



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

JESSICA APARECIDA CARNEIRO

**EFEITO ANALGÉSICO, ANTI-INFLAMATÓRIO E
ANTIOXIDANTE DA PDX NA DOR E INFLAMAÇÃO
INDUZIDAS POR ÂNION SUPERÓXIDO EM
CAMUNDONGOS**

JESSICA APARECIDA CARNEIRO

**EFEITO ANALGÉSICO, ANTI-INFLAMATÓRIO E
ANTIOXIDANTE DA PDX NA DOR E INFLAMAÇÃO
INDUZIDAS POR ÂNION SUPERÓXIDO EM
CAMUNDONGOS**

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

Orientador: Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verri Junior.

Londrina
2024

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

C289e Carneiro, Jessica Aparecida.
EFEITO ANALGÉSICO, ANTI-INFLAMATÓRIO E ANTIOXIDANTE DA PDX NA DOR E INFLAMAÇÃO INDUZIDAS POR ÂNION SUPERÓXIDO EM CAMUNDONGOS / Jessica Aparecida Carneiro. - Londrina, 2024.
122 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, 2024.
Inclui bibliografia.

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

CDU 574

JESSICA APARECIDA CARNEIRO

**EFEITO ANALGÉSICO, ANTI-INFLAMATÓRIO E ANTIOXIDANTE DA PDX
NA DOR E INFLAMAÇÃO INDUZIDAS POR ÂNION SUPERÓXIDO EM
CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em 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 Kwasniewski
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Sergio Marques Borghi
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 09 de Agosto de 2024.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Valdir e Leni, por acreditarem no meu potencial, por serem minha rede de apoio incondicional, e que sob muito sol, fizeram-me chegar até aqui, na sombra.

Ao meu irmão Luciano, à minha cunhada Jessica, e minhas sobrinhas Emanuely, Esther e Sophia, por todo amor, carinho, apoio e incentivo.

Agradeço ao meu orientador, Prof^o Dr. Waldiceu Aparecido Verri Jr., pela orientação ao longo da realização deste trabalho e sobretudo pelo desenvolvimento acadêmico e profissional dos últimos anos.

Aos professores, Dr. Fábio Henrique Kwasniewski 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.

À CAPES, o órgão de fomento que me concedeu os recursos necessários para o desenvolvimento deste e demais projetos. Este trabalho contou com o fomento do edital PRONEX, convênio 014/2017 da Fundação Araucária.

Aos funcionários, técnicos e professores da UEL, que foram fundamentais para minha formação.

Aos colegas de equipe do LADINC, por toda colaboração, paciência, ensinamentos e companheirismo ao longo dos anos.

Em especial, à Beatriz Hoffmann, Nayara Artero, Thaila Maximiano e Geovana Martelossi, que além de amigas queridas e fontes de apoio, me auxiliaram diretamente no desenvolvimento deste projeto.

À Deus que sempre me deu forças e me iluminou durante o caminho.

“Sapere aude”
- Immanuel Kant.

CARNEIRO, Jessica Aparecida. **Efeito analgésico, anti-inflamatório e antioxidante da PDX na dor e inflamação induzidas por ânion superóxido em camundongos**. 2024. 121 páginas. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2024.

RESUMO GERAL

As espécies reativas de oxigênio (ERO) são fundamentais para a inflamação. Contudo, a geração exacerbada excede a capacidade antioxidante do organismo, resultando em injúrias teciduais. O uso de moléculas antioxidantes demonstra que as ERO são componentes chave na fisiopatologia da dor inflamatória. Neste contexto, o superóxido de potássio (KO₂), um doador de ânion superóxido, induz inflamação e dor. Os mediadores lipídicos pró-resolução (SPMs) são moléculas bioativas derivadas do ácido graxos ω -6 e ω -3 que promovem a resolução da inflamação. A Protectina DX (PDX) demonstra atividade anti-inflamatória, antioxidante, pró-resolutiva e analgésica em diversos modelos. Tendo em vista essas características, nosso objetivo foi avaliar o efeito analgésico, anti-inflamatório e antioxidante da PDX em modelo de dor e inflamação induzido por KO₂ em camundongos. Camundongos Swiss ou LysM-eGFP machos foram tratados com PDX (1, 3 ou 10 ng) ou salina estéril via intraperitoneal (i.p.), 1h antes da injeção de KO₂ (30 μ g via intraplantar [i.pl.] ou 1 mg [i.p.]). Excepcionalmente, nos testes comportamentais de sensibilidade mecânica e térmica basal e de atividade locomotora, o estímulo não foi administrado. O teste de von Frey eletrônico e o teste manual de filamentos de von Frey foram utilizados para avaliar a hiperalgesia e alodinia mecânica, respectivamente. A hiperalgesia térmica foi determinada pelo método de placa quente e pelo teste de Hargreaves. As medidas experimentais foram feitas nos tempos 0, 0.5, 1, 3, 5 e 7h após estímulo. A atividade locomotora foi avaliada por teste de rota-rod nos tempos 0, 0.5, 1, 3, 5 e 7h. A dor manifesta foi determinada pelo número de contorções abdominais; o número de sacudidas de pata e o tempo de lambida da pata; ao longo de 20 e 30 minutos após estímulo, respectivamente. O desbalanço na distribuição de peso corporal sobre as patas traseiras foi avaliado pelo static weight bearing nos tempos 0, 1, 3, 5 e 7h após estímulo. O recrutamento leucocitário foi avaliado a partir da coleta de amostras plantares 7h após estímulo, com análise em microscopia de luz (coloração em hematoxilina-eosina) e microscopia confocal (imunofluorescência). A produção de citocinas (IL-1 β e TNF- α) foi avaliada por ELISA, 4h após estímulo. O estresse oxidativo foi avaliado pelos ensaios colorimétricos de catalase (coleta 1h após estímulo), NBT, ABTS, FRAP e GSH (coleta 3h após estímulo). A ativação do canal TRPV1 e a ativação de neurônios DRG foram avaliadas em microscopia confocal, 5h após estímulo. O potencial efeito tóxico do tratamento agudo com PDX foi avaliado pelos ensaios de ALT, AST, ureia, creatinina e atividade da mieloperoxidase estomacal, 7h após estímulo. Como resultados, obtivemos que a PDX reduz os comportamentos de dor analisados (hiperalgesia, alodinia, dor manifesta e desbalanço na distribuição de peso corporal), sem alterar a sensibilidade e capacidade motora normal dos animais. Como mecanismo, demonstramos que a PDX inibe a ativação de TRPV1 e, conseqüentemente, do neurônio DRG,

demonstrando um inédito mecanismo analgésico. Além disso, a PDX diminuiu os níveis de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1 β) e os níveis de ânion superóxido, além de aumentar a capacidade antioxidante tecidual, sem alterar os níveis plasmáticos de ALT, AST, creatinina e ureia, ou a atividade da mieloperoxidase estomacal. Desta forma, este estudo evidenciou a propriedade analgésica, anti-inflamatória e antioxidante segura da PDX em modelo de dor e inflamação desencadeada por uma ERO, sugerindo este SPM como uma promissora alternativa terapêutica.

Palavras-chave: Mediadores Lipídicos Pró-Resolução; Espécies Reativas de Oxigênio; Dor; Inflamação; Protectinas.

CARNEIRO, Jessica Aparecida. **Analgesic, anti-inflammatory and antioxidant effect of PDX on superoxide anion-induced pain and inflammation in mice.** 2024. 121 pages. Dissertation (Master's degree in Experimental Pathology) – Biological Sciences Center – Londrina State University, Londrina, 2024.

ABSTRACT

Reactive oxygen species (ROS) are fundamental to inflammation. However, their exacerbated generation exceeds the antioxidant capacity of the organism, resulting in tissue damage. The use of antioxidant molecules shows that ROS are crucial components in the pathophysiology of inflammatory pain. In this context, potassium superoxide (KO_2), a superoxide anion donor, induces inflammation and pain. Specialized pro-resolving mediators (SPMs) are bioactive molecules derived from ω -6 and ω -3 fatty acids that promote the resolution of inflammation. Protectin DX (PDX) demonstrates anti-inflammatory, antioxidant, pro-resolving, and analgesic activities. Given these characteristics, we aimed to evaluate the anti-inflammatory, antioxidant, and analgesic effect of PDX in a model of pain and inflammation induced by KO_2 in mice. Male Swiss or LysM-eGFP mice were treated with PDX (1, 3, or 10 ng) or sterile saline intraperitoneally (i.p.), 1 hour before injection with KO_2 (30 μg intraplantar [i.pl.] or 1 mg [i.p.]). Exceptionally, for the behavioral tests of baseline mechanical and thermal sensitivity and locomotor activity, no stimulus was administered. The electronic von Frey test and the manual von Frey filament test were used to assess mechanical hyperalgesia and mechanical allodynia, respectively. Thermal hyperalgesia was determined using the hot plate method and the Hargreaves test. Experimental measurements were taken at 0, 0.5, 1, 3, 5, and 7 hours after stimulation. Locomotor activity was assessed using the rotarod test at 0, 0.5, 1, 3, 5, and 7 hours. Overt pain-like behaviors were determined by the number of abdominal writhings, paw flinches, and paw licking time, over 20 and 30 minutes after the stimulus, respectively. The unbalance in the body weight distribution over the hind paws was assessed by static weight bearing at 0, 1, 3, 5, and 7 hours after stimulation. Leukocyte recruitment was assessed by collecting plantar samples 7 hours after stimulation and analyzing them using light microscopy (hematoxylin-eosin staining) and confocal microscopy (immunofluorescence). Cytokine production (IL-1 β

and TNF- α) was assessed by ELISA 4 hours after stimulation. Oxidative stress was evaluated by catalase (sampling 1 hour after stimulus), NBT, ABTS, FRAP and GSH (sampling 3 hours after stimulus) colorimetric assays. TRPV1 channel activation and DRG neuron activation were assessed by confocal microscopy 5 hours after stimulation. The potential toxic effect of acute treatment with PDX was assessed by ALT, AST, urea, creatinine and stomach myeloperoxidase activity assays, 7 hours after KO₂ intraplantar injection. As a result, we obtained that PDX reduced the pain behaviors analyzed (hyperalgesia, allodynia, overt pain-like behavior, and imbalance in body weight distribution), without altering the normal sensitivity and motor capacity of the animals. As a mechanism, we demonstrated that PDX inhibits the activation of TRPV1 and, consequently, of the DRG neuron, demonstrating a new analgesic mechanism about this SPM. In addition, PDX decreased levels of pro-inflammatory cytokines (TNF- α and IL-1 β) and superoxide anion levels, as well as increased tissue antioxidant capacity, without altering plasma levels of ALT, AST, creatinine and urea, or stomach myeloperoxidase activity. Thus, this study emphasizes the safe analgesic, anti-inflammatory, and antioxidant properties of PDX in a model of pain and inflammation triggered by a ROS, indicating to this SPM as a promising therapeutic alternative.

Key-words: Specialized pro-resolving mediators; Reactive oxygen species; Pain; Inflammation; Protectins.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Aspectos gerais das fases de iniciação e de resolução da resposta inflamatória.....	20
Figura 2 – Processos e componentes fundamentais das vias de nocicepção e dor	25
Figura 3 – Interações neuro-imunes nos terminais nervosos periféricos e centrais no contexto da dor inflamatória.....	27
Figura 4 – Gênese enzimática das Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio	31
Figura 5 – As ERO e ERN na dor e inflamação	40
Figura 6 – Visão geral da biossíntese dos SPMs	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	–	Concentrações fisiológicas de SPMs produzidos endogenamente	46
-----------------	---	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido araquidônico
AIM2	Ausente no melanoma 2
AP-1	Proteína ativadora 1
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
BLT1	Receptor de Leucotrieno B4 1
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
cGAS	Sintase cíclica GMP-AMP
COX-1	Ciclooxigenase 1
COX-2	Ciclooxigenase 2
DAG	Diacylglicerol
DAMP	Padrões Moleculares Associados à Danos
DHA	Ácido docosahexaenóico
DRG	Gânglio da raiz dorsal
ET-1	Endotelina 1
EPA	Ácido eicosapentaenóico
ERK	Quinase regulada extracelular
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
ETC	Cadeia de transporte de elétrons mitocondrial
FADH ₂	Dinucleotídeo de flavina e adenina
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GPCR	Receptores acoplados à proteína G
GPx	Glutathione peroxidase
LPS	Lipopolissacarídeo
HIF-1 α	Fator induzido por hipóxia 1 alfa

HMGB1	Proteína de alta mobilidade do grupo <i>box 1</i>
HSP	Proteínas de choque térmico
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular 1
IFN- γ	Interferon gama
IL-1R	Receptor de interleucina 1
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
IRAK4	Quinase 4 associada ao receptor de interleucina 1
IP ₃	Inositol 1,2,4-trifosfato
JNK	Quinase N-terminal c-Jun
LC-MS/MS	Cromatografia líquida-espectrometria de massa
LOX	Lipoxigenase
LPO	Peróxidos lipídicos
LXA ₄	Lipoxina A4
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MaR	Maresina
MCP-1	Proteína quimioatraente de macrófagos 1
MIP-1 α	Proteína inflamatória de macrófagos 1 alfa
MIP-2	Proteína inflamatória de macrófagos 2
MPO	Mieloperoxidase
Myd88	Fator de diferenciação mielóide 88
NADPH oxidase	Nicotinamina adenina dinucleotídeo fosfato oxidase
NF- κ B	Fator nuclear kappa B
NGF	Fator de crescimento neuronal
NO	Óxido nítrico
PAMP	Padrões Moleculares Associados à Patógenos
PD	Protectina
PECAM-1	Molécula de adesão celular endotelial plaquetária 1

