore, we evaluated the analgesic and anti-inflammatory effect of MaR2 in potassium superoxide (KO₂, a superoxide anion donor) initiated inflammation. For this work, male Swiss mice (20-25g, n=6) were treated with 4 doses of MaR2 [10, 30, 100 or 300pg/animal, intraperitoneal (ip)], 30 minutes before the inflammatory stimulus [30 µg KO₂, intraplantar (i.pl.)]. Mechanical hyperalgesia was determined with an electronic version of von Frey filaments at 0 (baseline), 0.5, 1, 3, 5, and 7h after stimulation. Based in this experiment, the best dose of MaR2 was chosen for further experiments. Thermal hyperalgesia was evaluated using the Hargreaves test at time-points 0 (baseline), 1, 3 and 7h and hot plate heated to 52°C at times 0 (baseline), 0.5, 1, 3, 5 and 7h after the stimulus. Non-evoked spontaneous pain was evaluated through the number of abdominal writhings, paw flinches and licking time expressed cumulatively over 20 and 30 minutes, respectively. Unbalanced body weight distribution in the hind legs was determined using a static weight bearing apparatus at time-points 0 (baseline) and 3h after stimulation. Leukocyte recruitment was determined by counting the number of cells present in the plantar tissue of the animals 7h after stimulation in H&E stained slices. MaR2 reduced mechanical hyperalgesia, presenting analgesia at all analysis times, in a dose-dependent manner, in addition to reducing thermal hyperalgesia, spontaneous pain behaviors, unbalanced weight distribution and the recruitment of total leukocytes in the plantar tissue induced by KO₂. In conclusion, MaR2 has analgesic and anti-inflammatory effects in superoxide anion initiated inflammation.

Key-words: specialized pro-resolving mediators; ROS; inflammation; pain.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Vias biossintéticas dos mediadores lipídicos pró-resolução especializados (SPMs)	19
Figura 2 – Polarização M1 e M2 de macrófagos	20
Figura 3 – Biossíntese da MaR2	21

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido araquidônico
DAMPS	Padrões moleculares associados a danos
DHA	Ácido docosahexaenóico
DRG	Gânglio da raiz dorsal
EPA	Ácido eicosapentaenoico
ERO	Espécie reativa de oxigênio
i.p	Intra-peritoneal
i.pl	Intraplantar
KO ₂	Superóxido de potássio
MaR2	Maresina-2
NF-κB	Factor nuclear kappa B
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
PAMPS	Padrões moleculares associados a patógenos
SOD	Superoxido desmutase
SPMs	Mediadores pró-resolução especializados
PRR	Receptor de Reconhecimento de Padrão
TRPV-1	Receptor de Potencial Transitório Subfamília V, membro 1

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	INFLAMAÇÃO	14
1.2	DOR.....	16
1.3	ESTRESSE OXIDATIVO	17
1.4	MARESINA-2	18
2	OBJETIVOS	23
2.1	OBJETIVO GERAL	23
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
	REFERÊNCIAS	24
3	ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO	29
3	CONCLUSÃO	47
	ANEXOS	48
	ANEXO A – Comissão de ética no uso de animais	49

1 1 INTRODUÇÃO

2 1.1 Inflamação

3 A imunidade inata, também chamada de imunidade natural, é a primeira linha
4 de defesa do organismo. Este processo consiste em mecanismos celulares e
5 bioquímicos que são preparados para responder rapidamente à infecções ou danos
6 teciduais (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). A imunidade inata é componente de
7 um sistema integrado de defesa do hospedeiro no qual células e moléculas funcionam
8 cooperativamente (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

9 Quando o organismo é agredido, o primeiro evento para a resposta defensiva
10 é o reconhecimento da agressão. O reconhecimento ocorre pela identificação de
11 moléculas presentes no agente agressor ou geradas em resposta à agressão com
12 componentes do próprio organismo (PRADEU; COOPER, 2012). As moléculas
13 existentes em patógenos que podem ser reconhecidas pelo organismo recebem o
14 nome de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), enquanto as que
15 são resultado das alterações em moléculas do organismo ou de estresse metabólico
16 são denominadas de padrões moleculares associados a danos (DAMPs). A ativação
17 de receptores de reconhecimento padrão (PRRs) para PAMPs e DAMPs iniciam
18 cascatas de sinalização intracelulares que levam à transcrição de genes para citocinas
19 pró-inflamatórias, quimiocinas, interferons tipo I (IFNs), peptídeos antimicrobianos e
20 proteínas envolvidas na modulação da sinalização de PRRs (MATZINGER, 2002;
21 MEDZHITOV; JANEWAY, 2002). A maioria das células expressa PRRs, sendo que
22 fagócitos, incluindo neutrófilos, macrófagos, e células dendríticas expressam em
23 maior número e variedade (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

24 Sabe-se que uma das principais reações geradas pelo sistema imune é a
25 inflamação, que é uma resposta do corpo ao dano aos seus tecidos e células. Esse
26 dano pode ser causado por patógenos, estímulos nocivos como produtos químicos ou
27 lesões físicas, e constitui um dos componentes mais importantes da execução da
28 resposta imunológica (FILHO, 2013; GERMOLEC et al., 2018). A inflamação aguda é
29 uma resposta de curto prazo que geralmente resulta, após o processo resolutivo, na
30 cura, onde os leucócitos se infiltram na região danificada, removendo o estímulo e
31 reparando o tecido (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). A inflamação crônica, ao
32 contrário, é uma resposta prolongada e adaptativa que envolve inflamação ativa,

1 destruição tecidual e reparo do tecido (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). Mesmo
2 assim, o processo inflamatório tem um cunho benéfico, pois envolve fenômenos
3 vasculares e celulares que promovem o recrutamento de leucócitos, a remoção do
4 estímulo nocivo e a proteção do organismo. Clinicamente, a inflamação causa os
5 sinais cardinais calor, rubor, edema, dor e perda de função (ABBAS; KUMAR;
6 FAUSTO, 2005).

7 Cronologicamente, a resposta inflamatória aguda é caracterizada por edema
8 precoce do tecido que leva de segundos a minutos, seguido por infiltração de
9 neutrófilos em minutos a horas. Posteriormente, células mononucleares, algumas das
10 quais são diferenciadas em macrófagos, estes são importantes para geração de
11 mediadores pró-resolução especializados (SPMs) que contribuem para o retorno da
12 homeostase (DENG et al., 2014). Se a inflamação aguda não se resolver, pode se
13 converter em uma inflamação crônica (LEVY; SERHAN, 2014) .

14 Sendo assim, a inflamação consiste no extravasamento de proteínas
15 plasmáticas do sangue e recrutamento de leucócitos na tentativa de retornar a
16 homeostase (ABUL K. ABBAS, 2016). Os principais leucócitos recrutados são os
17 fagócitos, neutrófilos (que têm vida curta nos tecidos) e monócitos (que se
18 desenvolvem em macrófagos teciduais) (ABUL K. ABBAS, 2016).

19 Além disso, essas reações também envolvem citocinas que são produzidas por
20 essas células imunes e a secreção de moléculas que induzem e regulam a resposta
21 inflamatória (ABUL K. ABBAS, 2016). As principais citocinas na inflamação aguda são
22 o TNF- α , IL-1, IL-6, bem como quimiocinas, que contribuem para um aumento no
23 recrutamento de neutrófilos e ativa sistema geradores de superóxido induzindo a
24 inflamação e contribuindo para o aumento do estresse oxidativo e da dor (BORISH;
25 STEINKE, 2003; FILHO, 2013; YAMACITA-BORIN et al., 2015). A transcrição do fator
26 nuclear kappa B (NFkB), por exemplo, é um componente chave redox sensível da dor
27 e inflamação, por modular a produção de mediadores pró-inflamatórios e radicais
28 livres (NDENGELE et al., 2008).

29 Apesar da inflamação ser uma importante resposta do nosso organismo à
30 agressões, pode se tornar prejudicial se desregulada. Os leucócitos recrutados são
31 potencialmente lesivos para os tecidos e são responsáveis por grande parte das
32 lesões nesses locais (FILHO, 2013). Além disso, a falha na resolução do processo
33 inflamatório pode acarretar fibrose e culminar no 5º sinal da inflamação que é a perda
34 de função do tecido e/ou órgão acometido (MADERNA; GODSON, 2009). Por tanto,

1 para uma eliminação da agressão seguida de uma fase de resolução e reparo eficiente
2 é necessário a mediação principalmente por macrófagos residentes que são
3 responsáveis pela liberação de SPMs cruciais para a resolução da inflamação, através
4 de um processo coordenado e ativo que visa restaurar a função e a homeostase
5 tecidual (SERHAN, 2014).

6 **1.2 Dor**

7 A dor, um dos cinco sinais cardinais da inflamação, é um sintoma presente em
8 diversas doenças e é conhecida como um problema de saúde internacional, devido à
9 alta procura por atendimento médico. Definida como experiência sensitiva e emocional
10 desagradável, associada a uma lesão tecidual real ou potencial, a dor pode ser
11 descrita como hiperalgesia, quando há aumento da sensação dolorosa a um estímulo
12 considerado doloroso com precedentes, ou alodinia, quando há sensação dolorosa
13 em resposta a um estímulo não doloroso (IASP, 2012; VERRI et al., 2006).

14 O componente fisiológico da dor é chamado nocicepção, que é o mecanismo
15 pelo qual os estímulos periféricos são transmitidos ao SNC (através da percepção dos
16 estímulos nocivos), e consiste dos processos de transdução, transmissão e
17 modulação de sinais neurais gerados em resposta a um estímulo nocivo externo
18 (DINAKAR; STILLMAN, 2016). O neurônio pseudounipolar tem seu corpo celular
19 presente dentro do gânglio da raiz dorsal e possui prolongamentos em direção a
20 periferia e, prolongamentos em direção a medula espinal. Na periferia há a percepção
21 de estímulos periféricos que desencadeiam a ativação do nociceptor e o
22 encaminhamento dessa informação até o corno da raiz dorsal, onde ocorre a sinapse
23 com neurônios de segunda ordem, e a transmissão do sinal até o córtex
24 somatosensorial para que ocorra a interpretação do estímulo (BAJWA; AL KHALILI,
25 2022). De forma simplificada, podem ser observados como uma cadeia de três-
26 neurônios, com o neurônio de primeira ordem originado na periferia e projetando-se
27 para a medula espinhal, o neurônio de segunda ordem ascende pela medula espinhal
28 e o neurônio de terceira ordem que se projeta para o córtex cerebral (BAJWA; AL
29 KHALILI, 2022; DINAKAR; STILLMAN, 2016).

30 O corpo humano possui diferentes tipos de neurônios sensoriais e nociceptores
31 dotados de receptores e canais iônicos que possibilitam a detecção de estímulos,
32 como por exemplo, através da ativação de fibras aferentes primárias não mielinizadas

1 (fibras C) e mielinizadas (fibras A δ) e uma vez sensibilizados podem acarretar em uma
2 resposta aos estímulos e transmitir esta informação para a medula espinal (BARON;
3 BINDER; WASNER, 2010; ST. JOHN SMITH, 2018). Canais iônicos também sofrem
4 alterações após ativação neuronal (BARON; BINDER; WASNER, 2010). Nos
5 neurônios, canais iônicos como, por exemplo, o receptor de potencial transitório
6 vanilóide 1 (TRPV1) são ativados e isso permite o influxo de cálcio para o terminal
7 pré-sináptico contribuindo para excitabilidade da membrana dos nervos nociceptivos
8 (BARON; BINDER; WASNER, 2010; HUANG et al., 2021). O TRPV1 é amplamente
9 expresso no cérebro em nociceptores de fibra C no gânglio da raiz dorsal (DRG) e sua
10 hiperativação pode facilitar a inflamação (HUANG et al., 2021; PARK et al., 2011).