PGD ₂	Prostaglandina D2
PGE ₂	Prostaglandina E2
PI3K	Fosfoinosítídeo 3-quinase
PIP ₂	fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
PLC	Fosfolipase C
RvD	Resolvina da série D
RvE	Resolvina da série E
SARS-CoV-2	Coronavírus 2 da Síndrome Respiratória Aguda
SOD	Superóxido dismutase
SP	Substância P
SPM	Mediadores lipídicos pró-resolução
STING	Estimulador de genes de interferon
TAK1	Quinase 1 ativada pelo fator de crescimento transformador beta
TAB1	Proteína de ligação ao ativador TAK1
TGF- β	Fator de crescimento transformador beta
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TNFR	Receptor do fator de necrose tumoral
TRAF6	Fator associado ao receptor do fator de necrose tumoral 6
TrkA	Receptor tropomiosina quinase A
TRPA1	Receptor de Potencial Transitório Subfamília Anquirina, membro 1
TRPC4	Receptor de Potencial Transitório Subfamília Canônica membro 4
TRPC5	Receptor de Potencial Transitório Subfamília Canônica membro 5
TRPM2	Receptor de Potencial Transitório Subfamília Melastatina, membro 2
TRPM8	Receptor de Potencial Transitório Subfamília Melastatina, membro 8
TRPV1	Receptor de Potencial Transitório Subfamília Vanilóide, membro 1

UPLC-MS/MS	Cromatografia líquida de ultra eficiência-espectrofotometria de massas em tandem
VCAM-1	Molécula de adesão celular vascular 1
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
XDH	Xantina desidrogenase
XO	Xantina oxidase

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	O processo inflamatório	18
1.2	Dor	23
1.2.1	Dor inflamatória	26
1.3	Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio	30
1.3.1	As ERO e ERN no contexto de inflamação e dor	35
1.4	Modelo de dor e inflamação induzido por ânion superóxido de potássio (KO ₂)	40
1.5	Mediadores lipídicos pró-Resolução (SPMs)	42
1.5.1	Protectina DX	51
2	OBJETIVOS	55
2.1	Objetivo Geral	55
2.2	Objetivo Específico	55
	REFERÊNCIAS	56
3	ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO (INFLAMMATION RESEARCH)	77
4	CONCLUSÃO	120
	ANEXOS	121
	ANEXO A- Cópia do parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)	121
	ANEXO B- Comprovante de publicação de artigo científico no periódico <i>Cell Calcium</i>	122

1. INTRODUÇÃO

1.1 O processo inflamatório

Ao longo da evolução, o sistema imune dos vertebrados desenvolveu estratégias de defesa eficientes contra invasões microbianas e danos celulares, conferindo a sobrevivência e o retorno à homeostase tecidual do hospedeiro. Assim, a defesa contra invasões e injúrias teciduais é mediada por dois sistemas imunes complementares capazes tanto de reconhecer quanto de eliminar o agente agressor: o sistema imune inato e o sistema imune adaptativo.

O sistema imune é capaz de reconhecer uma ampla gama de patógenos, como vírus, bactérias, protozoários e fungos, além de moléculas resultantes de danos às próprias células do organismo. Tal propriedade é conferida por um vasto número de receptores denominados de “Receptores de Reconhecimento de Padrão” (RRPs) expressos tanto em células imunes, como macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e células T, quanto em células teciduais, como células epiteliais, células musculares e células neuronais, por exemplo (Abbas; Lichtman; Pillai, 2019). De forma geral, a família dos RRP's inclui receptores expressos em membranas, seja na superfície celular, como é o caso dos receptores lectina (CLRs) e receptores do tipo *Toll* (TLRs) de subtipo TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 e TLR6, ou nas membranas endossomais, em que há expressão de TLRs de subtipo TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9. Além disso, há os receptores citosólicos, como os receptores do tipo NOD (NLRs) e os receptores do tipo RIG (RLRs) (Abbas; Lichtman; Pillai, 2019).

Estes receptores reconhecem os denominados PAMPs, como ácidos nucleicos de origem microbiana (ssRNA, dsRNA, CpG), proteínas (pilina e flagelina), lipídeos de parede celular (LPS e ácido lipoteicoico) e carboidratos (manana e glucana), por exemplo, além de DAMPs, como proteínas induzidas pelo estresse (HSPs), cristais (urato monossódico), matriz extracelular proteoliticamente clivada (fragmentos de ácido hialurônico e peptídeos de proteoglicanos), componentes mitocondriais (peptídeos formilados e ATP) e proteínas nucleares (histonas, HMGB1 e proteínas S100), estes resultantes de alterações ou danos às moléculas do próprio organismo (Abbas; Lichtman; Pillai, 2019).

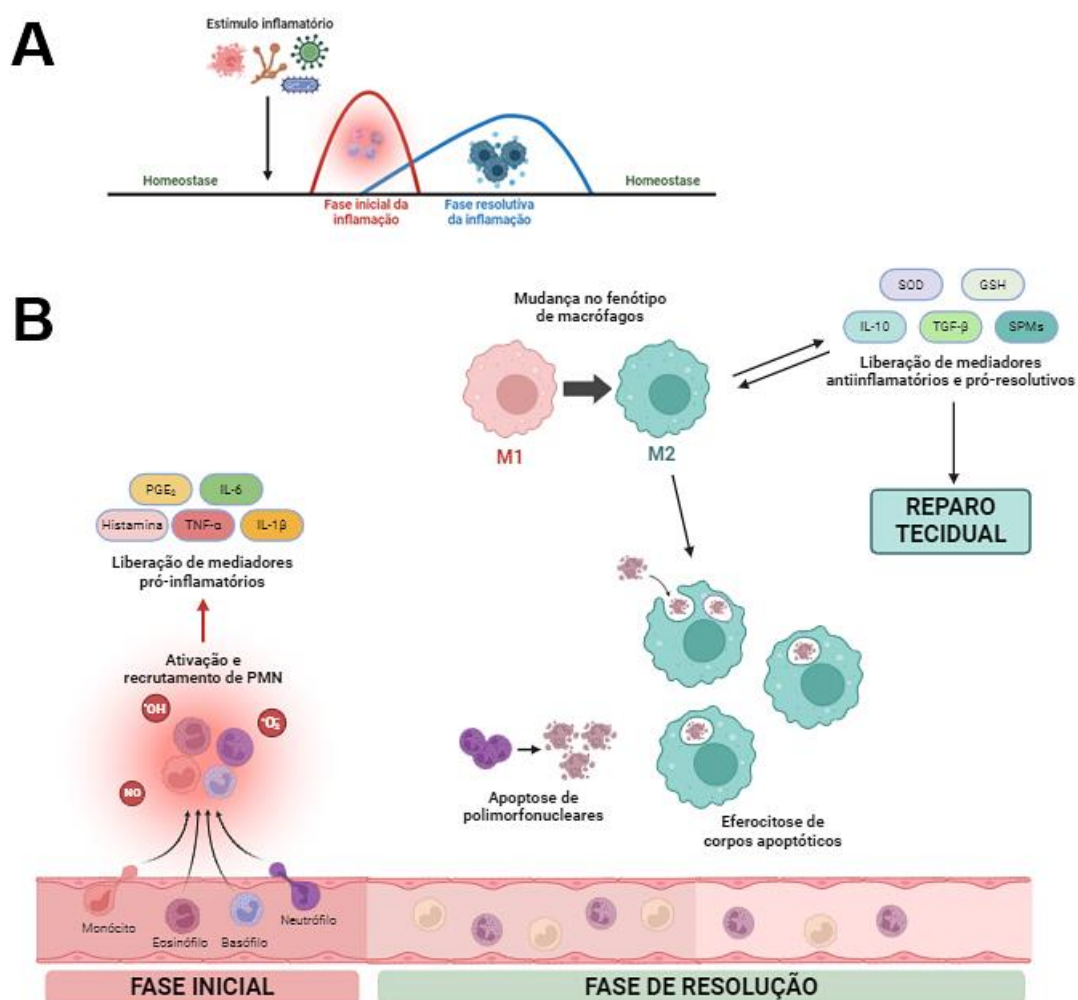
A partir do reconhecimento da agressão, vias de sinalização intracelulares são acionadas e culminam na translocação de fatores citoplasmáticos

em direção ao núcleo celular, tal como o NF- κ B e AP-1, resultando como produto final, na produção e liberação de mediadores inflamatórios importantes para a ativação e função de células imunes inatas e adaptativas, levando à eventos como proliferação celular; angiogênese; recrutamento leucocitário; fagocitose; atividade microbicida e citotóxica; produção de anticorpos e geração de células imunes de memória (Abbas; Lichtman; Pillai, 2019).

A inflamação é um mecanismo inato que confere a primeira defesa do organismo frente à uma invasão microbiana ou liberação celular de alarminas, muitas vezes decorrentes da ação de agentes biológicos, físicos, térmicos ou químicos, por exemplo. Assim, o processo inflamatório pode ser incitado por agentes de diferentes propriedades: agentes biológicos (microrganismos patogênicos ou produtos resultantes de dano ou morte celular); agentes físicos (radiação, trauma e temperaturas nocivas); e agentes químicos (substâncias irritantes, toxinas, ácidos, partículas metálicas e gases tóxicos) (Gomes-Leal, 2002). Os primeiros registros relacionados à inflamação foram datados em meados do século I (D.C.) pelo romano Aulus Cornelius Celsus, autor conhecido por descrever os primeiros sinais e sintoma cardinal da inflamação: rubor (vermelhidão), calor, tumor (inchaço) e dor (Rocha e Silva, 1978). Estes sinais cardinais são resultado dos mecanismos envolvidos na resposta inflamatória que levam a dilatação e aumento da permeabilidade vascular, aumento do fluxo sanguíneo, liberação de mediadores inflamatórios e recrutamento leucocitário para o sítio de infecção/injúria. Posteriormente, o médico alemão Rudolf Virchow relatou o quinto sinal cardinal, a perda de função (*functio laesa*), o qual decorre da persistência e exacerbação da resposta imune, tornando-a danosa para o tecido (Freire; Van Dyke, 2013).

Fisiologicamente, a resposta inflamatória aguda é caracterizada por ser autolimitada, ou seja, apresentar início rápido e de curta duração, sendo eficiente na contenção dos avanços do agente agressor e tendo como desfecho sua eliminação. Então, com o passar do tempo, a reação tende a ser atenuada pela mudança da classe de mediadores inflamatórios produzidos, havendo aumento na produção e liberação de moléculas antioxidantes, anti-inflamatórias e pró-resolutivas (Lawrence; Willowghb, 2002; Niture; Jain; Jaiswal, 2014). Desta forma, o processo inflamatório pode ser subdividido em duas fases principais: iniciação e resolução (Maderna; Godson, 2009). Os aspectos gerais das fases que compõem a resposta inflamatória estão ilustrados na **Figura 1**.

Figura 1 – Aspectos gerais das fases de iniciação e de resolução da resposta inflamatória.



Fonte: Autoria própria.

Na fase inicial, o reconhecimento do agente agressor por células residentes, como macrófagos, células dendríticas e mastócitos, promove a ativação de sinalizações intracelulares que resultam na produção e liberação de mediadores pró-inflamatórios, tais como citocinas, quimiocinas, ERO e ERN, levando a uma amplificação da resposta inflamatória. Dentre as vias de sinalização ativadas por RRP, destaca-se a ativação clássica do NF-κB (também chamada de via canônica).

O NF-κB é um fator de transcrição eucariótico onipresente, pleiotrópico e de múltiplas subunidades, composto por cinco subunidades principais (p50, p52, p65/RelA, c-Rel e RelB) que podem formar homo ou heterodímeros em diversas combinações e é predominantemente ativado mediante engajamento de

TLRs e por citocinas das famílias da IL-1, TNF e IL-17 (Abbas; Lichtman; Pillai, 2019). A ativação da via do NF- κ B desempenha um papel crucial para a maioria dos eventos inflamatórios agudos, desde a ativação endotelial à sobrevivência e função leucocitária nos sítios de inflamação (Gosh; Hayden, 2008; Walmsley *et al.*, 2005). Nas células em repouso, o NF- κ B permanece no citoplasma ligado às proteínas regulatórias inibitórias I κ B (I κ B α , I κ B β e I κ B ϵ). Contudo, mediante ativação de RRs, do receptor IL-1R ou do receptor TNFR, há ativação do complexo IKK, composto pelas quinases IKK α e β , e pela proteína regulatória IKK γ , o qual será responsável por fosforilar as proteínas inibitórias I κ B, induzindo a ubiquitinação e posterior degradação proteassômica das proteínas inibitórias. Desta forma, uma vez livre, a subunidade p65/RelA, é fosforilada e o fator de transcrição NF- κ B é translocado para o núcleo, local em que interage com regiões promotoras do DNA e promove a transcrição de genes relacionados à mediadores pró-inflamatórios, tais como TNF- α , IL-1 β , ET-1, COX-2, iNOS, NADPH oxidase, VCAM-1, ICAM-1 e IL-8, por exemplo (Gius *et al.*, 1999; Gosh; Hayden, 2008; Takeuchi; Akira, 2010).