11 As respostas inflamatórias no sistema nervoso periférico e central
12 desempenham papéis importantes no desenvolvimento e persistência de muitos
13 estados patológicos de dor, funcionando como um dispositivo de alerta para possíveis
14 perigos (FATTORI et al., 2020). O estresse oxidativo é um componente importante da
15 dor (LOURENCO-GONZALEZ et al., 2019). Evidências demonstram que a injeção de
16 um doador de ânion superóxido como o KO₂, induz respostas nociceptivas e
17 inflamatórias variadas envolvidas não apenas na iniciação, mas também na
18 persistência da dor patológica, ativando direta e indiretamente os neurônios sensoriais
19 nociceptivos (MAIOLI et al., 2015).

20 **1.3 Estresse Oxidativo**

21 O organismo possui diversos mecanismos capazes de manter a concentração
22 de espécies reativas de oxigênio (ERO) dentro de limites fisiológicos. O desequilíbrio
23 entre o aumento de espécies reativas e a diminuição de defesas antioxidantes
24 resultam no estresse oxidativo (CUMPSTEY; FEELISCH, 2017).

25 Um aumento de ERO tem sido associado a várias condições, incluindo o
26 processamento da dor e da inflamação (FATTORI et al., 2015). Sendo assim, níveis
27 elevados de estresse oxidativo durante a resposta inflamatória também contribuem
28 para a nocicepção. A liberação de grandes quantidades do ânion superóxido (O₂⁻), a
29 partir do chamado “*Burst*” respiratório por fagócitos, é um importante mecanismo de
30 morte de patógenos e que também leva ao dano endotelial (GUZIK; KORBUT;
31 ADAMEK-GUZIK, 2003). Como resultado, há aumento da permeabilidade vascular,
32 bem como morte celular, por exemplo, através da degranulação de neutrófilos, os

1 quais possuem enzimas que têm a função de produzir radicais livres para a destruição
2 de patógenos (GUZIK; KORBUT; ADAMEK-GUZIK, 2003).

3 A principal fonte de ERO é o sistema NADPH oxidase, presente em todos os
4 tipos de células participantes na inflamação, como por exemplo, leucócitos e células
5 endoteliais (BELAMBRI et al., 2018; GUZIK; KORBUT; ADAMEK-GUZIK, 2003). O
6 ânion superóxido é a primeira ERO a ser gerada pela NADPH oxidase e sua regulação
7 se dá por meio da enzima superóxido dismutase (SOD), sendo uma forma comum de
8 ERO que pode gerar a nocicepção através da ativação da via de sinalização do NF-
9 κ B e consequente aumento de mediadores inflamatórios, além de estimular a
10 produção de citocinas, contribuindo para a dor e a inflamação (GLOIRE; PIETTE,
11 2009; SERAFIM et al., 2015; WANG et al., 2004).

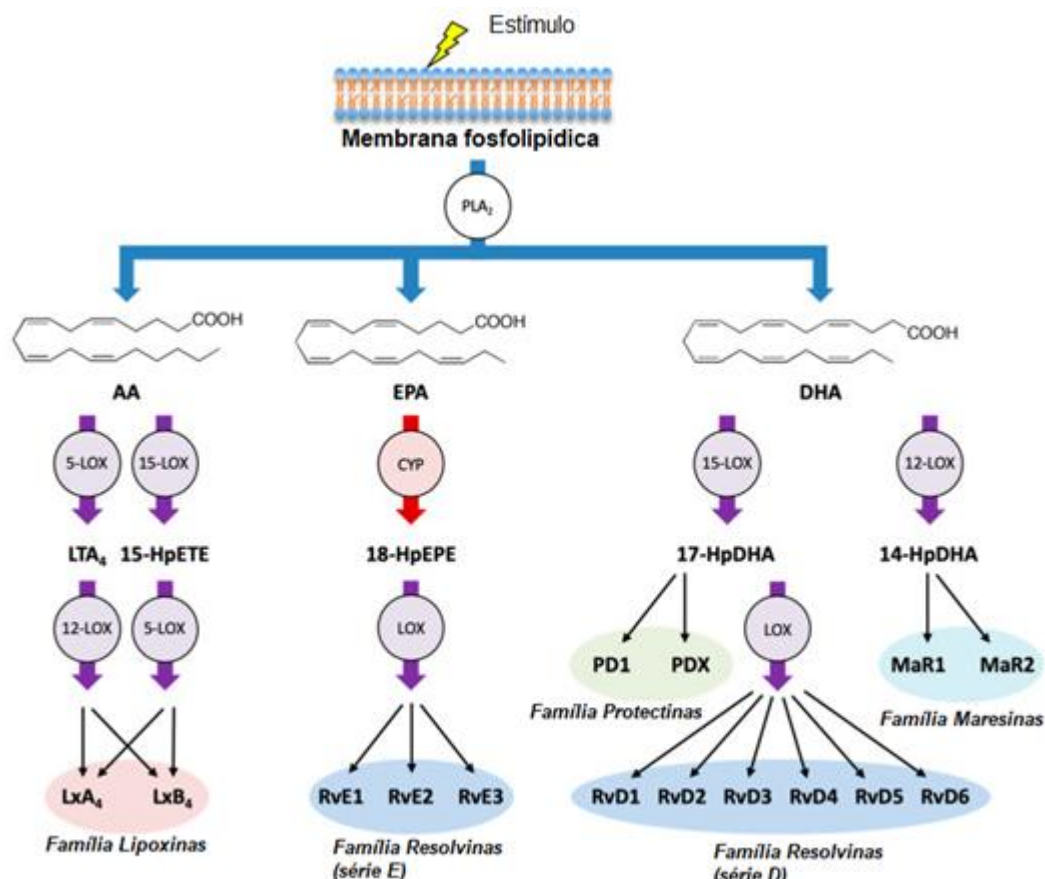
12 Sob condições fisiológicas, o organismo possui mecanismos antioxidantes
13 endógenos para controlar a produção de oxidantes (MAIOLI et al., 2015). Porém,
14 durante a inflamação, citocinas ativam e recrutam neutrófilos e monócitos, que por sua
15 vez produzem quantidades exacerbadas de ânion superóxido, desencadeando vias
16 de sinalização que contribuem para a sua própria produção, o que implica diretamente
17 na indução da dor e inflamação (PINHO-RIBEIRO et al., 2016).

18 O KO_2 é um doador de ânion superóxido e sua administração induz inflamação
19 e dor. Os mecanismos nociceptivos do KO_2 envolvem a contribuição da inflamação
20 periférica, incluindo o aumento da permeabilidade vascular, aumento do recrutamento
21 de neutrófilos e a produção de mediadores pró-inflamatórios que sensibilizam o
22 neurônio. Contudo, o KO_2 também ativa diretamente os neurônios nociceptivos
23 contribuindo para a dor (MANCHOPE et al., 2016).

24 **1.4 Maresina-2**

25 Por anos, referiam-se a resolução do processo inflamatório como o
26 desaparecimento dos neutrófilos no tecido, considerando uma abordagem passiva
27 onde era fundamental a contenção do estímulo inicial e a dissipação dos sinais pró-
28 inflamatórios (LEVY; SERHAN, 2014). Apesar disso, evidências demonstraram que a
29 resolução da inflamação é um processo ativo, rigidamente regulado por moléculas
30 derivadas de ácido graxo ômega 3 como o ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido
31 docosaexaenóico (DHA), e ômega 6 como o ácido araquidônico (AA), os chamados
32 mediadores lipídicos pró-resolução especializados (SPMs) (Fig.1) como é o caso da

1 Maresina 2 (MaR2) (CHIANG; SERHA, 2020; DENG et al., 2014). Os SPMs
 2 orquestram o processo de resolução da inflamação com eventos celulares
 3 específicos, detêm capacidade de parar a infiltração e ativação de neutrófilos,
 4 induzem atividade fagocítica de macrófagos para células apoptóticas e micróbios,
 5 eliminam leucócitos de superfícies mucosas e apresentam ações antimicrobianas
 6 aprimoradas na defesa do hospedeiro, retornando a homeostase (ARNARDOTTIR et
 7 al., 2014). Ademais, a redução do recrutamento de neutrófilos para o foco inflamatório,
 8 bem como a retirada dos neutrófilos da superfície endotelial é imprescindível para a
 9 fase resolutiva (ORTEGA-GÓMEZ; PERRETTI; SOEHNLEIN, 2013; SERHAN, 2014).
 10
 11 **Figura 1** - Vias biossintéticas dos mediadores lipídicos pró-resolução especializados
 12 (SPMs).



13

14 **Fonte:** Adaptado de Yasukawa et al., 2020.

15

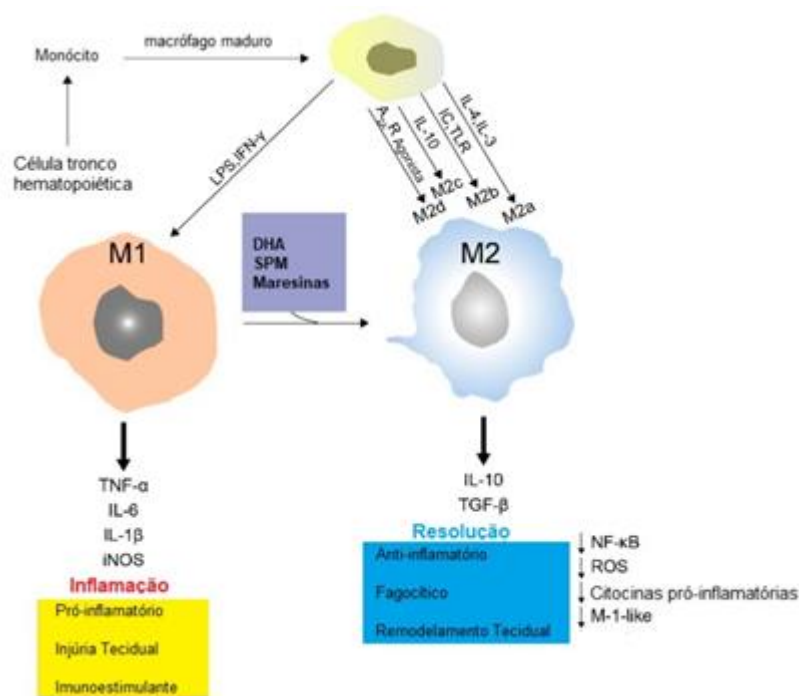
16 Este novo gênero de mediadores lipídicos é derivado da transformação dos
 17 ácidos graxos essenciais do ômega-3 EPA e DHA em mediadores lipídicos pró-
 18 resolução – subdivididos nas famílias das resolvinas, protectinas e maresinas

1 (SERHAN, 2014). Os SPMs operam na resolução do processo inflamatório com ações
 2 de pró-resolução estimulando a liberação de óxido nítrico endotelial e prostaciclina e
 3 aumentando a fagocitose de macrófagos, incluindo eferocitose, depuração microbiana
 4 e efluxo dos leucócitos para os linfonodos, mas também desempenham importante
 5 papel na defesa do hospedeiro, manutenção da dor e remodelamento tecidual (LEVY;
 6 SERHAN, 2014; SERHAN, 2014).

7 A MaR2 é um mediador lipídico produzido por macrófagos a partir do DHA
 8 (DALLI et al., 2013; DENG et al., 2014). Os macrófagos exibem diferentes fenótipos
 9 categorizados como fenótipo M1 com funções pró-inflamatórias e microbicidas; ou
 10 fenótipo M2 que medeiam funções de reparo tecidual, porém, os mecanismos das
 11 alterações fenotípicas ainda não foram totalmente estabelecidos (Fig. 2). Estudos
 12 recentes apontam as Maresinas como uma nova classe dos SPMs que ajudam a
 13 resolver o processo inflamatório através do aumento da fagocitose por macrófagos e
 14 a mudança da liberação de citocinas para os fenótipos anti-inflamatórios M2,
 15 regulando negativamente as citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6 e TNF- α
 16 (HWANG et al., 2019; SERHAN, 2017).

17

18 **Figura 2 - Polarização M1 e M2 de macrófagos**



19

20 **Fonte:** Adaptado de HWANG et al., 2019.