Por sua vez, a expressão destes mediadores pró-inflamatórios conduz a eventos característicos da fase inicial da inflamação: vasodilatação, decorrente da ação da histamina, NO, PGD₂ e PGE₂, que atuam promovendo o relaxamento da musculatura lisa da parede vascular sanguínea; aumento da permeabilidade dos capilares, resultado da ação de citocinas, histamina, serotonina, bradicinina, proteínas do sistema complemento (C5a, C3a e C4a) e leucotrienos (LTB₄, LTC₄, LTD₄ e LTE₄), que levam à desmontagem das junções intercelulares, originando lacunas entre as células endoteliais, por onde há extravasamento de fluido intravascular rico em proteínas em direção ao interstício (formação do edema); aumento do fluxo sanguíneo; aumento da aderência dos leucócitos circulantes ao revestimento endotelial das vênulas, ocasionado pela formação de um gradiente quimioatraente e ativação endotelial com exposição de moléculas de adesão, como as selectinas P e E, VCAM-1, ICAM-1 e PECAM-1, o que permite a migração, sobretudo, de neutrófilos (polimorfonucleares) e de monócitos/macrófagos (mononucleares) em direção ao foco inflamatório, para que realizem suas funções fagocíticas e microbidas (Freire; Van Dyke, 2013; Sadik; Kim; Luster, 2011).

De modo geral, nas primeiras horas (6-24 horas) após um estímulo inflamatório, os neutrófilos migram ao tecido lesado, visto que são os mais abundantes na corrente sanguínea e tendem a responder prontamente ao gradiente

1 quimioatraente, se aderindo ao endotélio e migrando através da parede vascular
2 (Mocsai; Walzog; Lowell, 2015). Dentro de 24-48 horas, os monócitos/macrófagos
3 tornam-se o tipo celular predominante no foco inflamatório. É importante destacar
4 que os macrófagos apresentam dois fenótipos principais: o tipo M1 ou classicamente
5 ativado, presente sobretudo na fase inicial da inflamação, e caracterizados por uma
6 acentuada capacidade fagocítica e microbicida, com alta produção de citocinas pró-
7 inflamatórias (TNF- α , IL-1 e IL-6) e agentes oxidantes (ERO e ERN); o tipo M2 ou
8 alternativamente ativado, que participa principalmente da fase de resolução, é
9 reconhecido por promover a supressão da resposta inflamatória e contribuir no
10 reparo tecidual, uma vez que promove o processo de eferocitose (fagocitose de
11 restos celulares apoptóticos), secreta citocinas anti-inflamatórias (IL-4, IL-10 e IL-13)
12 e fatores de crescimento (TGF- β e VEGF), além de amplificar as defesas
13 antioxidantes, contribuindo para a resolução do processo inflamatório (Pérez; Rius-
14 Pérez, 2022). Ademais, há os macrófagos teciduais/residentes que são parte das
15 primeiras células que reconhecem e respondem a determinado estímulo inflamatório.

16 Em uma resposta inflamatória controlada, em que há remoção
17 eficiente do estímulo, há evolução da inflamação para a fase de resolução, um
18 processo ativo e altamente regulado (Serhan *et al.*, 2015). A presença de neutrófilos
19 apoptóticos associada a produção de PGE₂ no microambiente inflamatório inicia o
20 processo de troca da classe de mediadores lipídicos predominante no tecido,
21 passando de mediadores lipídicos pró-inflamatórios (prostaglandinas, leucotrienos e
22 tromboxanos) para mediadores lipídicos pró-resolução (lipoxinas, resolvinas,
23 maresinas e protectinas) (Levy *et al.*, 2001). Esses neutrófilos apoptóticos e outros
24 debris celulares são eliminados pela eferocitose realizada por macrófagos M2,
25 personagens importantes na limitação da resposta inflamatória (Serhan *et al.*, 2015).
26 Contudo, em alguns casos, a não remoção do estímulo nocivo permite que o
27 processo inflamatório evolua para uma fase crônica, caracterizada pela duração
28 prolongada (meses e anos), lesão tecidual derivada da hiperativação imune, e
29 constante tentativa de reparo tecidual, o que pode culminar no desenvolvimento de
30 processos fibróticos no tecido (Artero, 2018).

1.2 Dor

O sistema nervoso é capaz de detectar e interpretar um vasto número de estímulos de natureza térmica (temperaturas nocivas), mecânica (estimulação mecânica forte), química (ácidos, carragenina e formalina) ou biológica (H^+ , ATP e bradicinina), conferindo ao indivíduo a capacidade de percepção de estímulos nocivos (considerados dolorosos) e, assim, permitir a autopreservação mediante situações que ocasionem danos teciduais (Fattori, 2016). Neste sentido, a dor pode ser considerada um instinto humano e pode ser definida como uma sensação desagradável e uma experiência emocional negativa, capaz de desencadear uma resposta fisiológica que o hospedeiro seja incapaz de ignorar.

A importância da dor é observada quando nos referimos a indivíduos incapazes de identificar estímulos nocivos, resultado de mutações em canais e receptores expressos nos neurônios nociceptivos (Katz *et al.*, 2023), por exemplo, impedindo respostas adequadas de aversão à determinadas situações de risco e resultando em problemas como queimaduras, lesões musculares/articulares e sobrecarga de peso. Ainda, a ausência da percepção de dor nestes indivíduos impede a formação de uma memória aversiva à determinada situação de perigo, impossibilitando uma resposta protetiva de conservação de regiões que possam ser afetadas por determinado estímulo doloroso (Butler; Fleming; Webb, 2006).

A Associação Internacional para Estudo da Dor (IASP) define a dor como “uma experiência sensorial e emocional desagradável que é associada a lesões reais ou potenciais”. Ainda, considerando o caráter subjetivo da dor, atualmente também são considerados o humor, a empatia, a função cognitiva, a memória, a atenção e a expectativa frente ao estímulo doloroso, como fatores que podem influenciar e moldar a percepção de dor pelos indivíduos (Langford *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2016; Wiech *et al.*, 2014).

O processo de nocicepção permite a detecção e transmissão de informações provenientes de um estímulo de alta intensidade, com o objetivo de identificar situações que representem risco à integridade tecidual. Essa detecção de estímulos nocivos é feita pelos nociceptores, um subconjunto especializado de neurônios sensoriais pseudounipolares responsáveis por mediar o processo de percepção da dor e inervar densamente os tecidos periféricos (pele, articulações e mucosas), permitindo-lhes interagir com estímulos ambientais. Há um agrupamento clássico, baseado centralmente nas diferenças de velocidades de condução dos

1 potenciais de ação, que classifica os tipos de fibras nociceptivas em duas principais
2 categorias: fibras nociceptivas A, subdivididas em $A\alpha$, $A\beta$ e $A\delta$; e fibras nociceptivas
3 C (Braz *et al.*, 2014; Todd, 2010).

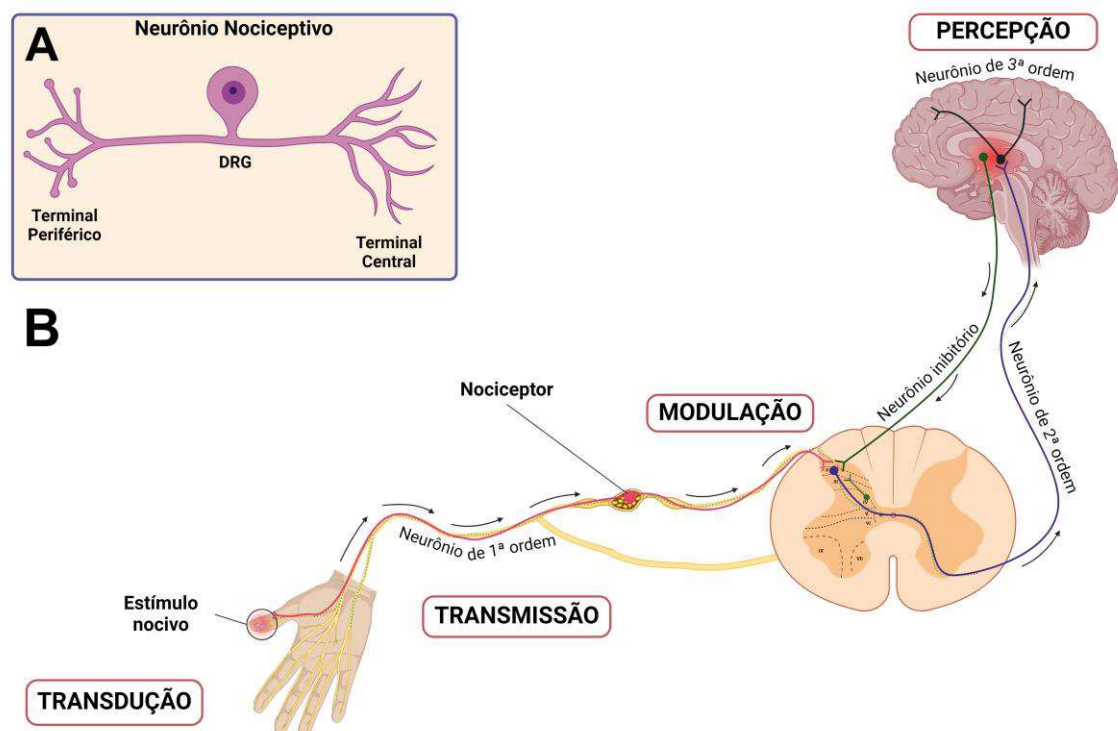
4 As fibras $A\alpha$ e $A\beta$ possuem maior quantidade de mielina nos
5 axônios, alta velocidade de condução (80-120 m/s e 35-75 m/s, respectivamente) e
6 respondem a estímulos inócuos em tecidos periféricos, como a pele e as
7 articulações. As fibras do tipo $A\delta$, de condução média (cerca de 12-30 m/s),
8 apresentam axônios finamente mielinizados e respondem à estímulos mecânicos,
9 térmicos e químicos de alta intensidade. Por fim, as fibras C, de condução lenta (0,5-
10 2 m/s), possuem axônios com ausência de mielina e que também podem responder
11 a estímulos térmicos, químicos e mecânicos de alta intensidade, sendo o principal
12 tipo de fibra ativada pela capsaicina, um agonista conhecido do canal TRPV1 (Braz
13 *et al.*, 2014; Todd, 2010).

14 O corpo celular desses neurônios aferentes primários está localizado
15 no DRG ou no gânglio trigeminal, e suas projeções vão para lâminas do corno dorsal
16 da medula espinal, variando de acordo com o tipo de fibra envolvida (Braz *et al.*,
17 2014; Todd, 2010). Por exemplo, enquanto as fibras C e $A\delta$ conduzem as
18 informações nociceptivas em direção às lâminas superficiais de Rexed (I, II e V) do
19 corno dorsal da medula espinal, as fibras mielinizadas $A\alpha$ e $A\beta$ transmitem as
20 informações da periferia em direção às lâminas III e IV (Braz *et al.*, 2014; Todd,
21 2010).

22 De forma geral, a informação dolorosa é transmitida pelas fibras
23 nervosas, no sistema nervoso periférico (SNP), em direção ao córtex
24 somatossensorial, no sistema nervoso central (SNC), através dos processos de
25 transdução, transmissão, modulação e percepção, ilustrados na **Figura 2**.

26

1 **Figura 2 - Processos e componentes fundamentais das vias de nocicepção e dor.**



Fonte: Adaptado de Da Silva *et al.*, 2023 e Ji, 2023.

Na etapa de transdução, o estímulo nocivo, detectado através de canais e receptores expressos na membrana neuronal, é convertido em sinais químicos teciduais, que por sua vez, são transformados em atividade elétrica nos neurônios (influxo de íons como o Na^+ e Ca^{2+} que resultam em potencial de ação). Em seguida, essa atividade elétrica é transduzida em eventos químicos nas sinapses (liberação de neuropeptídeos e neurotransmissores) (Yam *et al.*, 2018). Ou seja, a estimulação de receptores ionotrópicos e metabotrópicos expressos na membrana neuronal geram alterações em sua permeabilidade, levando a modificações nas cargas iônicas da fibra nociceptiva em uma intensidade que ultrapasse o limiar de ativação, um processo denominado de “despolarização” (Basbaum *et al.*, 2009).

Em seguida, na etapa de transmissão, há propagação da informação oriunda da periferia, através das fibras nociceptivas, em direção ao corno dorsal da medula espinal. Na medula espinal, há comunicação entre o neurônio nociceptivo de primeira ordem (periférico) e o neurônio nociceptivo de segunda ordem (central, localizado na medula espinal), a qual pode ser mediada por neurotransmissores excitatórios (glutamato e acetilcolina, por exemplo), neuropeptídeos (SP e CGRP) e

citocinas (TNF- α e IL-1 β) que são liberados pelo neurônio nociceptivo primário e células da glia presentes na fenda sináptica, permitindo a propagação do impulso nervoso (Braz *et al.*, 2014; Scholz; Woolf, 2002).

Na etapa de modulação, as vias descendentes controlam a transmissão de impulsos no corno dorsal da medula espinal, conferindo mecanismos inibitórios da dor. Outras regiões centrais participam deste processo de modulação, como a área cinzenta periaquedutal do mesencéfalo, a qual projeta-se primeiramente para o bulbo rostroventral e então, através do funículo posterolateral da medula espinal, para o corno dorsal, local em que promoverá a liberação de serotonina e encefalina, as quais atuam sobre interneurônios, inibindo a descarga neuronal espinotalâmica. Além do mais, a ativação dos interneurônios inibitórios, inclusive daqueles localizados no corno dorsal da medula espinal, contribui para a liberação de GABA, glicina, canabinóides e β -endorfina, por exemplo, permitindo a limitação da despolarização dos nociceptores ativados (Hughes; Todd, 2020; Millan, 1999; Yam *et al.*, 2018).

A partir disso, com a propagação do impulso nervoso, o neurônio nociceptivo de segunda ordem no corno dorsal da medula espinal, um neurônio de projeção, irá transmitir informações sensoriais ao neurônio nociceptivo de terceira ordem localizado no tálamo, atingindo o córtex somatossensorial através do trato espinotalâmico (Millan, 1999; Yam *et al.*, 2018). A percepção se refere a propagação da informação referente ao estímulo inicial, por meio de sinapses no córtex somatossensorial, que geram informações quanto a localização e a intensidade do estímulo nocivo. Ainda, sabe-se que também ocorrem sinapses na região da amígdala, uma estrutura cerebral reconhecida pelo processamento e regulação de nossas emoções, demonstrando como o componente emocional pode influenciar significativamente na forma como percebemos e respondemos a um estímulo doloroso (Basbaum *et al.*, 2009; Braz *et al.*, 2014).

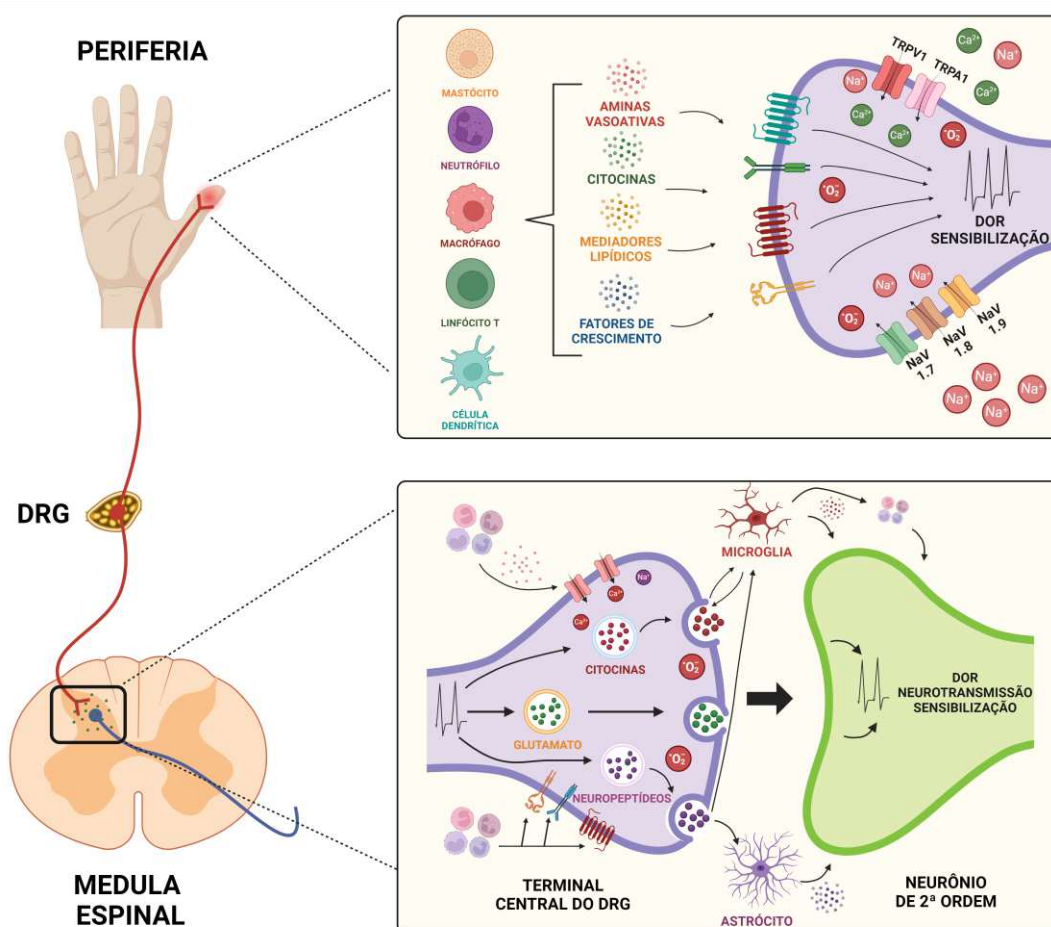
1.2.1 Dor inflamatória

A dor pode ser categorizada baseada nos diferentes sintomas, mecanismos e síndromes. Desse modo, a dor pode ser classificada pelo tipo (nociceptiva, inflamatória, idiopática ou psicogênica), pela duração (aguda e crônica) e pela severidade (leve, moderada ou severa) (Yam *et al.*, 2018).

A dor inflamatória é decorrente da ativação neuronal nociceptiva por

mediadores liberados por células imunes e teciduais no foco inflamatório. Assim como as células imunes residentes, os nociceptores são uma das primeiras células a responder prontamente a patógenos e injúrias teciduais. Enquanto por um lado, as células imunes liberam mediadores inflamatórios que modulam a atividade neuronal e resultam em hipersensibilidade, por outro, os nociceptores liberam neuropeptídeos e neurotransmissores que modulam a atividade das células imunes. Ainda, durante o processo inflamatório, a presença de células imunes e a liberação de mediadores pode reduzir o limiar de ativação neuronal, facilitando o impulso nervoso, um processo designado de “sensibilização”, melhor explicado posteriormente. Contudo, com a resolução do processo inflamatório, a dor tende a diminuir. Desta maneira, a dor inflamatória é um clássico exemplo de interação neuro-imune (**Figura 3**).

Figura 3 – Interações neuro-imunes nos terminais nervosos periféricos e centrais no contexto da dor inflamatória.



Fonte: Adaptada de Pinho-Ribeiro; Verri; Chiu, 2017; Baral; Udit; Chiu, 2020.

Em linhas gerais, os terminais nervosos periféricos dos nociceptores expressam uma ampla gama de receptores e canais iônicos que podem detectar os diversos mediadores moleculares gerados pelas células inflamatórias (Pinho-Ribeiro; Verri; Chiu, 2017). Estes receptores detectam citocinas, lipídeos e fatores de crescimento derivados do microambiente inflamatório, como é o caso do receptor da IL-1 (IL-1R), do TNF- α (TNFR), da IL-6 (gp130), das prostaglandinas (EP1-4), do LTB₄ (BLT1) e do NGF (TrkA), por exemplo. Após ativação, estes receptores desencadeiam cascatas de sinalização que envolvem o NF- κ B, a MAPK, a PI3K, a PLC, a PKA e a PKC, por exemplo, cujas atividades modificam as propriedades de ativação dos canais iônicos expressos na membrana neuronal. Dentre os canais, há os membros da classe dos receptores de potencial transitório (TRPs), como TRPA1, TRPV1 e TRPM8, e os canais de sódio dependentes de voltagem (Nav), que incluem os membros Nav1.7, Nav1.8 e Nav1.9, críticos para a modulação e indução da despolarização dos neurônios nociceptivos (Pinho-Ribeiro; Verri; Chiu, 2017).

As células imunes presentes no foco inflamatório promovem a liberação de diversos mediadores, dentre eles a IL-5, IL-6, IL-8, TNF- α , IL-1 β , ET-1, NGF, bradicinina, serotonina, histamina, LTB₄ e PGE₂, os quais atuam sobre seus receptores cognatos na membrana neuronal, levando ao aumento do disparo e subsequente sensibilização. De modo geral, a sensibilização neuronal se refere ao aumento da capacidade de resposta dos neurônios nociceptores à entrada aferente normal ou subliminar, esta que é resultante da exposição prolongada a estes mediadores pró-inflamatórios, havendo alterações na plasticidade neuronal, geralmente associada ao aumento na expressão de receptores e canais iônicos (Eijkelkamp *et al.*, 2010; Ferrari *et al.*, 2012; Marchand; Perretti; McMahon, 2005). O neutrófilo é uma das células imunológicas que possui papel crucial no desenvolvimento da dor inflamatória. Isto porque, além da rápida migração para o sítio inflamatório, a ativação destas células promove uma expressiva produção de citocinas importantes para o processo de sensibilização nociceptiva, como IL-1 β , TNF- α e IL-33 (Verri *et al.*, 2006). A alarmina IL-33 induz a produção sequencial de mediadores inflamatórios, deste modo, a partir dela, há produção de TNF- α que leva a produção de IL-6 (IL-33 $\rightarrow$ TNF- α $\rightarrow$ IL-6), que por sua vez, inicia a cascata que dará origem a IL-1 β , uma importante citocina pró-hiperalgésica que induz ativação de COX-2, resultando na produção de PGE₂ (IL-6 $\rightarrow$ IL-1 β $\rightarrow$ PGE₂) (Cunha *et al.*, 2005; Verri *et al.*, 2006). Ainda, a indução de TNF- α pela IL-33, também induz a

1 produção de CXCL1, que por sua vez, induz IL-1 β e resulta na liberação de aminas
2 simpáticas, como a histamina (TNF- α $\rightarrow$ CXCL1 $\rightarrow$ IL-1 β $\rightarrow$ aminas simpáticas)
3 (Cunha *et al.*, 2005; Verri *et al.*, 2006). Estas moléculas liberadas no microambiente
4 inflamatório se ligam aos seus receptores específicos e ativam proteínas quinases,
5 as quais irão fosforilar canais iônicos e ativar/sensibilizar os nociceptores (Braz *et al.*,
6 2014; Scholz; Woolf, 2002).

7 Assim, resumidamente, a sensibilização periférica é decorrente da
8 liberação de mediadores inflamatórios pelas células imunes no foco de lesão
9 tecidual, o que induz vias de sinalização em nociceptores aferentes, aumentando a
10 sensibilidade a estímulos mecânicos e térmicos. Esta sinalização induzida altera as
11 propriedades de condutância da membrana, além de modular a atividade dos canais
12 TRP e Nav (Pinho-Ribeiro *et al.*, 2017). De forma semelhante, a sensibilização
13 central resulta no aumento de entradas aferentes nociceptivas, culminando em
14 modificações moleculares e bioquímicas a nível espinal, levando à
15 hipersensibilidade. A sensibilização periférica e/ou central leva ao surgimento da
16 hiperalgesia (resposta acentuada frente a um estímulo doloroso de natureza
17 mecânica ou térmica, por exemplo), da alodinia (resposta a estímulos naturalmente
18 não-dolorosos, como o toque ou o movimento normal das articulações) ou da dor
19 espontânea (determinado estímulo externo é capaz de induzir a ativação neuronal
20 por si só, como o ácido acético e a formalina) (Fattori, 2016).

21 Todavia, as células imunes também atuam a nível central, dentro do
22 corno dorsal da medula espinal, seja no terminal pré-sináptico (DRG) quanto no
23 terminal pós-sináptico (interneurônios). Na medula espinal, há células residentes
24 como a micróglia, uma importante célula imunológica da glia, além de outras células
25 como oligodendrócitos, astrócitos e linfócitos T infiltrantes, por exemplo. Na dor
26 inflamatória crônica ou neuropática, os nociceptores podem promover a ativação da
27 micróglia mediante liberação de ATP, CCL2, TNF- α e CGRP. Por sua vez, a
28 ativação desta célula glial gera mediadores inflamatórios como IL-1 β , TNF- α , BDNF
29 e PGE₂, responsáveis por sensibilizar neurônios de 1ª e 2ª ordem, resultando em
30 sensibilização espinal (Pinho-Ribeiro; Verri; Chiu, 2017; Ji *et al.*, 2014). A micróglia
31 também promove a ativação de outras células gliais, como astrócitos e
32 oligodendrócitos, os quais passam a produzir CCL2, CXCL1 e IL-33, e assim,
33 também contribuem para o processo de sensibilização (Pinho-Ribeiro; Verri; Chiu,
34 2017; Ji *et al.*, 2014).