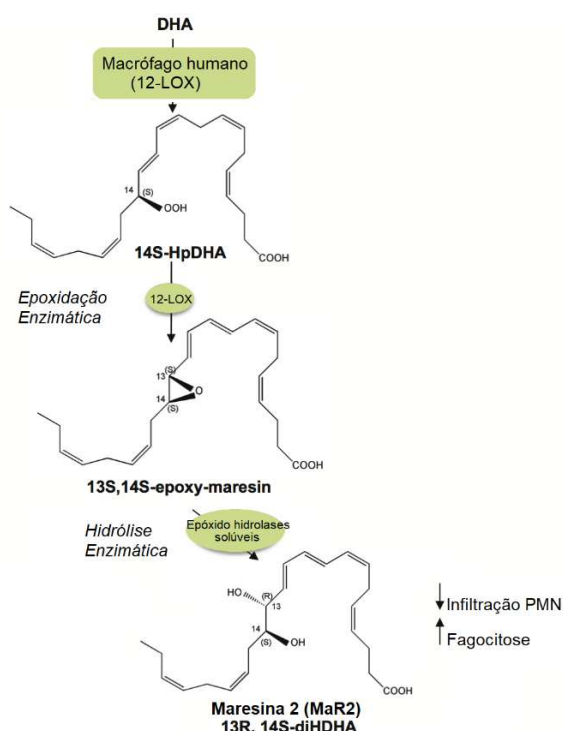
21

22 Sendo um membro da quarta família de SPMs derivados do DHA, a MaR2 tem

1 sua biossíntese (Fig. 3) via 12-lipoxigenase humana (12- LOX) a partir do ômega 3
 2 por macrófagos, seguido de epoxidação do intermediário 14 hidroperoxi que é
 3 subsequentemente convertido em 13S,14S-epoxi-maresina convertido em novo
 4 produto macrófago bioativo (13R, 14Sdiidroxi-4Z, 7Z, 9E, 11E, 16Z, 19Z-ácido
 5 hexaenóico) evidenciado de MaR2 (DALLI et al., 2013; DENG et al., 2014; HWANG et
 6 al., 2019).

7

8 **Figura 3 – Biossíntese da MaR2**



9

10 **Fonte:** Adaptado de Deng *et al.*, 2014.

11

12 No entanto, o único efeito que foi demonstrado sobre as atividades biológicas
 13 da MaR2 evidenciou que essa molécula reduz o recrutamento de leucócitos induzido
 14 por zimosan e a fagocitose dessas moléculas por macrófagos (DENG et al., 2014).
 15 Em relação à dor, já existem artigos que outros lipídios pró-resolução tem efeito
 16 analgésico e que em parte o efeito é neuronal, via receptores acoplados a proteína G,
 17 ou por efeitos independentes do receptor através de modulação alostérica em canais
 18 iônicos como o TRPV1, por exemplo (FATTORI et al., 2018; PARK, 2015; PARK et
 19 al., 2011; SERHAN et al., 2012).

20 De fato, foi demonstrado que a MaR2 reduz a ativação neuronal dependente
 21 de TRPV1 e TRPA1 (Fattori *et al.*, submetido ao Neuropharmacology

1 (NEUROPHARM-D-22-00210).

2 Sabe-se que ROS ativam TRPV1 e por isso ativam neurônios nociceptivos
3 (WESTLUND et al., 2010). Apesar disso, não existem estudos investigando se lipídios
4 pró-resolução como a MaR2, inibem a dor causada por ROS.

1 2 OBJETIVOS

2 2.1 OBJETIVO GERAL

3 Avaliar o efeito analgésico e anti-inflamatório da MaR2 na dor
4 inflamatória induzida pelo superóxido de potássio (KO_2), um doador de ânion
5 superóxido.

6 2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

7 Avaliar o efeito da MaR2 nos seguintes parâmetros:

- 8
- 9 • Hiperalgisia mecânica;
 - 10 • Hiperalgisia térmica;
 - 11 • Dor manifesta induzida pelo KO_2 ;
 - 12 • Teste de distribuição de peso nas patas traseiras;
 - 13 • Recrutamento leucocitário para tecido plantar.

1

REFERÊNCIAS

- 2 ABBAS, A. K.; KUMAR, V.; FAUSTO, N. **Robbins & Cotran - Patologia**. [s.l: s.n.].
- 3 ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunidade celular e molecular**. [s.l:
4 s.n.].
- 5 ABDULNOUR, R. E. et al. Maresin 1 biosynthesis during platelet-neutrophil
6 interactions is organ-protective. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 111, n. 46, p. 16526–
7 16531, 2014.
- 8 ABUL K. ABBAS, A. H. L. **Robbins Patologia Básica**. [s.l: s.n.].
- 9 ARNARDOTTIR, H. H. et al. Aging Delays Resolution of Acute Inflammation in Mice:
10 Reprogramming the Host Response with Novel Nano-Proresolving Medicines. **The**
11 **Journal of Immunology**, v. 193, n. 8, p. 4235–4244, 2014.
- 12 BAJWA, H.; AL KHALILI, Y. Physiology, Vibratory Sense. In: Treasure Island (FL):
13 [s.n.].
- 14 BARON, R.; BINDER, A.; WASNER, G. Neuropathic pain: Diagnosis,
15 pathophysiological mechanisms, and treatment. **The Lancet Neurology**, v. 9, n. 8, p.
16 807–819, 2010.
- 17 BELAMBRI, S. A. et al. NADPH oxidase activation in neutrophils: Role of the
18 phosphorylation of its subunits. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 48, n.
19 May, p. 1–9, 2018.
- 20 BORISH, L. C.; STEINKE, J. W. 2. Cytokines and chemokines. **Journal of Allergy**
21 **and Clinical Immunology**, v. 111, n. 2 SUPPL. 2, p. 460–475, 2003.
- 22 CHIANG, N.; SERHA, C. N. Specialized pro-resolving mediator network: an update on
23 production and actions. **Essays in biochemistry**, v. 64, n. 3, p. 443–462, 2020.
- 24 CUMPSTEY, A.; FEELISCH, M. Free Radicals in Inflammation. **Inflammation - From**
25 **Molecular and Cellular Mechanisms to the Clinic**, p. 695–726, 2017.
- 26 DALLI, J. et al. The novel 13S,14S-epoxy-maresin is converted by human
27 macrophages to maresin 1 (MaR1), inhibits leukotriene A4 hydrolase (LTA4H), and
28 shifts macrophage phenotype. **FASEB J**, v. 27, n. 7, p. 2573–2583, 2013.
- 29 DALLI, J.; SERHAN, C. N. Specific lipid mediator signatures of human phagocytes:
30 microparticles stimulate macrophage efferocytosis and pro-resolving mediators.
31 **Blood**, v. 120, n. 15, p. e60--72, 2012.
- 32 DENG, B. et al. Maresin biosynthesis and identification of maresin 2, a new anti-
33 inflammatory and pro-resolving mediator from human macrophages. **PLoS ONE**, v. 9,
34 n. 7, 2014.
- 35 DESEURE, K.; HANS, G. H. Differential drug effects on spontaneous and evoked pain
36 behavior in a model of trigeminal neuropathic pain. **Journal of Pain Research**, v. 10,

- 1 p. 279–286, 2017.
- 2 DINAKAR, P.; STILLMAN, A. M. Pathogenesis of Pain. **Seminars in Pediatric**
3 **Neurology**, v. 23, n. 3, p. 201–208, 2016.
- 4 FATTORI, V. et al. Curcumin inhibits superoxide anion-induced pain-like behavior and
5 leukocyte recruitment by increasing Nrf2 expression and reducing NF- κ B activation.
6 **Inflammation Research**, v. 64, n. 12, p. 993–1003, 2015.
- 7 FATTORI, V. et al. The specialized pro-resolving lipid mediator Maresin-1 reduces
8 inflammatory pain with a long-lasting analgesic effect. **British journal of**
9 **pharmacology**, 2018.
- 10 FATTORI, V. et al. Diosmin Treats Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Pain and
11 Peritonitis by Blocking NF- κ B Activation in Mice. **Journal of Natural Products**, v. 83,
12 n. 4, 2020a.
- 13 FATTORI, V. et al. Diosmin Treats Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Pain and
14 Peritonitis by Blocking NF- κ B Activation in Mice. **Journal of natural products**, v.
15 83, n. 4, p. 1018–1026, 2020b.
- 16 FATTORI, V. et al. **Specialized pro-resolving lipid mediators: A new class of non-**
17 **immunosuppressive and non-opioid analgesic drugs** **Pharmacological**
18 **Research** Academic Press, , jan. 2020c.
- 19 FILHO, G. B. **Bogliolo Patologia**. [s.l.: s.n.]. v. 53
- 20 GERMOLEC, D. R. et al. Markers of inflammation. **Methods in Molecular Biology**, v.
21 1803, p. 57–79, 2018.
- 22 GLOIRE, G.; PIETTE, J. Redox regulation of nuclear post-translational modifications
23 during NF- κ B activation. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 11, n. 9, p. 2209–
24 2222, 2009.
- 25 GUZIK, T. J.; KORBUT, R.; ADAMEK-GUZIK, T. Nitric oxide and superoxide in
26 inflammation and immune regulation. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v.
27 54, n. 4, p. 469–487, 2003.
- 28 HARGREAVES, K. et al. A new and sensitive method for measuring thermal
29 nociception. **Pain**, v. 32, p. 77–88, 1988.
- 30 HUANG, T. et al. The Synergistic Effect of TRPV1 on Oxidative Stress-Induced
31 Autophagy and Apoptosis in Microglia. **Analytical Cellular Pathology**, v. 2021, 2021.
- 32 HWANG, S. M. et al. The role of maresins in inflammatory pain: Function of
33 macrophages in wound regeneration. **International Journal of Molecular Sciences**,
34 v. 20, n. 23, 2019.
- 35 IASP. **IASP Taxonomy - IASP**, 2012.
- 36 LABOUREYRAS, E. et al. Long-term pain vulnerability after surgery in rats: prevention
37 by nefopam, an analgesic with antihyperalgesic properties. **Anesth Analg**, v. 109, n.

- 1 2, p. 623–631, 2009.
- 2 LEE, H. I.; PARK, B. R.; CHUN, S. W. Reactive oxygen species increase neuronal
3 excitability via activation of nonspecific cation channel in rat medullary dorsal horn
4 neurons. **Korean J Physiol Pharmacol**, v. 21, n. 4, p. 371–376, 2017.
- 5 LEVY, B. D.; SERHAN, C. N. **Resolution and Regulation of Inflammation**. [s.l.]
6 Elsevier Inc., 2014.
- 7 LOURENCO-GONZALEZ, Y. et al. Repurposing of the nootropic drug vinpocetine as
8 an analgesic and anti-inflammatory agent: Evidence in a mouse model of superoxide
9 anion-triggered inflammation. **Mediators of Inflammation**, v. 2019, 2019.
- 10 MADERNA, P.; GODSON, C. Lipoxins: revolutionary road. **Br J Pharmacol**, v. 158, n.
11 4, p. 947–959, 2009.
- 12 MAIOLI, N. A. A. et al. The superoxide anion donor, potassium superoxide, induces
13 pain and inflammation in mice through production of reactive oxygen species and
14 cyclooxygenase-2. **Braz J Med Biol Res**, v. 48, n. 4, p. 321–331, 2015.
- 15 MANCHOPE, M. F. et al. Naringenin Inhibits Superoxide Anion-Induced Inflammatory
16 Pain: Role of Oxidative Stress, Cytokines, Nrf-2 and the NO-cGMP-PKG-
17 KATPChannel Signaling Pathway. **PLoS One**, v. 11, n. 4, p. e0153015–e0153015,
18 2016.
- 19 MARTINI, A. C. et al. Lipoxin A4 inhibits microglial activation and reduces
20 neuroinflammation and neuropathic pain after spinal cord hemisection. **J**
21 **Neuroinflammation**, v. 13, n. 1, p. 75, 2016.
- 22 MATZINGER, P. The danger model: A renewed sense of self. **Science**, v. 296, n.
23 5566, p. 301–305, 2002.
- 24 MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. A. Decoding the patterns of self and nonself by the
25 innate immune system. **Science**, v. 296, n. 5566, p. 298–300, 2002.
- 26 MUSCOLI, C. et al. Superoxide-mediated nitration of spinal manganese superoxide
27 dismutase: a novel pathway in N-methyl-D-aspartate-mediated hyperalgesia. **Pain**, v.
28 111, n. 1–2, p. 96–103, 2004.
- 29 NDENGELE, M. M. et al. Cyclooxygenases 1 and 2 contribute to peroxynitrite-
30 mediated inflammatory pain hypersensitivity. **FASEB J**, v. 22, n. 9, p. 3154–3164,
31 2008.
- 32 ORTEGA-GÓMEZ, A.; PERRETTI, M.; SOEHNLEIN, O. Resolution of inflammation:
33 An integrated view. **EMBO Molecular Medicine**, v. 5, n. 5, p. 661–674, 2013.
- 34 PARK, C. K. et al. Resolving TRPV1- and TNF- α -mediated spinal cord synaptic
35 plasticity and inflammatory pain with neuroprotectin D1. **Journal of Neuroscience**, v.
36 31, n. 42, p. 15072–15085, 2011a.
- 37 PARK, C. K. et al. Resolvin D2 is a potent endogenous inhibitor for transient receptor
38 potential subtype V1/A1, inflammatory pain, and spinal cord synaptic plasticity in mice:

- 1 distinct roles of resolvin D1, D2, and E1. **J Neurosci**, v. 31, n. 50, p. 18433–18438,
2 2011b.
- 3 PARK, C. K. Maresin 1 Inhibits TRPV1 in Temporomandibular Joint-Related
4 Trigeminal Nociceptive Neurons and TMJ Inflammation-Induced Synaptic Plasticity in
5 the Trigeminal Nucleus. **Mediators Inflamm**, v. 2015, p. 275126, 2015.
- 6 PINHO-RIBEIRO, F. A. et al. Protective effects of the flavonoid hesperidin methyl
7 chalcone in inflammation and pain in mice: role of TRPV1, oxidative stress, cytokines
8 and NF- κ B. **Chemico-biological interactions**, v. 228, p. 88–99, fev. 2015.
- 9 PINHO-RIBEIRO, F. A. et al. Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits superoxide anion-
10 induced pain and inflammation in the paw skin and spinal cord by targeting NF-kappaB
11 and oxidative stress. **Inflammopharmacology**, v. 24, n. 2–3, p. 97–107, 2016.
- 12 PRADEU, T.; COOPER, E. L. The danger theory: 20 years later. **Frontiers in**
13 **Immunology**, v. 3, n. SEP, p. 1–10, 2012.
- 14 SAPPINGTON, R. M.; CALKINS, D. J. Translocation with Elevated Hydrostatic
15 Pressure. v. 49, n. 7, p. 3004–3017, 2014.
- 16 SERAFIM, K. G. G. et al. Bosentan, a mixed endothelin receptor antagonist, inhibits
17 superoxide anion-induced pain and inflammation in mice. **Naunyn-Schmiedeberg's**
18 **Archives of Pharmacology**, v. 388, n. 11, p. 1211–1221, 2015.
- 19 SERHAN, C. N. et al. Macrophage proresolving mediator maresin 1 stimulates tissue
20 regeneration and controls pain. **The FASEB Journal**, 2012.
- 21 SERHAN, C. N. Novel Pro-Resolving Lipid Mediators in Inflammation Are Leads for
22 Resolution Physiology. **Nature**, v. 510, n. 7503, p. 92–101, 2014a.
- 23 SERHAN, C. N. **Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution**
24 **physiology** Nature Publishing Group, , 2014b.
- 25 SERHAN, C. N. Treating inflammation and infection in the 21st century: New hints from
26 decoding resolution mediators and mechanisms. **FASEB Journal**, v. 31, n. 4, p. 1273–
27 1288, 2017.
- 28 ST. JOHN SMITH, E. Advances in understanding nociception and neuropathic pain.
29 **Journal of Neurology**, v. 265, n. 2, p. 231–238, 2018.
- 30 SVENSSON, C. I.; ZATTONI, M.; SERHAN, C. N. Lipoxins and aspirin-triggered lipoxin
31 inhibit inflammatory pain processing. **Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 2,
32 p. 245–252, 2007.
- 33 VERRI, W. A. et al. **Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: Targets**
34 **for analgesic drug development?** **Pharmacology and Therapeutics** Pharmacol
35 Ther, , 2006.
- 36 WANG, Z. Q. et al. A newly identified role for superoxide in inflammatory pain. **J**
37 **Pharmacol Exp Ther**, v. 309, n. 3, p. 869–878, 2004.

- 1 WESTLUND, K. N. et al. Impact of central and peripheral TRPV1 and ROS levels on
2 proinflammatory mediators and nociceptive behavior. **Molecular Pain**, v. 6, p. 1–13,
3 2010.
- 4 YAMACITA-BORIN, F. Y. et al. Superoxide anion-induced pain and inflammation
5 depends on TNFalpha/TNFR1 signaling in mice. **Neurosci Lett**, v. 605, p. 53–58,
6 2015.
- 7 ZANINELLI, T. H.; FATTORI, V.; VERRI, W. A. J. Harnessing Inflammation Resolution
8 in Arthritis: Current Understanding of Specialized Pro-resolving Lipid Mediators'
9 Contribution to Arthritis Physiopathology and Future Perspectives. **Frontiers in**
10 **Physiology**, v. 0, p. 1444, 2021.

1 **3 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO**

2 O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Dor, Inflamação,
3 Neuropatia e Câncer, da Universidade Estadual de Londrina e segue as normas da
4 revista (Inflammation Research). Os resultados parciais estão descritos no artigo
5 intitulado “Maresin 2 reduces superoxide anion-induced pain and inflammation in
6 mice.”

1 **Maresin 2 reduces superoxide anion-initiated pain and inflammation in mice**

2 Beatriz H. S. Bianchini¹, Marília F. Manchope¹, Anelise Franciosi¹, Naiara A. Artero¹,
3 Tiago H. Zaninelli¹, Mariana M. Bertozzi¹, Geovana M. Cebinelli¹, Rubia Casagrande²
4 and Waldiceu A. Verri Jr.^{1,*}

5

6 ¹Departamento de Ciências Patológicas, Universidade Estadual de Londrina-UEL,
7 Rod. Celso Garcia Cid, km 380, PR 445, 86057-970, Cx. Postal 10.011, Londrina,
8 Paraná, Brazil.

9 ²Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Londrina-UEL,
10 Avenida Robert Koch, 60, Hospital Universitário, 86038-350, Londrina, Paraná, Brazil.

11

12 *Autor to whom correspondence should be addressed. Waldiceu A. Verri Jr.
13 Departamento de Ciências Patológicas, Universidade Estadual de Londrina-UEL, Rod.
14 Celso Garcia Cid, km 380, PR 445, 86057-970, Cx. Postal 10.011, Londrina, Paraná,
15 Brazil. Fax: +55 43 33714387, Tel: +55 43 33714979, E-mail address:
16 waldiceujr@yahoo.com.br; waverri@uel.br.

1 Abstract

2 Reactive oxygen species (ROS) induce inflammation and pain by triggering the release
3 of inflammatory mediator and sensitizing ion channels expressed by nociceptive neurons, such
4 as TRPV1 (transient receptor potential vanilloid type 1). Specialized pro-resolving mediators
5 (SPMs) have analgesic and anti-inflammatory effects by acting via their own receptors or even
6 by allosteric inhibition of, for instance, TRPV1 channels. Despite of that, to our knowledge, it
7 remains unknown an SPMs inhibits pain and inflammation initiated by ROS. In the present
8 study, we evaluated the analgesic and anti-inflammatory effect of maresin 2 (MaR2) in
9 potassium superoxide (KO₂, a superoxide anion donor) initiated inflammation. To this end,
10 male Swiss mice (20-25g, n=6) were treated with 4 doses of MaR2 [10, 30, 100 or
11 300pg/animal, intraperitoneal (ip)], 30 minutes before the inflammatory stimulus [30 μg KO₂,
12 intraplantar (i.pl.)]. Mechanical hyperalgesia was determined with an electronic version of von
13 Frey filaments at 0 (baseline), 0.5, 1, 3, 5, and 7h after stimulation. This dose-response
14 experiment allowed to select the best dose of MaR2 for further experiments. Thermal
15 hyperalgesia was evaluated using the Hargreaves Test and hot plate heated to 52°C. Non-evoked
16 spontaneous pain was evaluated through the number of abdominal writhings, flinches, and
17 licking time over 20 and 30 minutes, respectively. The unbalanced static weight bearing was
18 also used as a non-evoked behavioral test. Leukocyte recruitment was determined counting the
19 cells present in the plantar tissue in H&E stained slices. MaR2 reduced overt pain-like behavior
20 and evoked pain behaviors as well as the number of cells infiltrated in the paw skin, which were
21 induced by KO₂ stimulation. In conclusion, MaR2 has analgesic and anti-inflammatory effects
22 in superoxide anion-initiated inflammation.

23

24 **Key-words:** Specialized pro-resolving mediators; ROS; Inflammation; Pain.

1 **1. Introduction**

2
3 Inflammation is a protective response developed with the formation of the so-called
4 cardinal signs, which are heat, redness, swelling, pain, and loss of function. Those clinical
5 manifestations involve vascular and cellular phenomena, which culminates in the recruitment
6 of leukocytes with the goal of protecting our body against injurious stimuli [1]. In this process,
7 an increase in reactive oxygen species (ROS) are present in several conditions, including pain
8 processing and inflammation [2]. ROS induces inflammation and pain by triggering the release
9 of inflammatory mediators and sensitizing neurons, and activating ion channels, such as
10 TRPV1 (transient receptor potential vanilloid type 1), widely expressed in C-fiber nociceptors
11 whose cellular bodies reside in the dorsal root ganglion (DRG) and innervate tissues such as
12 the skin [3–6]. Upon mechanical and heat stimulation, this voltage-gated calcium channel
13 opens, allowing calcium influx to the presynaptic terminal contributing to pain and
14 inflammation [3,4,6,7]. The superoxide anion is the first ROS to be generated by NADPH
15 oxidase in response to injuries and high levels during the inflammatory response contributes to
16 nociception [2,8]. KO_2 , a superoxide anion donor, drives nociception and generates pain by
17 some mechanisms, in part by inducing peripheral inflammation, but also by activating
18 nociceptor neuron [4].

19 Specialized pro-resolving mediators (SPMs) promote the resolution of inflammation
20 through an active process, tightly regulated by mediators derived from omega-3 fatty acid
21 molecules, such as eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid (DHA) [3]. Maresins such
22 as MaR1 are lipid mediator biosynthesized by macrophages from DHA and directly involved
23 in the resolution of the inflammatory process. Among its effects, increases phagocytosis by
24 macrophages and alters the profile of cytokine released by M1 to M2 anti-inflammatory
25 phenotypes [4,9]. In addition, it reduces neutrophil recruitment and promotes the removal of
26 neutrophils from the endothelial surface [10,11]. Currently, the known functions of MaR2 are
27 the inhibition of neutrophil recruitment in zymosan peritonitis and enhancement of macrophage
28 phagocytosis of zymosan particles [12].

29 ROS are known to activate TRPV1 and therefore activate nociceptive neurons [13].
30 SPMs have analgesic and anti-inflammatory effects by inhibiting ion channels activation, such
31 as, TRPV1. This effect may occur via SPM receptors and intracellular inhibition of ion
32 channels or even by allosteric inhibition [5]. Despite this, there are no studies investigating
33 whether SPMs, such as MaR2, inhibit ROS-initiated pain. Therefore, we investigated the effect
34 of MaR2 in superoxide anion-initiated pain and inflammation in mice.