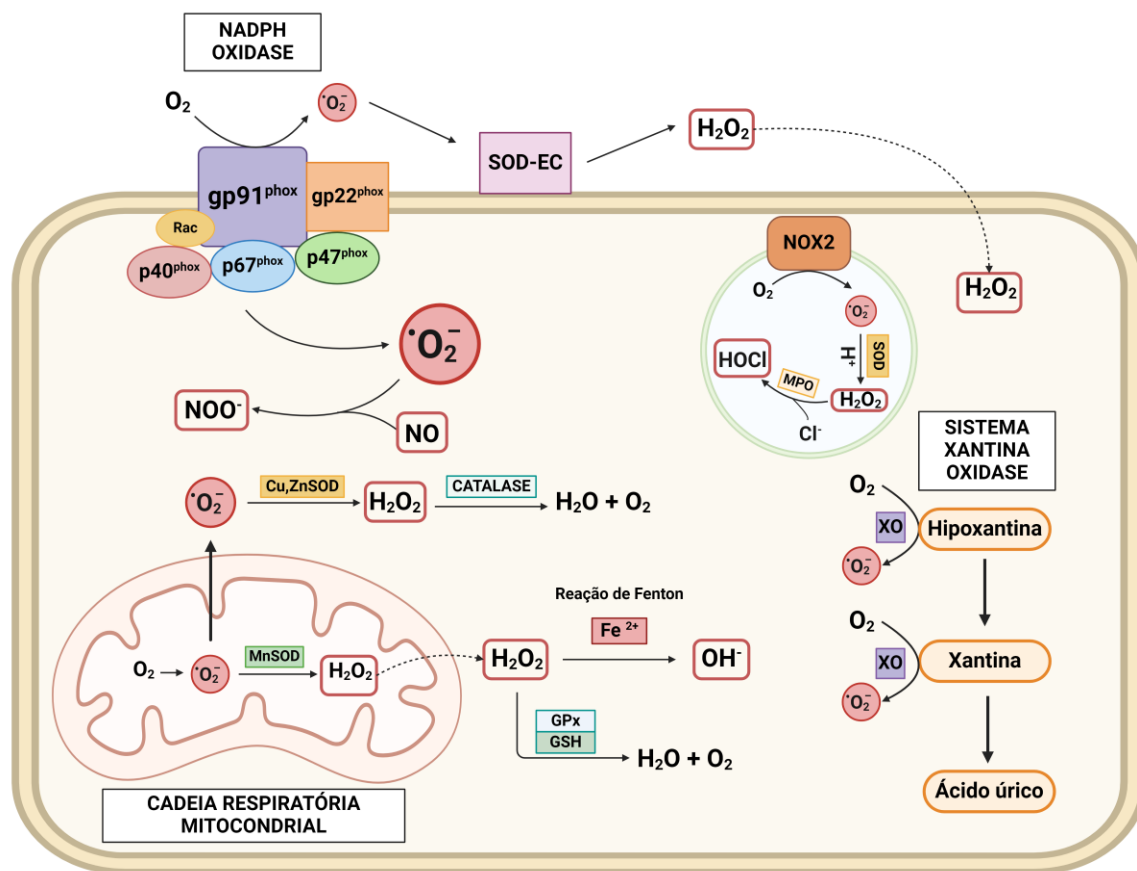
Deste modo, o processo de sensibilização periférica contribui para o aumento de entradas nociceptivas a nível espinal, culminando em alterações na plasticidade neuronal e resultando em sensibilização espinal, um processo que contribui para a cronificação da dor.

1.3 Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio

Os organismos aeróbicos evoluíram utilizando o oxigênio como acceptor de elétrons na respiração. O O_2 é de suma importância para o processo de respiração celular, uma vez que seu poder oxidante potencializa a conversão de energia presente nas ligações covalentes das moléculas de carbono em moléculas de ATP. No entanto, a grande capacidade oxidante do O_2 pode culminar em efeitos tóxicos para a integridade celular. A redução do O_2 nas células leva a formação contínua de intermediários altamente reativos que são capazes de alterar a estrutura e função de diversas biomoléculas importantes. Estes intermediários podem ser classificados como radicais livres ou não- radicais. O grupo de radicais livres inclui o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o radical hidroxila ($OH^{\bullet}$), o alcóxil ($RO^{\bullet}$), o óxido nítrico ($NO^{\bullet}$) e o radical peróxil ($ROO^{\bullet}$), por exemplo, que são caracterizados pela presença de um elétron não emparelhado. Já o grupo de não- radicais, apesar de derivados do oxigênio reativo, não possuem elétrons não emparelhados, e dentre seus membros há o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o oxigênio singlete (1O_2), o ácido hipocloroso ($HOCl$) e o peroxinitrito ($ONOO^-$) (Buetler; Krauskopf; Ruegg, 2004).

As ERO, como o $O_2^{\bullet-}$, são geradas principalmente através de atividade enzimática, mas também podem surgir por reações de auto-oxidação de gliceraldeídos, $FADH_2$, hormônios e neurotransmissores (Pinho-Ribeiro, 2014). Desta forma, focaremos na geração enzimática de ERO e ERN. Em linhas gerais, as ERO podem ser geradas por três fontes enzimáticas principais: a ETC; pela XO; e pela NADPH oxidase transmembrana (NOX) (Belambri *et al.*, 2018) (Ilustradas na **Figura 4**).

1 **Figura 4 – Gênese enzimática das Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio.**



Fonte: Autoria própria.

2

3

4 Na ETC, considerada a principal fonte de ERO, a geração de O₂^{•-}
 5 ocorre principalmente nos complexos I e III, os quais promovem a liberação de ERO
 6 para a matriz e interstício mitocondriais. O O₂^{•-} é convertido através da enzima
 7 superóxido dismutase dependente de manganês (MnSOD ou SOD2) em H₂O₂, que
 8 por sua vez, pode atravessar a membrana externa mitocondrial passivamente e,
 9 quando não metabolizado pela ação da superóxido dismutase citosólica (CuZnSOD
 10 ou SOD1), pode promover a ativação citosólica de fatores de transcrição sensíveis
 ao estado redox, como HIF-1α e NF-κB (Mittal *et al.*, 2014).

11

12 A ação da SOD mitocondrial tende a ser eficiente no controle e
 13 neutralização das ERO durante o processo de respiração celular, porém, em
 14 situações de estresse celular, como durante a resposta inflamatória, há um acúmulo
 15 de ERO mitocondrial devido ao aumento de demanda de ATP. Neste contexto, a
 16 exacerbação na produção de ERO pela ETC pode levar a alterações na homeostase
 17 do Ca²⁺ mitocondrial e promover a oxidação de componentes mitocondriais
 essenciais, como a cardiopilina, um fosfolípido dimérico com alto teor de ácidos

graxos insaturados que compõe a membrana interna mitocondrial (Jing *et al.*, 2023). A oxidação da cardiolipina altera a permeabilidade mitocondrial resultando na formação adicional de ERO, levando ao dano mitocondrial, liberação de espécies reativas para o citoplasma e fuga de DNA mitocondrial (mtDNA) através do poro de transição de permeabilidade mitocondrial e do canal aniônico dependente de voltagem. Uma vez no citoplasma, estes agentes oxidantes, quando não neutralizados por enzimas antioxidantes citoplasmáticas, podem culminar em danos oxidativos a outros componentes celulares, além de promoverem a ativação de vias de sinalização sensíveis ao redox (Jing *et al.*, 2023).

As ERO e ERN, e alguns mediadores pró-inflamatórios, como a bradicinina, podem promover a elevação nos níveis de Ca^{2+} intracelular através da ativação de canais e receptores que propiciem o influxo deste íon, como TRPV1 e os receptores ionotrópicos de N-metil-D-aspartato (NMDA), que promovem a elevação da concentração citosólica de Ca^{2+} e afetam a atividade de organelas intracelulares, como as mitocôndrias. O influxo de Ca^{2+} promove a ativação da PLC, a qual hidrolisa PIP_2 em DAG e IP_3 . DAG induz a atividade de PKC que fosforila canais TRP, como o TRPV1, e induz influxo de Ca^{2+} . Já o IP_3 promove secreção de Ca^{2+} do retículo endoplasmático via IP_3R , resultando em uma liberação adicional de Ca^{2+} no citoplasma (Duitama *et al.*, 2020). O aumento citosólico de Ca^{2+} gera disfunção mitocondrial, com liberação do citocromo c e ativação de proteases de aspartato dependentes de cisteína, as caspases (como a caspase 3), particularmente sensíveis ao estado redox celular, conduzindo à morte por apoptose. Além do mais, o alto poder reativo das ERO gera injúria a componentes que mantêm a integridade celular, como as membranas fosfolipídicas, cujo dano resulta em morte celular por necrose e indução da resposta inflamatória. Assim, este processo de desequilíbrio na homeostase do Ca^{2+} intracelular, comum em situações de estresse oxidativo, são amplamente associadas à inflamação e neurodegeneração (Duitama *et al.*, 2020).

No citoplasma, a geração de ERO pode ocorrer pela atividade da XO, uma enzima solúvel de alto peso molecular importante para o metabolismo de purinas no organismo que, de modo geral, promove a oxidação de hipoxantina em xantina e, então, em ácido úrico. Esta enzima pode apresentar duas isoformas, a XO propriamente dita e a XDH. A XO catalisa a oxidação de hipoxantina em ácido úrico em uma reação que produz $\text{O}_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 a partir de O_2 . Já a XDH utiliza NAD^+ como cofator, resultando na redução de NAD em NADH^+ (Shibuya *et al.*, 2021).

No citosol, o $O_2^{\bullet-}$ também pode promover a liberação de Fe(II) dos grupos Fe-S presentes em determinadas proteínas. Este aumento na concentração de Fe(II) no citoplasma favorece a reação de Fenton, em que H_2O_2 , que ainda não sofreu a atividade enzimática da catalase, é convertido em $OH^{\bullet}$ (Keyer; Imlay, 1996). Por sua vez, o H_2O_2 também promove a elevação de Fe(II) livre proveniente dos grupamentos heme, o que favorece a geração de $OH^{\bullet}$ (Halliwell; Gutteridge, 1986). Ainda, a interação entre $O_2^{\bullet-}$ e NO culmina na formação de $ONOO^-$, uma importante ERN (Little *et al.*, 2010). Enquanto as ERO promovem a oxidação de componentes celulares, as ERN promovem danos nitroxidativos através das reações de nitrolisação, em que o NO reage de forma reversível com grupamentos tiol ou metais, e nitração, em que há introdução irreversível de um ou mais grupos nitro (NO_2) em uma molécula orgânica. Um exemplo, é o NO derivado da iNOS que promove nitração de resíduos de tiol de proteínas, resultando em alterações na estrutura proteica e função biológica, como ocorre com a enzima COX-2, aumentando sua atividade em macrófagos (Salvemini *et al.*, 2013).

Os membros da família NOX são complexos enzimáticos constitutivos ligados à membrana e consistem em diferentes subunidades, cuja função majoritária é a produção de ERO. Os membros desta família variam de acordo com a composição das subunidades e padrões de expressão, possuindo 7 membros no total: NOX1-5 e as oxidases duplas DUOX1 e DUOX2, importantes geradoras de $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 pela redução do O_2 (Kallenborn-Gerhard *et al.*, 2022). NOX2, originalmente identificada em neutrófilos, é um dos membros mais bem caracterizados da família NOX e apresenta papel essencial na resposta inflamatória, assim, descreveremos em mais detalhes este subtipo de NADPH oxidase. De forma geral, o complexo enzimático NOX2 é composto por subunidades transmembrana, que incluem gp91^{phox} e a subunidade reguladora p22^{phox} (também denominados de flavocitocromo b₅₅₈), três subunidades citoplasmáticas que incluem p40^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox}, e a pequena proteína de ligação Rho GTP (Rac1 ou Rac2) (Belambri *et al.*, 2018; Eid *et al.*, 2022). Em repouso, essas subunidades ficam dissociadas, porém, mediante ativação, a fosforilação do complexo por proteínas quinases, leva a translocação das subunidades citosólicas em direção às subunidades transmembrana, mudança conformacional que resulta em transporte de elétrons e redução de O_2 (Belambri *et al.*, 2018).

As NOX1-4 compartilham certa homologia estrutural, uma vez que

1 todos estes complexos requerem a interação com a subunidade reguladora p22^{phox}
2 para produzir efetivamente as ERO. Já NOX5 não requer p22^{phox} e, juntamente com
3 DUOX1 e DUOX2, são complexos dependentes de cálcio, uma vez que apresentam
4 quatro locais de ligação para o Ca²⁺ em sua porção citoplasmática N-terminal.
5 Curiosamente, NOX5 é expressa apenas em mamíferos superiores, como os
6 humanos, e ausentes em ratos e camundongos (Eid *et al.*, 2022). Sob condições
7 fisiológicas, as NOX são mantidas em níveis basais de ativação, importantes para a
8 regulação da sinalização redox de moléculas alvo, sendo importantes para
9 processos como diferenciação, proliferação e apoptose celular, por exemplo.
10 Contudo, em condições de estresse, como na inflamação, a constante ativação da
11 NOX contribui para a persistência do processo inflamatório.

12 Fisiologicamente, as ERO e ERN são mantidas em baixas
13 concentrações por sistemas antioxidantes que incluem antioxidantes não-
14 enzimáticos e enzimáticos. Os antioxidantes não-enzimáticos incluem a vitamina C
15 (ácido ascórbico), vitamina E (α -tocoferol), β -caroteno e flavonóides, como a
16 quercetina (Maioli *et al.*, 2015; Weydert; Cullen, 2010). E dentre os antioxidantes
17 enzimáticos podemos citar os três principais tipos de antioxidantes intracelulares em
18 células de mamíferos: a SOD, a catalase e a GPx (**Figura 4**). Há três tipos de SOD:
19 a SOD dependente de cobre-zinco (Cu,ZnSOD ou SOD1), localizada no citoplasma
20 e núcleo, a SOD dependente de manganês (MnSOD/SOD2), localizada nas
21 mitocôndrias e a SOD extracelular (EC-SOD ou SOD3), expressa extracelularmente
22 e distribuída na matriz extracelular de diversos tecidos (Zelco, Mariani, Folz, 2002).
23 Estas enzimas apresentam a função comum de dismutarem o O₂^{•-} em um
24 intermediário mais estável, o H₂O₂ que pode atravessar passivamente membranas
25 celulares (Chaumont, 2014; Weydert; Cullen, 2010; Bienert; Zelko; Mariani; Folz,
26 2002). Assim, as SODs convertem o O₂^{•-} em H₂O₂, enquanto as catalases e
27 peroxidases convertem H₂O₂ em H₂O e O₂. É importante ressaltar que a atividade
28 antioxidante da GPx requer enzimas secundárias, como a glutathiona (GSH) para
29 funcionar adequadamente (Weydert; Cullen, 2010).

30 Desta forma, em uma situação homeostática, a produção destes
31 radicais livres ocorre em baixos níveis, evitando seus efeitos deletérios. Contudo, em
32 determinadas situações, como a hipóxia e o processo inflamatório, há uma produção
33 e liberação exacerbada de ERO e ERN, excedendo a capacidade antioxidante do
34 organismo e resultando na instauração do denominado estresse oxidativo. O

estresse oxidativo pode ser definido como “um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes em favor dos oxidantes, levando a uma interrupção da sinalização e controle redox acompanhado ou não de dano molecular” (Sies, 2015).

Geralmente o aumento exacerbado dos níveis de espécies reativas é acompanhado do surgimento de danos à componentes moleculares. Dentre os danos mais comuns há a peroxidação das membranas lipídicas, a oxidação de aminoácidos e lesões ao material genético. A peroxidação lipídica resulta da interação das ERO com as duplas ligações dos ácidos graxos insaturados que compõem a membrana fosfolipídica, resultando na produção de peróxidos, que por sua vez, iniciam uma reação catalítica em cadeia levando a modificações oxidativa das membranas e, danos a organelas intracelulares. Os aminoácidos são oxidados em sua cadeia lateral, levando a formação de ligações cruzadas entre proteínas e oxidação da estrutura principal da proteína, resultando em fragmentação proteica. Por fim, os danos ao DNA derivam da reação entre radicais livre e bases nitrogenadas, como a timina, no DNA nuclear e mitocondrial, levando a rupturas nos filamentos de DNA (Kumar; Abbas; Fausto, 2005; Slimen *et al.*, 2014).

1.3.1 As ERO e ERN no contexto de inflamação e dor

Além de ser a etapa inicial da produção das demais espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, a geração do $O_2^{\bullet-}$ influencia em diversas vias de sinalização celular, contribuindo significativamente para a fisiopatologia de diversas doenças inflamatórias, como a aterosclerose, o Diabetes Mellitus 1 e a Artrite Reumatóide (Wang *et al.*, 2004). Estudos que empregam o uso de miméticos da SOD, como o tempol e M40403, promovem a redução da dor e inflamação pela inibição de $O_2^{\bullet-}$, demonstrando a importância desta espécie reativa para o desenvolvimento da dor inflamatória (Yamacita-borin *et al.*, 2015).

Durante a fase inicial da inflamação, o aumento da produção de $O_2^{\bullet-}$ por células residentes e teciduais no local da injúria promove o aumento da permeabilidade vascular e a ativação endotelial, contribuindo para o processo de recrutamento leucocitário (Chen *et al.*, 2011; Maitra *et al.*, 2009; Pacquelet *et al.*, 2007; Sharma *et al.*, 2009). Por sua vez, os neutrófilos e macrófagos recrutados produzem grandes quantidades de $O_2^{\bullet-}$ via NOX2 (Henderson; Chappel, 1996; Mittal *et al.*, 2014). Neste contexto, a NOX2 tem sua ativação induzida pela histamina, IL- 1β , TNF- α e VEGF, por exemplo, as quais induzem a ativação de Rac1, esta que por

1 sua vez, promove a ligação $p67^{phox}$ ao flavocitocromo b_{558} , resultando na formação
2 funcional deste complexo multiproteico (Mittal *et al.*, 2014). Durante a explosão
3 respiratória de neutrófilos ativados, o H_2O_2 , gerado a partir do $O_2^{\bullet-}$, pode ser
4 convertido em ácido hipocloroso (HOCl) na presença da MPO (Lei *et al.*, 2015),
5 reação essencial para a função microbicida destes fagócitos (**Figura 4**).

6 A estimulação de TLR4 e IL-1R desencadeia cascatas fosforilativas
7 semelhantes, levando a transcrição de mediadores inflamatórios (Maitra *et al.*, 2009;
8 Pacquelet *et al.*, 2007). Através da indução via LPS, por exemplo, estas vias
9 transduzem sinais através de IRAK1/4 que ativa o complexo TAB1/TAK1, ativando
10 MAPKs (p38, ERK e JNK) e, em seguida, o fator AP-1. Além disso, essa via também
11 pode ativa IKK que fosforila a proteína inibitória $IKB\alpha$, induzindo sua ubiquitinação e
12 degradação proteassômica, resultando na translocação do fator NF- κ B em direção
13 ao núcleo. Como resultado, a ativação dessa via pelo $O_2^{\bullet-}$ leva a expressão de
14 diversos mediadores pró-inflamatórios (COX-2, IL-6, TNF- α e IL-1 β), amplificando a
15 resposta imune inata (**Figura 5**). Ademais, a IRAK1/4 pode interagir diretamente e
16 indiretamente com NOX1/2, ocasionando a ativação de Rac1, a migração da
17 subunidade $p47^{phox}$ e a fosforilação direta da subunidade $gp91^{phox}$, ou promover a
18 ativação de PKC, levando a produção de $O_2^{\bullet-}$ (Maitra *et al.*, 2009; Pacquelet *et al.*,
19 2007).

20 Como mencionado anteriormente, a disfunção mitocondrial,
21 resultante do aumento exacerbado na produção de ERO, leva ao vazamento de
22 mtDNA para o citoplasma e culmina na ativação de vias de sinalização pró-
23 inflamatórias. Como exemplo, o mtDNA pode ativar cGAS e ativar a via STING-NF-
24 κ B, resultando na produção de citocinas pró-inflamatórias. Ainda, a sequência CpG
25 hipermetilada no mtDNA é reconhecida pelo TLR9 endossomal, o qual medeia a via
26 do NF- κ B, levando a expressão de IL-1, IL-6 e TNF- α (Jing *et al.*, 2023). Outro ponto
27 interessante, é que a oxidação do mtDNA (OX-mtDNA) no citosol pode promover a
28 ativação de AIM2, que em conjunto com a presença de ERO citoplasmáticas,
29 promove a formação dos complexos do inflamassoma NLRP3-ASC/Caspase-1,
30 culminando na clivagem e ativação da caspase-1 madura, com posterior geração de
31 IL-1 β e IL-18 (Little *et al.*, 2012).

32 Nesse sentido, a XO também pode ativar a via do inflamassoma,
33 uma vez que gera tanto as ERO quanto o ácido úrico (AU), um produto de sua
34 reação catalítica. De forma geral, os cristais de AU gerados pela XO podem atuar

1 como alarminas, quando liberados em meio extracelular em decorrência de um
2 evento necrótico, por exemplo, e assim ativar a via TLR4/MyD88/TRAF6/NF- κ B,
3 resultando na produção de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 β (Nunes *et al.*,
4 2022). Ainda, o processo de internalização dos cristais de AU pelo processo de
5 fagocitose pode ser ineficiente, uma vez que os cristais induzem desestabilização
6 física das membranas lisossômicas durante a fusão entre vacúolo fagocítico e
7 lisossomo. Essa desestabilização gera ruptura da membrana lisossômica e liberação
8 de proteases para o meio intracelular, como a catepsina B, que associada ao efluxo
9 de K⁺ e presença de ERO no citosol, promove a oligomerização e montagem do
10 inflamassoma NLRP3 (Nunes *et al.*, 2022). Assim, a ativação de NLRP3 leva à
11 clivagem de pró-caspase 1 em caspase 1 ativa, responsável por gerar IL-1 β e IL-18
12 ativos (Nunes *et al.*, 2022). A XDH também contribui para a resposta inflamatória
13 promovendo o aumento de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , TNF- α e IFN- γ) (Cantu-
14 Medellin; Kelley, 2013; Kuwabara *et al.*, 2003). Curiosamente, a atividade de
15 XO/XDH pode ser induzida por IFN- γ e tem relação direta com a ativação do NF- κ B,
16 migração de polimorfonucleares e expressão de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e
17 IL-1 β) (Komaki *et al.*, 2005), contribuindo para o estresse oxidativo.

18 As ERO e ERN também contribuem significativamente para o
19 desenvolvimento da dor patológica. Modelos empregando doadores de ânion
20 superóxido, como o superóxido de potássio (KO₂), demonstram que esta espécie
21 reativa pode promover o surgimento hiperalgesia mecânica e térmica, e
22 comportamentos de dor manifesta através da modulação imune, demonstrando a
23 importância do estresse oxidativo para a fisiopatologia da dor inflamatória (Maioli *et*
24 *al.*, 2015; Serafim *et al.*, 2015; Yamacita-Borin *et al.*, 2015). Ainda, alguns trabalhos
25 evidenciaram que as células neuronais dos mamíferos possuem sistemas de defesa
26 antioxidantes enfraquecidos quando comparadas a outros tipos celulares. Além
27 disso, o alto teor fosfolipídico e de mitocôndrias axonais tornam os neurônios
28 especialmente suscetíveis às ações oxidativas das ERO e ERN (Carrasco *et al.*,
29 2018). Assim, a inflamação contribui significativamente para a modulação da
30 atividade neuronal via ERO e ERN.

31 As ERO podem atuar como componentes importantes da
32 nocicepção e dor, visto que podem tanto ativar quanto sensibilizar nociceptores.
33 Sabe-se que a produção de O₂^{•-} mitocondrial é aumentada nas lâminas superficiais
34 (I e II) do corno dorsal da medula espinal em modelos de dor inflamatória e

neuropática (Lee *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2006; Schwartz *et al.*, 2008; Schwartz *et al.*, 2009). Por um lado, a ativação de células inflamatórias, neurônios nociceptivos e células da glia levam a uma maior síntese e liberação de $O_2^{\bullet-}$ e $NO^{\bullet}$ no corno dorsal da medula espinal, amplificando o estresse oxidativo e consequentemente auxiliando na persistência da dor (Milligan; Watkins, 2009). Por outro, a geração de $O_2^{\bullet-}$ e NOO^- podem levar à ativação endotelial, com aumento da permeabilidade microvascular, estimulando o recrutamento leucocitário de polimorfonucleares e a produção de mediadores pró-inflamatórios, eventos que contribuem de forma indireta para o desenvolvimento e manutenção da dor inflamatória (Maitra *et al.*, 2009; Pacquelet *et al.*, 2007), demonstrando que este processo é uma via de mão dupla (**Figura 5**). Ainda, o NOO^- contribui para potencialização de longo prazo, que se refere ao aumento das respostas pós-sinápticas durante períodos prolongados, decorrente da nitração de transportadores de glutamato, como o transportador de glutamato 1 (GLT-1), evitando a remoção deste neurotransmissor da fenda sináptica e influenciando positivamente no disparo neuronal (Little *et al.*, 2012).

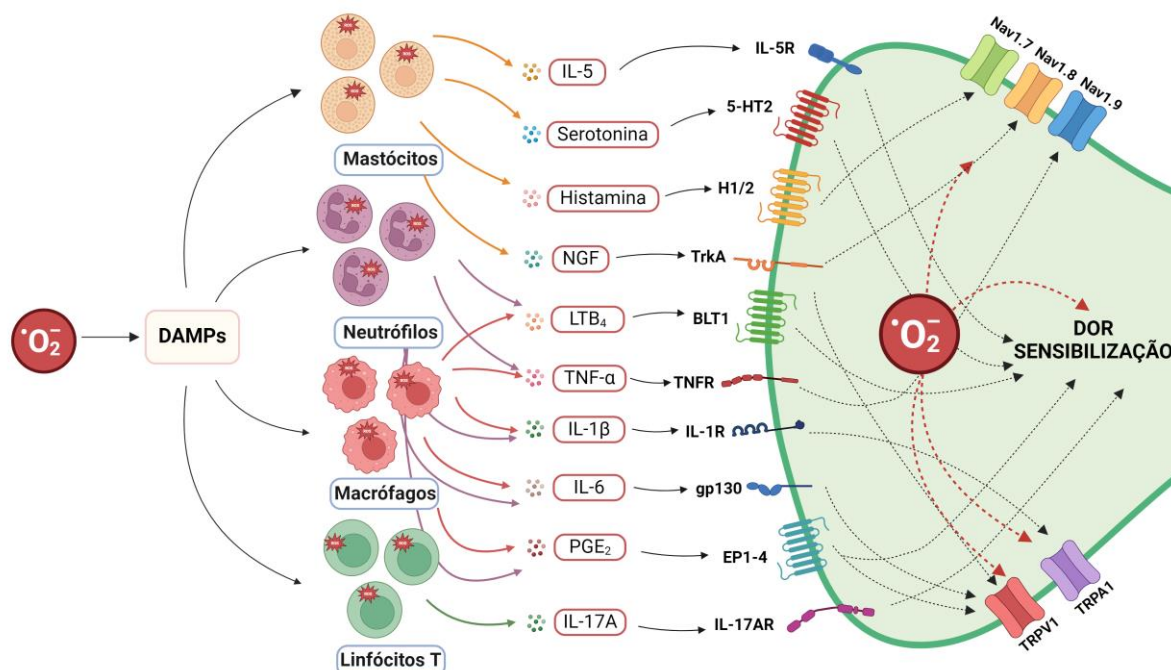
Um efeito modulador chave das ERO e ERN sobre os neurônios nociceptivos é a capacidade de realizar modificações redox nos grupos tiol livres em canais iônicos, como os canais TRP (**Figura 5**). Já foram identificados seis canais pertencentes à família TRP que são particularmente sensíveis ao estado redox celular: TRPA1, TRPC4, TRPC5, TRPV1, TRPV4 e TRPM2 (Carrasco *et al.*, 2018). Considerando a relevância do TRPV1 para a fisiopatologia da dor inflamatória e que, dentre os canais citados, este é o que mais parece suscetível às modificações redox, o abordaremos com mais detalhes neste tópico.