1

2 **2. Material and Methods**

3

4 **2.1. Experimental Procedures**

5

6 KO_2 was administered intraplantar (i.pl.) at a dose of 30 $\mu\text{g}/\text{paw}$. Control animals
7 received isotonic saline (i.pl.). To evaluate the treatment with MaR2, a dose-response curve
8 (10, 30, 100 and 300 pg/animal , i.pl.) was performed and the animals were treated 30 minutes
9 before the stimulus administration. After stimulation with KO_2 , mechanical hyperalgesia were
10 evaluated at 0 (baseline), 0.5, 1, 3, 5 and 7 hours after stimulus. The dose of 100 pg/animal of
11 MaR2 was selected for the subsequent experiments. The dose and treatment time protocols used
12 were previously standardized in the laboratory [14]. Thermal hyperalgesia was evaluated using
13 the Hargreaves Test at times 0 (baseline), 1, 3 and 7h and hot plate heated to 52°C at times 0
14 (baseline), 0.5, 1, 3, 5 and 7h after the stimulus [15,16]. Overt pain was assessed by the number
15 of abdominal writhings, paw flips (flinches) and licking time expressed cumulatively over 20
16 and 30 minutes, respectively. Unbalanced weight distribution in the hind legs was determined
17 using the static weight bearing apparatus at times 0 (baseline) and 3h after stimulation [17].
18 Leukocyte recruitment was determined from the count of cells present in the plantar tissue of
19 the animals 7h after stimulation [15].

20 **2.2. Animals**

21 Male Swiss mice (25-30 g), from Universidade Estadual de Londrina (Londrina,
22 Paraná, Brazil) were used in this study. All mice were housed in standard clear cages with
23 free access to food and water, light/dark cycle of 12/12h and temperature of $21^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$. The
24 animals were divided according to the experimental groups (maximum of 12 animals per cage)
25 and adapted to the conditions and environment for at least 1h before behavior testing. Animal
26 care and handling procedures were approved by Universidade Estadual de Londrina Ethics
27 Committee (process number 003.2021) and were in accordance with the International
28 Association for Study of Pain (IASP) guidelines. All efforts were made to minimize the number
29 of animals used and their suffering.

30

31 **2.3. Chemicals and Drugs**

32 Materials were obtained from the following sources: Maresin 2 (13R,14S-dihydroxy-
33 4Z,7Z,9E,11E,16Z,19Z-docosahexaenoic acid, Cayman Chemicals, Ann Arbor, Michigan,
34 USA), superoxide anion (KO_2) (Alfa Aesar, 96,5%, Ward Hill, MA, USA), and saline (NaCl
35 0,9%; Fresenius Kabi Brazil Ltda. Aquiraz, CE, Brazil).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35

2.4. Evaluation of mechanical hyperalgesia

An electronic version of the increasing pressure test of von Frey filaments in the paw of mice was used to evaluate plantar cutaneous hyperalgesia. In a quiet room, the animals were placed in an acrylic compartments (12 x 10 x 17 cm) with a grid underneath. The test consists of applying an increasing force to the paw of the mice with a manual transducer (electronic aesthesiometer, IITC Life Science, Woodland Hills, CA), fitted with a 0.5mm² polypropylene tip, until a nociceptive reaction characteristic of withdrawal and shaking of the paw. Basal thresholds were determined before intraplantar (i.pl.) injection of the inflammatory stimulus KO₂ (30 µg/paw) or saline. Additional measurements were performed at 0.5, 1, 3, 5 and 7h after stimulus administration. The results are expressed in delta (Δ), and these were calculated by subtracting the values obtained at measurement times 0.5, 1, 3, 5, 7h after the stimulus, from the basal value (T₀) before the stimulus [14].

2.4. Evaluation of thermal hyperalgesia

Thermal hyperalgesia was evaluated using the Hargreaves Test at times 0 (baseline), 1, 3 and 7h and hot plate heated to 52°C at times 0 (baseline), 0.5, 1, 3, 5 and 7h after the stimulus to evaluate the plantar cutaneous thermal hyperalgesia [14–16]. The maximum time allowed for permanence is 20 seconds so that tissue damage does not occur in the mice.

2.4. Evaluation of KO₂-induced overt pain-like behavior (abdominal writhing, flinches and paw licking time)

KO₂ (1 mg/animal) was administered intraperitoneally (i.p.) to animals pretreated with MaR2 (100pg/animal). Each animal was placed in a large glass vat and the intensity of nociceptive behaviors was quantified by counting the total number of writhings that occurred from 0 to 20 min after stimulus injection [17]. The writhing response was considered to be the contraction of the abdominal muscles associated with a stretch of the hind legs. Results were expressed as the total number of abdominal writhing for 20 min. In another set of experiments, the number of paw withdrawal/flicking movements (flinches) and the total paw licking time was determined between 0 and 30 min after injection of KO₂ (30 µg/paw, i.pl.). Results were expressed as total number of flinch and lick time over 30 minutes.

2.5. Evaluation of the right/left paw ratio (Static Weight Bearing)

Changes in paw weight distribution were evaluated using the SWB apparatus (model BIO-SWB-TOUCH-M, Bioseb, France). In a quiet, temperature-controlled room, mice were

1 gently placed into an acrylic chamber, where the animal is comfortably maintained while their
2 hind paws rest on two separate sensor plates. Mice were habituated for at least four consecutive
3 days prior to the behavioral testing. The animal stands and makes a natural adjustment to the
4 degree of pain by adapting weight distribution on the noninjured rear paw, and the value of the
5 weight applied on each sensor is displayed on the LCD screen of the control unit. Mice were
6 tested before (baseline values) and after treatment and stimulus. The results are expressed by
7 right/left paw ratio, which was calculated by using the mean of three measurements at 0
8 (baseline value) and 3h after injection. The investigator were blinded to the treatment [17].

9 **2.6. Histopathological analysis**

10 Plantar tissue was collected 7 hours after KO2 stimulus. Samples were fixed in 10%
11 buffered formaldehyde and processed for paraffin embedding. The sectioned tissues (7 μm)
12 were stained with hematoxylin-eosin (HE) for later examination under an optical microscope
13 (Olympus OX31, Olympus, Japan; original magnification, 100x). The analysis was performed
14 using a clinical score, where neovascularization and inflammatory infiltrate were evaluated,
15 being scored from 0 to 3, demonstrating a degree of tissue degradation according to the
16 increasing level, with 0 for no change and 3 for the most serious change, in which case it could
17 be a significant increase in new vessels and inflammatory infiltrate that damage the tissue. By
18 means of this same staining, it was possible to measure the percentage of inflammatory infiltrate
19 per area, using the Image J software of each group with 6 animals [15].

20 **2.6. Data analysis**

21 Data normality was verified by the Shapiro-Wilk test. For normal data, one-way or two-
22 way ANOVA tests (depending on the variables) followed by Tukey's post-test were used. For
23 data without normal distribution, the non-parametric Kruskal-Wallis test followed by Dunn's
24 test were used. For all analyses, differences were considered significant for $P < 0.05$.

25

1 3. Results

2 3 3.1. MaR2 reduces KO₂-induced mechanical hyperalgesia. 4

5 Firstly, we conducted a dose-response curve of MaR2 to determine the which dose
6 presented a higher analgesic effect using mechanical hyperalgesia test. KO₂ produced an
7 increase in mechanical response intensity when compared to the saline group. The treatment
8 with MaR2 at doses of (100 and 300 pg/animal, i.p.) demonstrated a significant effect in
9 reducing mechanical response intensity at all time points. On the other hand, lower doses were
10 not effective in reduce pain (10 and 30 pg/animal, i.p.) (Fig. 1). Based on these results, the dose
11 of 100 pg/animal of MaR2 was chosen to execute the subsequent tests.

12 3.2. MaR2 reduces KO₂-induced thermal hyperalgesia. 13

14 Next, the effect of MaR2 was tested in KO₂-induced thermal hyperalgesia. Thermal
15 hyperalgesia was first evaluated using a hot plate heated at 52°C. The treatment with MaR2 was
16 effective in reducing thermal hyperalgesia from the first to the fifth hour after stimulation (Fig.
17 2A). Data are expressed in absolute value in seconds.

18 In addition, treatment with MaR2 was also able to reduce thermal hyperalgesia
19 evaluated through the Hargreaves Test up to the seventh hour after stimulation (Fig. 4B). The
20 data are expressed in delta of thermal hyperalgesia intensity.

21 22 3.3. MaR2 reduces the number of abdominal writhing, paw flinches and KO₂- 23 induced licking time. 24

25 In the field of pain, the evaluation of overt pain-like behavior is very important to
26 determine a compound analgesic effect [18]. Thus, we next evaluate whether the treatment with
27 MaR2 decreases KO₂-induced overt pain-like behavior. Animals were treated with MaR2 (100
28 pg/animal, i.p.) before KO₂ injection, (1mg/animal, i.p.) for abdominal writhing determination,
29 or (30µg/paw) for licking time and flinches count. Intraperitoneal stimulation with KO₂
30 significantly increased the number of abdominal writhes when compared to the saline group.
31 Treatment with MaR2 demonstrated a significant effect in relation to the decrease in the number
32 of writhes exhibited by the stimulated mice (Fig. 3A). The intraplantar stimulus with KO₂
33 significantly increased the number of flinches and paw licking time when compared to the saline
34 group. The treatment with MaR2 at dose of 100 pg/animal reduced the number of flinches (Fig.
35 3B) and paw licking time (Fig. 3C) induced by the superoxide anion.

1 **3.4. MaR2 increased the right/left paw ratio.**

2
3 Therefore, to examine pain using a nonreflexive method, we performed the static weight
4 bearing assay and the effect of treatment with MaR2 was investigated. Intraplantar injection of
5 KO₂ (30 μg/paw) induced a reduction in the right/left rear paw ratio, indicating mice distributed
6 their weight toward the noninjured paw (left rear paw) (Fig. 4). The heat map shows the
7 right/left rear paw ratio of each mouse. Treatment with MaR2 increased the right/left paw ratio,
8 demonstrating the analgesic effect in a nonreflexive method of pain measurement.

9 10 **3.5. MaR2 reduces superoxide anion-induced leukocyte recruitment to the paw** 11 **skin.**

12 Next, the effect of MaR2 on leukocyte recruitment was investigated. A
13 histopathological analysis focusing on the dermal region of the hindpaw skin was performed
14 using H&E staining. The result shows that treatment with 100 pg/animal of MaR2 reduced the
15 total leukocyte infiltrate (Fig.5 (A) - (H)).

16 **4. Discussion**

17
18 In this study, we demonstrated that the SPM MaR2 reduced pain initiated by superoxide anion
19 in mice. The treatment with MaR2 reduced overt pain-like behavior, evoked pain, and KO₂-
20 induced leukocyte recruitment. The generation of free radicals is a common process during
21 inflammation [15] and an increase in ROS is directly associated to pain perception [13]. In fact,
22 ROS can generate nociception through the activation of the NF-κB signaling pathway and
23 consequent increase in inflammatory mediators, in addition to stimulating the production of
24 cytokines contributing to pain and inflammation [19,20]. Contemporary therapies are still
25 restricted to drugs that have multiple side effects, limited efficacy, high cost, and in some cases,
26 toxicity [21]. Opioids also represent a current challenge due to the chemical dependency [22].
27 Thus, it is necessary to develop new therapies capable of reducing inflammation and acute pain
28 [21]. SMPs do not activate opioid receptors, but rather act through their own receptors, thus
29 avoiding opioid actions [22,23]. In this context, the use of pro-resolution lipid mediators, such
30 as MaR2, represents a potential therapeutic approach.

31 TRPV1 activation represents an important potential peripheral mechanism initiating the
32 generation of ROS and the inflammatory products [47]. This activation contributes to
33 membrane excitability of nociceptive nerves and its hyperactivation may facilitate
34 inflammation [22,24]. KO₂ itself via the release of superoxide anion can induce calcium influx
35 through anionic channels, inducing neuronal firing in the medullary dorsal horn neurons [24].

1 Thus, molecules with the ability of targeting ROS metabolism and/or inhibit the activation of
2 ionic channels are interesting analgesic approaches [25]. In fact, SPMs such as MaR1 inhibit
3 TRPV1 channel activation and neuroinflammatory activation of astrocytes and microglia
4 [7,24]. Furthermore, MaR1 reduces the activation of NF- κ B and, thus, the production of pro-
5 inflammatory cytokine production [7,21,24]. Interestingly, our group demonstrated that MaR2
6 inhibits capsaicin- and AITC-induced calcium influx in *in vitro* cultured dorsal root ganglia
7 (DRG) neurons, and these molecules are agonists of TRPV1 and TRPA1, respectively
8 (manuscript under review). These data aligned to our findings and indicated that MaR2 might
9 be acting through inhibiting superoxide anion-initiated TRP activation in nociceptor neurons.

10 Pain can be detected as hyperalgesia (when there is increased pain from a stimulus that
11 normally causes pain) or allodynia (when pain is present due to a stimulus that normally does
12 not cause pain)[26]. Martini and contributors (2016)[27] argued that LXA₄ treatment caused
13 significant reductions in the intensity of mechanical pain hypersensitivity induced by spinal
14 cord hemisection. Svensson and contributors (2007)[28] evidenced that intrathecal and the
15 intravenous administration treatment with lipoxin reduces thermal hyperalgesia induced by
16 carrageenan in rats. These data reinforce the equivalent results found in the effects of MaR2
17 treatment on mechanical and thermal hyperalgesia.

18 Mechanisms involved in overt pain may be different from those involved in
19 hyperalgesia models, thus, some experiments were performed to evaluate them[18]. For
20 instance, MaR1 reduces CFA-induced overt pain-like behavior in mice [29]. In our study, MaR2
21 decrease paw flinches, licking time and abdominal writhings induced by KO₂. Furthermore,
22 unilateral peripheral inflammation produces changes in paw weight distribution toward the
23 noninjured paw [30]. Therefore, the kinetic measurement (static weight distribution) was
24 evaluated in our work, and MaR2 was also effective in reducing the unbalanced weight
25 distribution.

26 Leukocyte recruitment is a key marker of inflammation, and contributes to the pain
27 genesis [15]. MaR2 treatment reduced KO₂-induced leukocytes recruitment to the inflamed paw
28 skin. Similarly, Abdulnour and co-authors (2014)[31] report that MaR1 inhibits the infiltration
29 of neutrophils. In addition, Dalli and Serhan (2012)[32] demonstrate that SPMs share similar
30 biological functions, although through different receptors, such as limiting neutrophil
31 infiltration and promoting macrophage phagocytosis. With this background, in this work we
32 seek to evaluate the ability of the lipid mediator MaR2 to reduce pain and inflammation induced
33 by a model of oxidative stress generated by the superoxide anion donor (KO₂). There is limited

1 data on the literature about the activities and mechanisms of action of MaR2. To date, MaR2 is
2 known to inhibit zymosan-triggered recruitment of neutrophils and increased zymosan
3 phagocytosis by macrophages [12]. Unpublished data from our laboratory unveils the analgesic
4 effect of MaR2 in LPS inflammation and upon TRPV1 and TRPA1 agonist administration.
5 However, the present findings demonstrate for the first time that MaR2, or a SPM, can reduce
6 pain and inflammation initiated by a ROS (superoxide anion in this case).

7

8 **5. Conclusion**

9 These data demonstrated that MaR2 inhibits inflammation and pain initiated by free
10 radicals, suggesting that MaR2 have anti-inflammatory and analgesic effects worthy of further
11 investigation about its mechanisms of action.

12

13 **6 Conflict of interest**

14

15 Authors declare no conflict of interest.

16

17 **Acknowledgements**

18 This work was supported by grants from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal
19 de Nível Superior (CAPES; finance code 001), grants from the Department of Science and
20 Technology from the Science, Technology and Strategic Inputs Secretariat of the Ministry of
21 Health (Decit/SCTIE/MS, Brazil) intermediated by National Council for Scientific and
22 Technological Development (CNPq, Brazil) with support of Araucária Foundation and State
23 Health Secretariat, Paraná (SESA-PR, Brazil; PPSUS Grant agreement 041/2017, protocol
24 48.095); Programa de Apoio a Grupos de Excelência (PRONEX) grant supported by
25 SETI/Araucária Foundation and MCTI/CNPq; and Paraná State Government (agreement
26 014/2017, protocol 46.843); and Universal CNPq (427946/2018-2). RC and WAVJ
27 acknowledge the CNPq Productivity fellowship. We also thank the core facility CMLP-UEL
28 (Central Multiusuário de Laboratórios de Pesquisa da Universidade Estadual de Londrina).

29

30 **References**

- 31 1. Abul K. ABBAS AHL. Robbins Patologia Básica. Robbins Patol. Básico 9 edição. 2016.
- 32 2. Belambri SA, Rolas L, Raad H, Hurtado-Nedelec M, Dang PMC, El-Benna J. NADPH
33 oxidase activation in neutrophils: Role of the phosphorylation of its subunits. Eur J Clin Invest.
34 2018;48:1–9.

- 1 3. Baron R, Binder A, Wasner G. Neuropathic pain: Diagnosis, pathophysiological
2 mechanisms, and treatment. *Lancet Neurol*. Elsevier Ltd; 2010;9:807–19.
- 3 4. Huang T, Lin Y, Pang Q, Shen W, Chen X, Tu F. The Synergistic Effect of TRPV1 on
4 Oxidative Stress-Induced Autophagy and Apoptosis in Microglia. *Anal Cell Pathol*. 2021;2021.
- 5 5. Park CK, Lü N, Xu ZZ, Liu T, Serhan CN, Ji RR. Resolving TRPV1- and TNF- α -mediated
6 spinal cord synaptic plasticity and inflammatory pain with neuroprotectin D1. *J Neurosci*. *J*
7 *Neurosci*; 2011;31:15072–85.
- 8 6. Pinho-Ribeiro FA, Hohmann MSN, Borghi SM, Zarpelon AC, Guazelli CFS, Manchope MF,
9 et al. Protective effects of the flavonoid hesperidin methyl chalcone in inflammation and pain
10 in mice: role of TRPV1, oxidative stress, cytokines and NF- κ B. *Chem Biol Interact*. Ireland;
11 2015;228:88–99.
- 12 7. Park CK. Maresin 1 Inhibits TRPV1 in Temporomandibular Joint-Related Trigeminal
13 Nociceptive Neurons and TMJ Inflammation-Induced Synaptic Plasticity in the Trigeminal
14 Nucleus. *Mediat Inflamm*. 2015;2015:275126.
- 15 8. Manchope MF, Calixto-Campos C, Coelho-Silva L, Zarpelon AC, Pinho-Ribeiro FA,
16 Georgetti SR, et al. Naringenin Inhibits Superoxide Anion-Induced Inflammatory Pain: Role of
17 Oxidative Stress, Cytokines, Nrf-2 and the NO-cGMP-PKG-KATPChannel Signaling
18 Pathway. *PLoS One*. 2016;11:e0153015--e0153015.
- 19 9. Sappington RM, Calkins DJ. Translocation with Elevated Hydrostatic Pressure.
20 2014;49:3004–17.
- 21 10. Ortega-Gómez A, Perretti M, Soehnlein O. Resolution of inflammation: An integrated view.
22 *EMBO Mol Med*. 2013;5:661–74.
- 23 11. Serhan CN. Novel Pro-Resolving Lipid Mediators in Inflammation Are Leads for
24 Resolution Physiology. *Nature*. 2014;510:92–101.
- 25 12. Deng B, Wang CW, Arnardottir HH, Li Y, Cheng CYC, Dalli J, et al. Maresin biosynthesis
26 and identification of maresin 2, a new anti-inflammatory and pro-resolving mediator from
27 human macrophages. *PLoS One*. 2014;9.
- 28 13. Westlund KN, Kochukov MY, Lu Y, McNearney TA. Impact of central and peripheral
29 TRPV1 and ROS levels on proinflammatory mediators and nociceptive behavior. *Mol Pain*.
30 2010;6:1–13.
- 31 14. Maioli NAA, Zarpelon ACC, Mizokami SSS, Calixto-Campos C, Guazelli CFSF, Hohmann
32 MSNS, et al. The superoxide anion donor, potassium superoxide, induces pain and
33 inflammation in mice through production of reactive oxygen species and cyclooxygenase-2.
34 *Braz J Med Biol Res*. 2015;48:321–31.
- 35 15. Lourenco-Gonzalez Y, Fattori V, Domiciano TP, Rossaneis AC, Borghi SM, Zaninelli TH,
36 et al. Repurposing of the nootropic drug vinpocetine as an analgesic and anti-inflammatory
37 agent: Evidence in a mouse model of superoxide anion-triggered inflammation. *Mediators*
38 *Inflamm*. 2019;2019.
- 39 16. Hargreaves K, Dubner R, Brown F, Flores C, Joris J. A new and sensitive method for
40 measuring thermal nociception. *Pain*. 1988;32:77–88.
- 41 17. Fattori V, Rasquel-Oliveira FS, Artero NA, Ferraz CR, Borghi SM, Casagrande R, et al.
42 Diosmin Treats Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Pain and Peritonitis by Blocking
43 NF- κ B Activation in Mice. *J Nat Prod*. *J Nat Prod*; 2020;83:1018–26.
- 44 18. Deseure K, Hans GH. Differential drug effects on spontaneous and evoked pain behavior
45 in a model of trigeminal neuropathic pain. *J Pain Res*. 2017;10:279–86.
- 46 19. Gloire G, Piette J. Redox regulation of nuclear post-translational modifications during NF-

- 1 κ B activation. *Antioxidants Redox Signal*. 2009;11:2209–22.
- 2 20. Serafim KGG, Navarro SA, Zarpelon AC, Pinho-Ribeiro FA, Fattori V, Cunha TM, et al.
3 Bosentan, a mixed endothelin receptor antagonist, inhibits superoxide anion-induced pain and
4 inflammation in mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2015;388:1211–21.
- 5 21. Fattori V, Pinho-Ribeiro FA, Borghi SM, Alves-Filho JC, Cunha TM, Cunha FQ, et al.
6 Curcumin inhibits superoxide anion-induced pain-like behavior and leukocyte recruitment by
7 increasing Nrf2 expression and reducing NF- κ B activation. *Inflamm Res*. 2015;64:993–1003.
- 8 22. Fattori V, Zaninelli TH, Rasquel-Oliveira FS, Casagrande R, Verri WA. Specialized pro-
9 resolving lipid mediators: A new class of non-immunosuppressive and non-opioid analgesic
10 drugs. *Pharmacol. Res. Academic Press*; 2020.
- 11 23. Zaninelli TH, Fattori V, Verri WAJ. Harnessing Inflammation Resolution in Arthritis:
12 Current Understanding of Specialized Pro-resolving Lipid Mediators' Contribution to Arthritis
13 Physiopathology and Future Perspectives. *Front Physiol. Frontiers*; 2021;0:1444.
- 14 24. Lee HI, Park BR, Chun SW. Reactive oxygen species increase neuronal excitability via
15 activation of nonspecific cation channel in rat medullary dorsal horn neurons. *Korean J Physiol*
16 *Pharmacol*. 2017;21:371–6.
- 17 25. Muscoli C, Mollace V, Wheatley J, Masini E, Ndengele M, Wang ZQ, et al. Superoxide-
18 mediated nitration of spinal manganese superoxide dismutase: a novel pathway in N-methyl-
19 D-aspartate-mediated hyperalgesia. *Pain*. 2004;111:96–103.
- 20 26. Verri WA, Cunha TM, Parada CA, Poole S, Cunha FQ, Ferreira SH. Hypernociceptive role
21 of cytokines and chemokines: Targets for analgesic drug development? *Pharmacol. Ther.*
22 *Pharmacol Ther*; 2006. p. 116–38.
- 23 27. Martini AC, Berta T, Forner S, Chen G, Bento AF, Ji RR, et al. Lipoxin A4 inhibits
24 microglial activation and reduces neuroinflammation and neuropathic pain after spinal cord
25 hemisection. *J Neuroinflammation*. 2016;13:75.
- 26 28. Svensson CI, Zattoni M, Serhan CN. Lipoxins and aspirin-triggered lipoxin inhibit
27 inflammatory pain processing. *J Exp Med*. 2007;204:245–52.
- 28 29. Fattori V, Pinho-Ribeiro FA, Staurengo-Ferrari L, Borghi SM, Rossaneis AC, Casagrande
29 R, et al. The specialized pro-resolving lipid mediator Maresin-1 reduces inflammatory pain with
30 a long-lasting analgesic effect. *Br J Pharmacol*. 2018;
- 31 30. Laboureyras E, Chateauraynaud J, Richebe P, Simonnet G. Long-term pain vulnerability
32 after surgery in rats: prevention by nefopam, an analgesic with antihyperalgesic properties.
33 *Anesth Analg*. 2009;109:623–31.
- 34 31. Abdulnour RE, Dalli J, Colby JK, Krishnamoorthy N, Timmons JY, Tan SH, et al. Maresin
35 1 biosynthesis during platelet-neutrophil interactions is organ-protective. *Proc Natl Acad Sci U*
36 *S A*. 2014;111:16526–31.
- 37 32. Dalli J, Serhan CN. Specific lipid mediator signatures of human phagocytes: microparticles
38 stimulate macrophage efferocytosis and pro-resolving mediators. *Blood*. 2012;120:e60--72.