O TRPV1, também denominado de VR1 ou receptor de capsaicina, é expresso em diversos tipos celulares e responsivo à uma ampla gama de estímulos, como temperaturas nocivas ($>43^{\circ}C$), baixo pH ($<5,9$), produtos da lipooxigenase (LOX) e agentes químicos, como a capsaicina e resiniferatoxina (Maximiano *et al.*, 2024). A oxidação de proteínas mediada pela atividade de ERO geralmente afetam os aminoácidos Cys, Tyr e Met. Porém, o meio mais comum pelo qual as ERO atuam sobre os canais TRP envolve a modificação redox de resíduos cisteína. A cisteína (Cys) é um aminoácido que contém enxofre (S) e atua como fonte do sistema redox tiol, funcionando como fonte de diversos antioxidantes, como GSH, GPx e ácido α -lipóico (Carrasco *et al.*, 2018). Consequentemente, os grupos cisteína tornam-se alvos de ERO e ERN. Neste sentido, foi demonstrado que o TRPV1

apresenta resíduos de cisteína localizados intra e extracelularmente, porém os resíduos Cys afetados por ERO parecem estar localizados preferencialmente na porção intracelular (Piciu *et al.*, 2023). Metodologias eletrofisiológicas e de espectro de massa auxiliaram na determinação de alguns dos resíduos Cys mais afetados pela ação oxidante das ERO, distribuídos na porção N-terminal do canal (Cys391, Cys387, Cys363, Cys258, Cys158, Cys125, Cys63, Cys73 e Cys21), na porção C-terminal (Cys716, Cys742 e Cys767) e na região do poro do canal (Cys621 e Cys635) (Piciu *et al.*, 2023; Ogawa *et al.*, 2016). Ainda, foi proposto que há um efeito duradouro resultante da oxidação do TRPV1 que se refere a formação de ligações dissulfeto intercisteína (como entre Cys23-Cys45), que parecem facilitar a ativação do canal (Naziroglu; Braid, 2017). Desta forma, o influxo de Ca^{2+} gerado pela ativação do canal, contribui para a ativação neuronal e posterior sensibilização. Além disso, as ERN também podem levar ao aumento da expressão e atividade de TRPV1 através do processo de nitrosilação (Ogawa *et al.*, 2016).

Outra forma de ativação do TRPV1 em neurônios via ERO ocorre pela ativação de proteínas quinases. As ERO podem induzir a translocação de PKC ϵ para a membrana plasmática, modulando positivamente a sinalização via TRPV1, e levando ao aumento de sua atividade (Kallenborn-Gerhardt *et al.*, 2022). Tal afirmação foi confirmada por trabalhos que evidenciaram que animais knockout para NOX1 apresentam hiperalgesia atenuada quando comparados a animais selvagens (Kallenborn-Gerhardt *et al.*, 2022). O aumento na expressão da NOX neuronal parece ser induzido por NGF, este que ativa Rac1 e aumenta a expressão de gp91^{phox}, resultando no aumento da expressão de TRPV1 via NOX. A via de sinalização por detrás deste efeito do NGF é a ativação da PKC e MAPK a jusante da ativação do TrkA, induzindo a expressão adicional de TRPV1 e subsequente aumento de hiperalgesia mecânica e térmica (Naziroglu *et al.*, 2020). Corroborando com estas informações, antagonistas farmacológicos de TRPV1 suprimem a produção de espécies reativas e citocinas pró-inflamatórias (Naziroglu *et al.*, 2020), evidenciando de forma consistente a importância deste canal na dor induzida por ERO.

1 Figura 5 – As ERO e ERN na dor e inflamação.



Fonte: Adaptado de Pinho-Ribeiro; Verri; Chiu, 2017 e Carrasco *et al.*, 2018.

1.4 Modelo de dor e inflamação induzido por Ânion Superóxido de Potássio (KO_2)

O modelo experimental animal induzido por KO_2 , um doador de $\text{O}_2^{\bullet-}$, foi padronizado por nosso grupo de pesquisa e tem demonstrado eficiência na indução de parâmetros de dor e inflamação mediada por uma ERO (Maioli *et al.*, 2015). O KO_2 é eficiente em promover a ativação neuronal e sensibilização periférica e central, levando ao desenvolvimento de hiperalgesia, alodinia e dor manifesta. Além disso, induz a ativação de vias de sinalização, como a do NF- κ B, PI3K e MAPKs (p38, ERK e JNK), gera aumento na expressão de enzimas, como a COX-2 e, conseqüentemente, promove a produção e liberação de mediadores pró-inflamatórios, como aminas vasoativas, citocinas, quimiocinas, eicosanóides, ERO e ERN (Carvalho, 2014; Maioli *et al.*, 2015; Lorenzo-Gonzalez *et al.*, 2019; Pinho-Ribeiro *et al.*, 2016; Serafim *et al.*, 2015; Yamacita-Borin *et al.*, 2015). A produção destes mediadores promove ativação celular local, vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, ativação de moléculas de adesão, levando ao surgimento do edema e recrutamento leucocitário (neutrófilos e macrófagos), por exemplo.

Os parâmetros de dor e inflamação induzidos pelo KO_2 são dependentes de mecanismos que envolvem a COX-2, TNF- α e ET-1. Maioli e

colaboradores (2015) demonstraram que o uso do inibidor seletivo de COX-2, celecoxibe, inibe os comportamentos nociceptivos de hiperalgesia mecânica e de dor manifesta desencadeados pela administração de KO₂. Evidenciando que a nocicepção induzida por este agente químico é dependente da geração de prostaglandinas via COX-2. Yamacita-Borin e colaboradores (2015) demonstraram em seu trabalho que a injeção de KO₂ induz hiperalgesia mecânica, comportamentos de dor manifesta (contorções abdominais, sacudidas e lambidas de pata), recrutamento de neutrófilos e o desenvolvimento de estresse oxidativo (aumento nos níveis de O₂^{•-}, redução no GSH e peroxidação lipídica). Neste estudo, o uso de animais knockout para TNFR1 ou aplicação de Etanercept, um fármaco bloqueador de TNF-α, demonstraram que o O₂^{•-} aumenta a produção de TNF-α, induzindo o estresse oxidativo de maneira dependente de TNFR1. Assim, o KO₂ gera um ciclo de feedback positivo em que, por um lado, o O₂^{•-} leva a produção de TNF-α, e por outro, esta citocina desencadeia a produção endógena desta ERO. Desta forma, o KO₂ pode promover a ativação e sensibilização neuronal via TNF-α, que pode atuar indiretamente através da produção de PGE₂ e diretamente através do receptor TNFR1, resultando em dor. Além disso, o TNF-α induz o recrutamento de neutrófilos, ativa sistemas geradores de ERO, como a NOX, levando a peroxidação lipídica e redução nos níveis de GSH, contribuindo para o desenvolvimento da inflamação, dor e estresse oxidativo. Serafim e colaboradores (2015) demonstraram que a administração de KO₂ promove o aumento de TNF-α e IL-β, atenua os níveis de IL-10, e induz o aumento da expressão de mRNA para pré-pró-ET-1 (ppET-1), a ET-1 em sua forma inativa, no tecido plantar e medula espinal dos animais. Além disso, o trabalho demonstra que o uso do antagonista misto do receptor de ET-1, bosentana, inibe a dor e inflamação induzidas por KO₂, evidenciando a modulação positiva de ET-1 sobre a resposta inflamatória e algésicas induzida pelo O₂^{•-}.

O emprego de componentes antioxidantes, como flavonóides, miméticos de SOD e ditiocarbamato de pirrolidina (PDTC) promovem a redução dos parâmetros de dor, inflamação e estresse oxidativo em modelo experimental induzido por KO₂, evidenciando de forma consistente a importância do O₂^{•-} no desenvolvimento da dor e inflamação (Pinho-Ribeiro *et al.*, 2016). Corroborando com este estudo, a quercetina e a vinpocetina, flavonóides antioxidantes padrão, também levam a redução do edema, da hiperalgesia mecânica e térmica, dos comportamentos de dor manifesta (contorções abdominais, sacudidas e lambidas de

pata), do recrutamento leucocitário (neutrófilos e macrófagos) e aumentam a capacidade antioxidante tecidual, fortalecendo o sistema antioxidante e reduzindo os níveis de $O_2^{\bullet-}$, induzidos por KO_2 (Lorenzo-Gonzalez *et al.*, 2019; Maioli *et al.*, 2015).

Pinho-Ribeiro e colaboradores (2016) denotaram que a administração de KO_2 promove a degradação do inibidor citoplasmático $I\kappa B\alpha$, levando a fosforilação da subunidade p65 do NF- κB tanto a nível periférico quanto central. Por outro lado, Carvalho (2014) demonstrou que o uso de inibidores de PI_3K (wortmanina), de ERK (PD98059), p38 (SB202190), JNK (SP600125) a nível espinal inibe os parâmetros de dor e inflamação induzidos por KO_2 , evidenciando a participação destas vias nos mecanismos de nocicepção induzidos por este doador de ânion superóxido. Corroborando com parte destes achados, a vinpocetina inibiu a ativação de NF- κB e reduziu os níveis das citocinas IL-33, TNF- α , IL-1 β do tecido plantar estimulado com a injeção de KO_2 (Lorenzo-Gonzalez *et al.*, 2019). Da mesma forma, o tratamento com PDTC reduz a hiperalgesia mecânica, o edema, o recrutamento leucocitário, a ativação da via do NF- κB e a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1 β) (Pinho-ribeiro *et al.*, 2016).

A administração de um agente mimético de SOD, o tempol, apresenta efeitos semelhantes, uma vez que inibe parâmetros de dor (hiperalgesia mecânica e térmica), inflamação (edema, níveis de TNF- α , IL-1 β e ET-1, e ativação de astrócitos e micróglia na medula espinal) e estresse oxidativo (aumenta os níveis de fatores antioxidantes, como GSH e Nrf2, e inibe a expressão de gp91^{phox}) em modelo de dor e inflamação induzido por KO_2 (Bernardy *et al.*, 2017). Assim, estes trabalhos demonstram que o modelo de dor e inflamação induzido por KO_2 é um modelo adequado para o teste de drogas potencialmente antioxidantes.

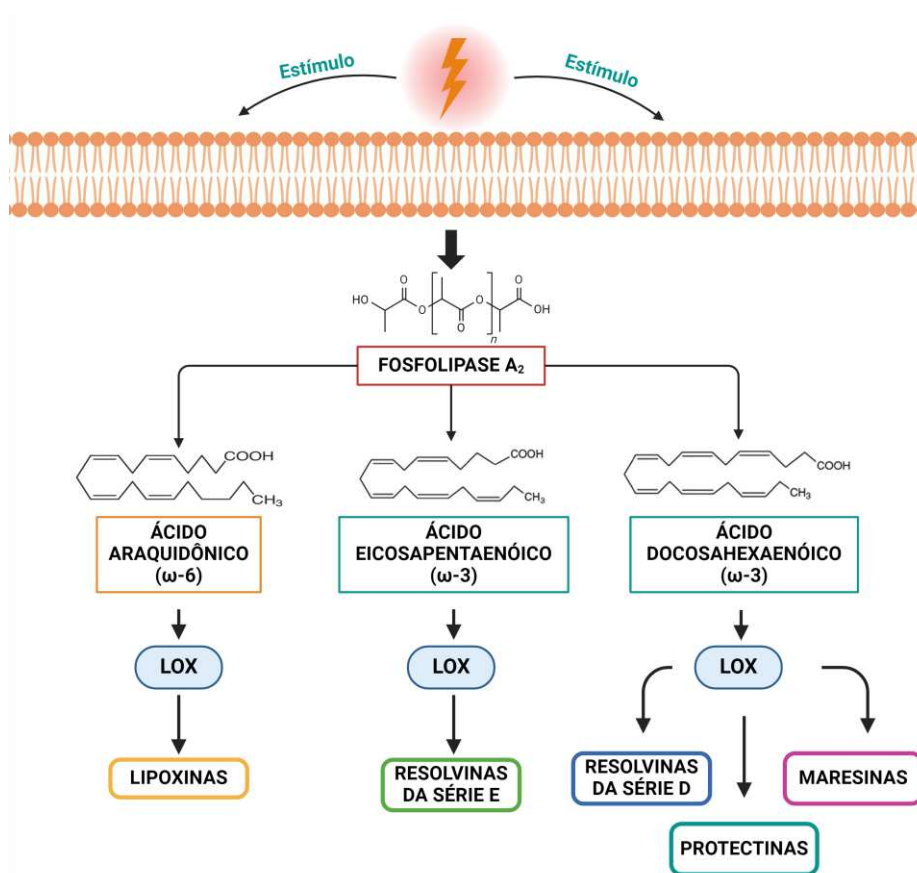
1.5 Mediadores Lipídicos Pró-Resolução (SPMs)

A fase resolutive da inflamação é um processo ativo e tempo-dependente orquestrado por células que promovem a biossíntese de mediadores lipídicos bioativos, que quando liberados, interrompem a síntese de mediadores pró-inflamatórios e a migração leucocitária, encerrando a resposta inflamatória, contribuindo para o reparo tecidual e conferindo o retorno à homeostase (Serhan; Chiang; Dalli, 2015). Utilizando LC-MS/MS, o pesquisador Charles Serhan confirmou e identificou uma nova classe de mediadores lipídicos capazes de resolver ativamente a inflamação, os denominados mediadores lipídicos pró-resolução (do

1 inglês - *Specialized Pro-Resolving Lipid Mediators*, SPMs) (Bannerberg *et al.*, 2005;
2 Serhan *et al.*, 2015). A exacerbação e descontrole do processo inflamatório parece
3 ser resultante de um desequilíbrio entre os mediadores lipídicos pró-inflamatórios
4 (prostaglandinas e leucotrienos) e os SPMs (lipoxinas, resolvinas, maresinas e
5 protectinas) (Buckley; Gilroy; Serhan, 2014; Serhan; Chiang; Van Dyke, 2008).