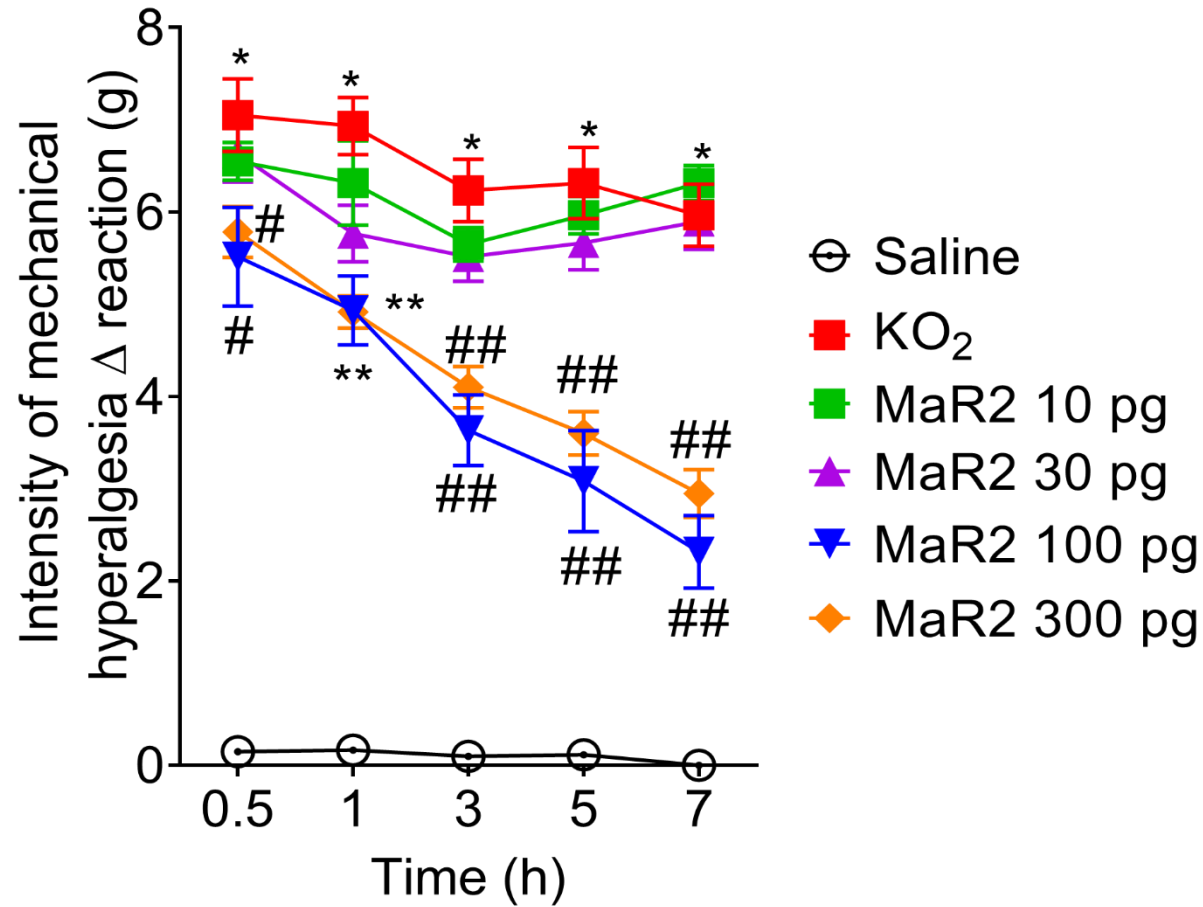


Figure 1 – MaR2 reduces KO₂-induced mechanical hyperalgesia. Effect of treatment with MaR2 at doses of (10, 30, 100 and 300 pg/animal, i.p.) on mechanical hyperalgesia induced by KO₂ (30 μ g/20 μ l/paw). Results are expressed as mean \pm SEM of 6 animals per group *p<0.05 compared to saline group, #p<0.05 compared to KO₂ group, **100 e 300 pg \neq KO₂ e 10 pg, ###100 e 300 pg \neq KO₂, 10 e 30 pg. (Two-way ANOVA followed by Tukey post-test).

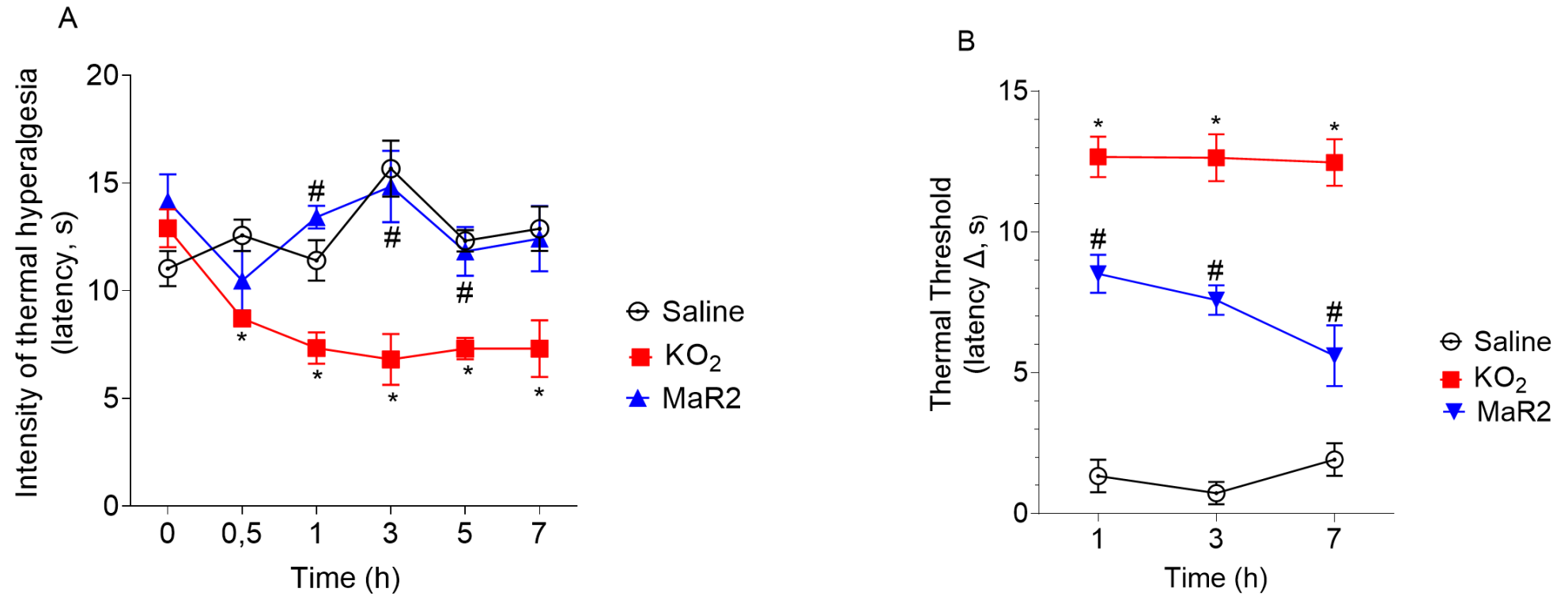


Figure 2 – MaR2 reduces KO₂-induced thermal hyperalgesia. Effect of treatment with MaR2 (100 pg/animal, i.p.) on thermal hyperalgesia assessed by hot plate (A) and Hargreaves test (B) after stimulation with KO₂ (30 μ g/20 μ l/paw). Results are expressed as mean \pm SEM of 6 animals per group * p <0.05 compared to saline group, # p <0.05 compared to KO₂ group. (Two-way ANOVA followed by Tukey post-test).

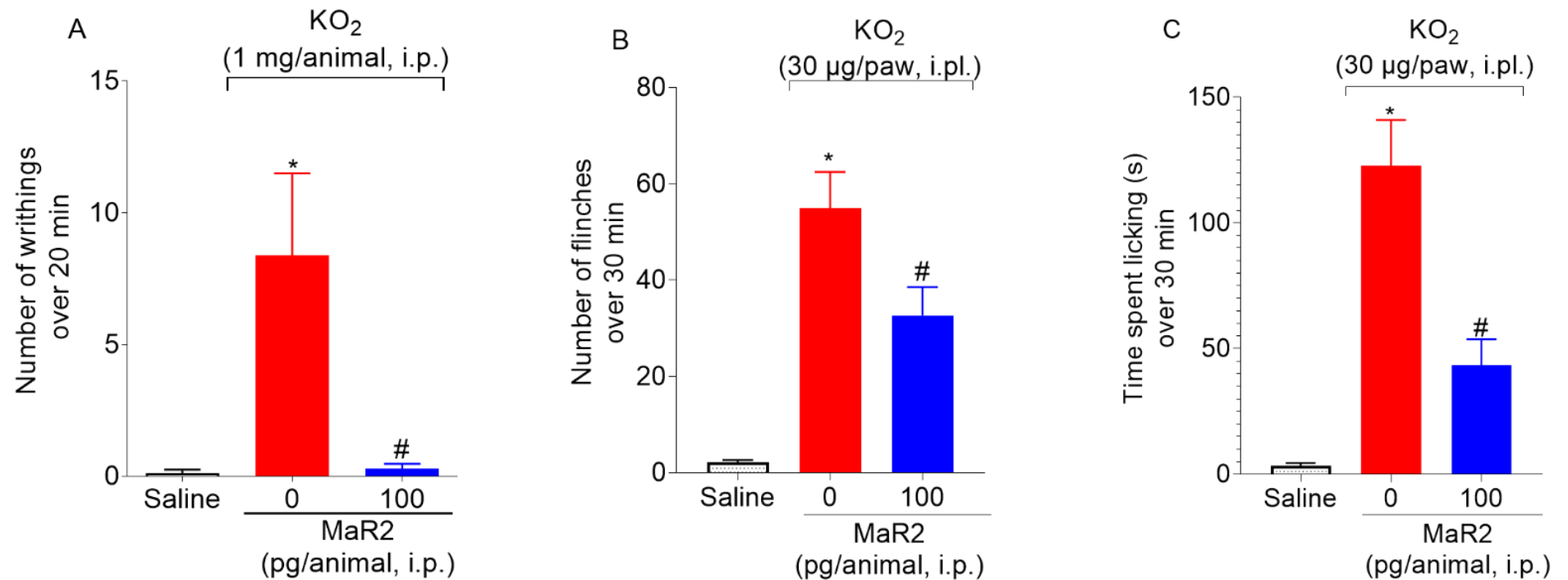


Figure 3 – MaR2 reduces the number of writhes, flinches and KO₂-induced licking time. Effect of treatment with MaR2 (100 pg/animal, i.p.) on the number of abdominal writhings (A), flinches (B) and paw licking time (C) after stimulation with KO₂ (1 mg/100μl/animal or 30 μg/20μl/paw, respectively). Results are expressed as mean ± SEM of 6 animals per group *p<0.05 compared to saline group, #p<0.05 compared to KO₂ group. (Kruskal-Wallis and Dunn's post-test (A); One-way ANOVA and Tukey post-test (B-C)).

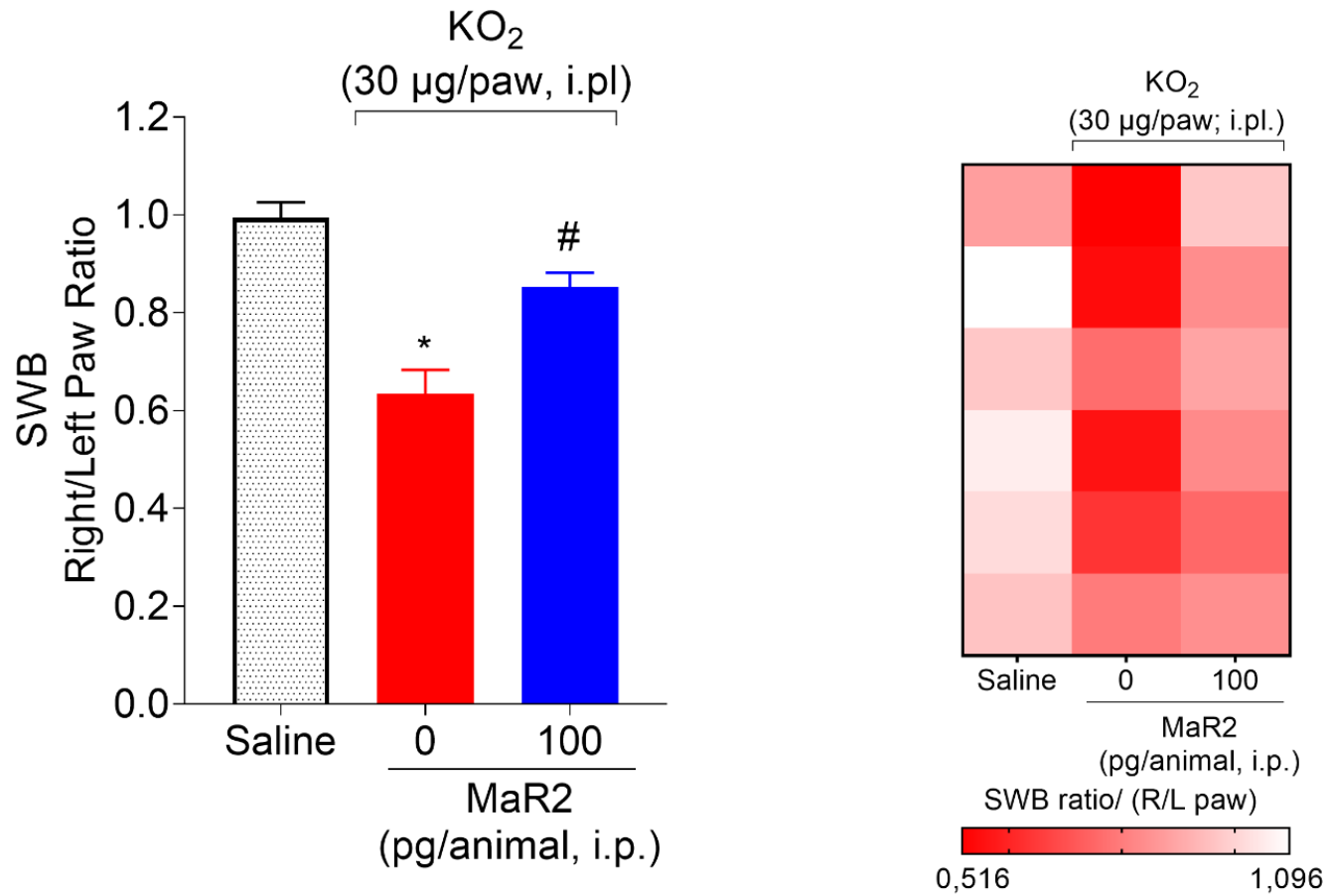


Figure 4 – MaR2 increased the right/left paw ratio. Effect of treatment with MaR2 (100 pg/animal, i.p.) on mechanical incapacity using the Static Weight Bearing test, 3 hours after stimulation with KO₂ (30 µg/20 µl/paw). Results are expressed as mean ± SEM of 6 animals per group *p<0.05 compared to saline group, #p<0.05 compared to KO₂ group. (One-way ANOVA and Tukey post-test).

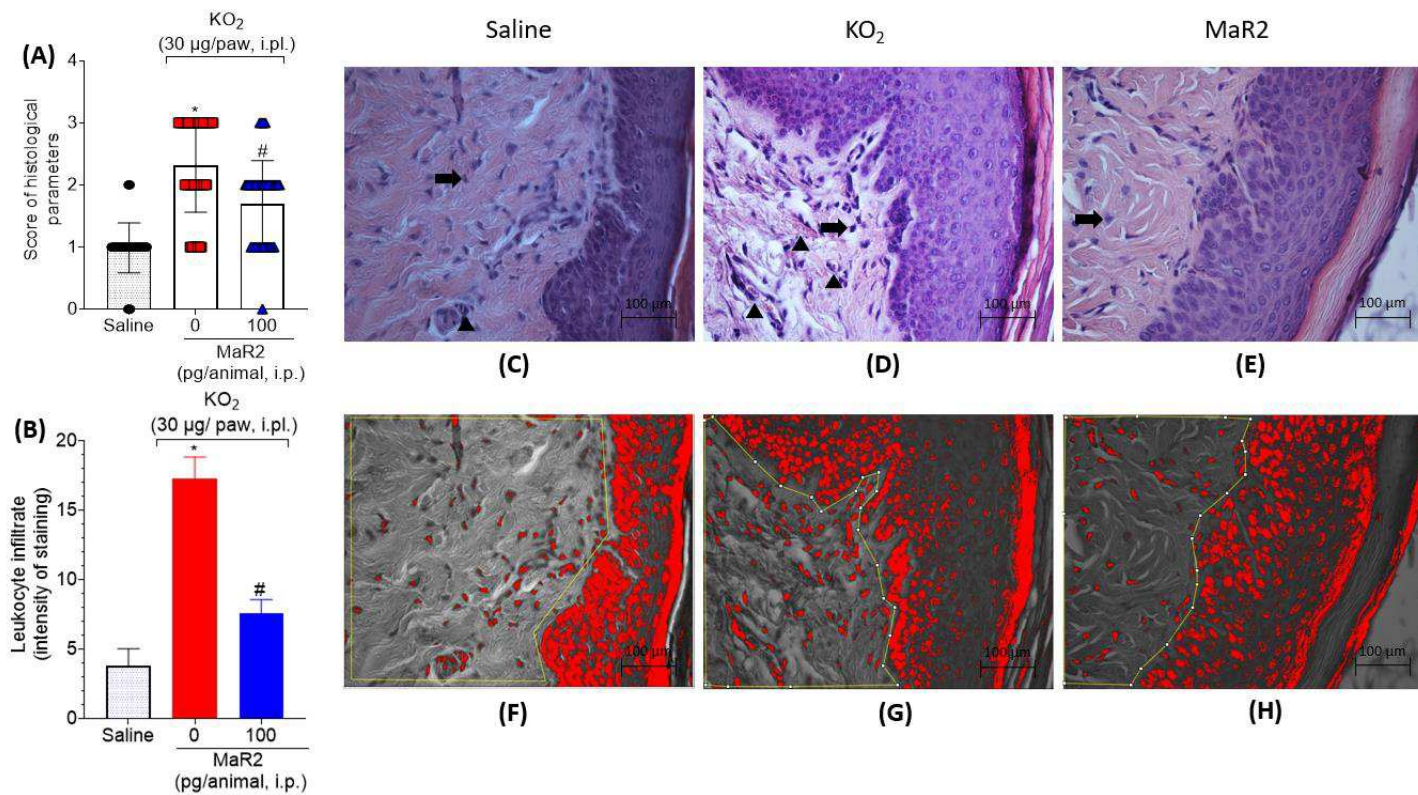


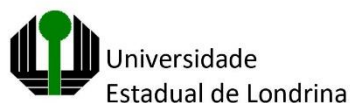
Figure 5 – MaR2 reduces superoxide anion-induced leukocyte recruitment to the paw skin. Seven hours after intraplantar injection of KO₂ (30 µg/paw), the skin of the hind paw was dissected for histopathological analysis by H&E staining using a light microscope (original magnification 40x). The analysis was performed using a clinical score (A) where neovascularization and inflammatory infiltrate were evaluated and the percentage of inflammatory infiltrate per area (highlighted area in red (F-H)), using the Image J software (B) of each group with 6 animals **p* < 0.05 vs. saline group; #*p* < 0.05 vs. vehicle group (0 µg/paw), non-parametric Kruskal-Wallis test was used, followed by Dunn's test (A); One-way ANOVA followed by Tukey's post-test (B); mean ± SEM).

1 3 **CONCLUSÃO**

2 Neste trabalho retratou-se a eficácia da MaR2 como um possível agente
3 analgésico e anti-inflamatório. A MaR2 demonstrou atividade em reduzir a dor
4 induzida por estímulo mecânico ou térmico, a dor manifesta e o recrutamento de
5 leucócitos, apresentando-se como uma estratégia para controlar a superprodução de
6 ERO e/ou seus efeitos deletérios, incluindo estresse oxidativo e inflamação
7 corroborando com outros modelos.

ANEXOS

ANEXO A



Universidade
Estadual de Londrina

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA N° 024/2021

Londrina, 26 de março de 2021.

Prezado (a) professor (a),

Certificamos que o projeto intitulado: “Avaliação do Efeito e Mecanismos Anti-Inflamatórios e Analgésicos das Resolvinas D1, D2 e D5 (RvD1, RvD2 E RvD5), Maresinas 1 e 2 (MaR1 e MaR 2), da Protectina DX, da Lipoxina A4 e da 15-epi-Lipoxina A4 em Modelo de Dor Induzida pelo Superóxido de Potássio (KO₂) em Camundongos” protocolo CEUA n° 003.2021 sob a responsabilidade de Waldiceu Aparecido Verri Junior, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n° 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n° 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL) no dia 26/03/2021.

O projeto tem como objetivo avaliar o efeito dos mediadores lipídicos pró-resolução (SPMs) na dor inflamatória induzida pelo superóxido de potássio (KO₂ - um doador de ânion superóxido). **Grau de invasividade: 3.**

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa científica
Vigência da autorização	01/05/2021 a 30/04/2025
Espécie/ linhagem/ raça	Camundongo heterogênico/ Swiss
N° de animais	6640
Peso/ Idade	25-25 g/ 1-2 meses
Sexo	Machos.
Origem	Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina
Amostras a serem coletadas	Tecido subcutâneo plantar, medula espinal, gânglio da raiz dorsal, sangue, estômago.

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

Em cumprimento às exigências do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), em até 30 dias da finalização do projeto de pesquisa ou extensão envolvendo o uso de animais (verificar período de vigência expresso neste ofício), é necessário encaminhar relatório da descrição de uso de animais para ceua@uel.br, conforme modelo disponível no site da CEUA: <http://www.uel.br/comites/ceua/pages/relatorio-de-projetos.php>.

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

Profª Drª Maria Fernanda
Rodrigues Graciano
Coordenadora da Comissão de
Ética no Uso de Animais
Universidade Estadual de Londrina
ceua@uel.br / (43) 3371-5454

Profª. Drª Maria Fernanda Rodrigues Graciano
Coordenadora da CEUA/UEL

Ilmo.(a) Sr.(a)

Prof. (a) Dr. (a) Waldiceu Aparecido Verri Junior

Responsável pelo projeto

C/C para a Chefia do Departamento de Ciências Patológicas /CCB

C/C para a Direção do Centro de Ciências Biológicas/ CCB

C/C para o Biotério Central da UEL/CCB