6 A primeira etapa de biossíntese dos SPMs envolve a ação da
7 PLA₂ na hidrolisação da ligação acila na posição *sn*-2 dos fosfolipídeos de
8 membrana, promovendo a liberação de um ácido graxo livre, como o AA (David *et*
9 *al.*, 2012). A partir disso, estes ácidos graxos podem dar origem à mediadores
10 lipídicos de atividade pró-inflamatória ou de atividade anti-inflamatória e pró-
11 resolutive. Dentre os mediadores pró-inflamatórios gerados, há os metabólitos
12 derivados do AA (ômega 6), comumente denominados de eicosanóides, estes que
13 incluem as prostaglandinas (PGs) e os tromboxanos, gerados via COX-1 e COX-2, e
14 os leucotrienos, gerados via 5-LOX (David *et al.*, 2012). Contudo, mediante a troca
15 de classes dos mediadores lipídicos para a classe antiinflamatória e pró-resolutiva, o
16 AA pode gerar os membros da família das lipoxinas, como o LXA₄, via 5-LOX ou
17 12/15-LOX. Ainda, outros metabólitos podem ser gerados via ácidos graxos ômega
18 3, como o ácido eicosapentaenóico (EPA), que dá origem as resolvinas da série E
19 (RvE), como a RvE1-RvE4, via 5-LOX ou 12/15-LOX, e o ácido docosahexaenóico
20 (DHA), que resulta na geração de maresinas (MaR), como MaR1 e MaR2, resolvinas
21 da série D (RvD), como RvD1-RvD6, e protectinas, com PD1 e PDX, as quais podem
22 ser originadas via 5-LOX ou 12/15 LOX (David *et al.*, 2012; Serhan, Chiang, Dalli,
23 2015; Serhan *et al.*, 2015) (**Figura 6**). Outra possível rota de biossíntese para os
24 SPMs se trata da acetilação do resíduo serina na COX-2, promovida pela aspirina,
25 reação que promove uma alteração enzimática, modificando a atividade do tipo COX
26 para o tipo LOX, e assim, promovendo a geração de SPMs (Claria; Serhan, 1995;
27 Fattori *et al.*, 2020).

1 **Figura 6 – Visão geral da biossíntese dos SPMs.**



Fonte: Autoria própria.

De forma geral, esses mediadores lipídicos interagem alostericamente sobre GPCRs específicos expressos em células imunes, neuronais e teciduais, podendo agir como agonistas, inibidores ou agonistas alostéricos (Basil; Levy, 2016; Fattori *et al.*, 2020). Além disso, podem atuar sobre canais iônicos, como os canais TRP, e receptores canabinóides, modulando suas funções biológicas (Bang *et al.*, 2010; Pamplona *et al.*, 2012; Pertwee *et al.*, 2012). De fato, o potencial modulador sobre a atividade do canal TRPV1 de alguns SPMs (LxA4, RvE1, RvD1, RvD2, RvD3, MaR1, MaR2 e PD1) já foi descrito, conduzindo a um menor influxo de Ca²⁺ através do canal e, consequentemente, uma reduzida atividade neuronal, resultando em antinocicepção e analgesia (Fattori *et al.*, 2019; Fattori *et al.*, 2022; Park *et al.*, 2011; Park *et al.*, 2015; Payrits *et al.*, 2020; Saraiva-Santos *et al.*, 2023).

Além disso, os SPMs apresentam efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes que limitam o dano tecidual, promovem eliminação microbiana e de restos celulares, contribuindo para o reparo tecidual e retorno à homeostase (Basil; Levy, 2016; Buckley *et al.*, 2014). Dentre os efeitos proporcionados por estes SPMs

há: a inibição de vias de sinalização, como a do NF- κ B e da MAPK (Cardoso *et al.*, 2023; Fattori *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2020; Lu *et al.*, 2018; Sham *et al.*, 2018; Xia *et al.*, 2017); a redução na produção de mediadores pró-inflamatórios, como citocinas e quimiocinas (Dalli, Serhan, 2012; Fattori *et al.*, 2019; Fattori *et al.*, 2020; Lu *et al.*, 2018; Park *et al.*, 2011; Saraiva-Santos *et al.*, 2023); atividade antioxidante promovendo redução nos níveis de ERO geradas durante a resposta inflamatória (Cardoso *et al.*, 2023; Piao *et al.*, 2020; Saraiva-Santos *et al.*, 2023); a diminuição da expressão moléculas de adesão endoteliais, como ICAM-1 (Souza *et al.*, 2015); a diminuição do recrutamento e ativação de polimorfonucleares, assim como a inibição da degranulação de neutrófilos e mastócitos no sítio inflamatório (Bannenberg *et al.*, 2005; Cardoso *et al.*, 2023; Fattori *et al.*, 2019; Rajasagi *et al.*, 2011; Rasquel-Oliveira *et al.*, 2023; Serhan *et al.*, 2015); o aumento da expressão de moléculas anti-inflamatórias, antioxidantes e fatores de crescimento (Cardoso *et al.*, 2023; Dalli, Serhan, 2012; Rasquel-Oliveira *et al.*, 2023; Recchiuti *et al.*, 2011); e a polarização de macrófagos para o fenótipo M2 associada ao processo de eferocitose e eficiente depuração bacteriana (Rajasagi *et al.*, 2011; Rasquel-Oliveira *et al.*, 2023; Seki *et al.*, 2010; Serhan *et al.*, 2015; Xia *et al.*, 2017). Outra atividade interessante dos SPMs é sua capacidade moduladora sobre a expressão de micro-RNAs (miRNAs) relacionados à expressão de fatores anti-inflamatórios e inibição de vias de sinalização pró-inflamatórias, os denominados miRNAs de resolução. Dentre os SPMs que já foram descritos por regular positivamente a expressão destes miRNAs de resolução, há a RvD1 (miR-146b, miR208a, miR219 e miR-21) (Recchiuti *et al.*, 2012), a RvD2 (miR-146a) (Croasdell *et al.*, 2016), a PD1 (miR-219-2) (Fredman *et al.*, 2012) e a PDX (miR-20a) (Jin *et al.*, 2021).

Os SPMs podem ser produzidos endogenamente por uma ampla gama de células e tecidos em concentrações extremamente baixas, as quais podem variar de picogramas à nanogramas. Abaixo, a **Tabela 1** evidencia alguns dos estudos que se propuseram a quantificar os níveis fisiológicos de alguns membros dos SPMs em diversas células, tecidos e líquidos biológicos, sobretudo em amostras humanas (indivíduos saudáveis e sem suplementação com ômega 3). Dentre as técnicas amplamente utilizadas para mensuração destas moléculas há a LC-MS/MS, UPLC MS/MS e ELISA, por exemplo, que apesar de serem métodos altamente sensíveis, possuem dentre suas limitações a incapacidade de detecção dos SPMs a níveis muito baixos, cuja quantidade ínfima não atinge o limite de detecção dos

aparelhos (~0,1-15 nM) (Calder *et al.*, 2020; Kutzner *et al.*, 2019; O'donnel *et al.*, 2023). Tal fato poderia explicar a escassez de dados que demonstrem a produção endógena em animais de laboratório, como ratos e camundongos, uma vez que estas espécies produzem concentrações inferiores de SPMs em comparação aos humanos.

Tabela 1 – Concentrações fisiológicas de SPMs produzidos endogenamente.

Célula, tecido ou líquido biológico	Espécie	SPM	Faixa de concentração	Referência
Plaqueta	Humano	LXA ₄	4,6 ng/mL	Serhan <i>et al.</i> , 1990
Neutrófilo	Humano	LXA ₄ RvE1 RvD5 PDX	4,6 ng/mL 1-3 nM/1x10 ⁶ cells	Serhan <i>et al.</i> , 1990 Mainka <i>et al.</i> , 2022
Eosinófilo	Humano	PD1	40-100 pg/mL	Levy <i>et al.</i> , 2007
Macrófago	Humano	LXA ₄ RvD1-2 RvD5 MaR1 PD1	0,1-300 nM/mL	McCauley <i>et al.</i> , 2014 Calder <i>et al.</i> , 2020
Linfócito B	Humano	LXA ₄ RvD1 PDX	10-100 nM/mL	Mainka <i>et al.</i> , 2022
	Camundongo	LXA ₄ PDX	10-100 nM/mL	Mainka <i>et al.</i> , 2022
Linfócito T	Humano	RvD1-2 MaR1 PD1	0,1-10 nM/mL	Mainka <i>et al.</i> , 2022
Neurônio	Humano	LXA ₄ RVD1 PD1	20-300 pg/mg de proteína	Lukiv <i>et al.</i> , 2005 Wang <i>et al.</i> , 2015
Nervo vago	Humano	RvE1 RvD3-5 MaR1 PD1	3-45 pg/mL	Serhan <i>et al.</i> , 2018
Órgãos linfóides (linfonodos e baço)	Humano	LXA ₄ RvE3 RvD1 RvD5-6	1,9-114,3/10 mg de tecido	Colas <i>et al.</i> , 2014 Calder <i>et al.</i> , 2020
Tecido adiposo subcutâneo	Humano	LXA ₄ RvD1-2 PD1	10-20 pg/g de tecido	Claria <i>et al.</i> , 2013
Tecido subcutâneo perivascular	Humano	LXA ₄ PD1	100-200 pg/g de tecido	Claria <i>et al.</i> , 2013

Placenta	Humano	RvD1-2 PD1 PDX	1-100 pg/mg de tecido	Keelan <i>et al.</i> , 2015
Pneumócitos	Camundongo	PD1 PDX	100 pg/mg de tecido	Levy <i>et al.</i> , 2007
Células epiteliais pulmonares	Humano	LXA ₄	380 pg/mL	Planagumà <i>et al.</i> , 2010
Pele	Humano	RvD1-2 MaR1 PD1	0,3-3,8 pg/g de tecido	Chiang; Serhan, 2020 Töröcsik <i>et al.</i> , 2019
Plasma	Humano	LXA ₄ RvE1-3 RvD1-3 RvD5-6 MaR1 PD1 PDX	1-2500 pg/mL	Mas <i>et al.</i> , 2012 Colas <i>et al.</i> , 2014 English <i>et al.</i> , 2017 Arita <i>et al.</i> , 2015
Soro	Humano	RvD1-2 RvD4 MaR1 PD1	0,2-27 ng/mL	Chiang; Serhan, 2020
Líquido cerebrospinal	Humano	LXA ₄ RvD1	300 pg/mL	Wang <i>et al.</i> , 2015
Fluído sinovial	Humano	LXA ₄ RvD5 MaR1	10-40 pg/mL	Giera <i>et al.</i> , 2012
Condensados exalados na respiração	Humano	LXA ₄ RvD1-2 PD1 PDX	10-200 pg/mL de lavado broncoalveolar	Singh <i>et al.</i> , 2019 Levy <i>et al.</i> , 2007
Leite materno	Humano	LXA ₄ RvE1-3 RvD1-6 MaR1 PD1	4,3-449,9 pg/mL	Weiss <i>et al.</i> , 2013 Arnardottir <i>et al.</i> , 2014 English <i>et al.</i> , 2017
Saliva	Humano	RvE1 RvD1 MaR1 PD1	87,6-320 pg/mL	Elabdeen <i>et al.</i> , 2013
Lágrima	Humano	RvD1-2 RvD5 PD1	1,61-7,6 ng/mL	Masoudi <i>et al.</i> , 2017 English <i>et al.</i> , 2017

Fonte: Autoria própria.

1

2

3

4

5

Em algumas doenças, geralmente de cunho inflamatório e/ou infeccioso, a desregulação na produção endógena dos SPMs parece ter papel chave na fisiopatologia e desenvolvimento do quadro patológico. Alguns autores evidenciam em seus estudos que em determinados quadros, como na doença de

Alzheimer (Lukiv *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2015), na tuberculose (Shivakoti *et al.*, 2020), na asma (Levy *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2019), na periodontite (Elabdeen *et al.*, 2013; Tobón-Arroyave *et al.*, 2019), na obesidade (Polus *et al.*, 2016) e na dermatite atópica (Töröcsik *et al.*, 2019), os pacientes diagnosticados apresentam aumento nos níveis séricos de SPMs (LXA₄, RvE1-3, RvD1-2, RVD4-6, MaR1-2, PD1 e PDX) em comparação com indivíduos saudáveis. Nestas condições, podemos supor que a biossíntese aumentada de SPMs pode ter como objetivo um mecanismo compensatório do organismo, o qual vise limitar a resposta inflamatória hiperativa e, consequentemente, o dano tecidual. Por outro lado, alguns trabalhos descrevem a redução nos níveis séricos de SPMs (LXA₄, RvE3, RvD1-4, MaR1, PD1) em pacientes com meningite tuberculosa (Colas *et al.*, 2019), esclerose múltipla (Kooji *et al.*, 2020), artrite reumatóide (Arnardottir *et al.*, 2016; Jin *et al.*, 2018; Sun *et al.*, 2020), fibrose cística (Isopi *et al.*, 2020) ou infectados por SARS-CoV-2 (Schwarz *et al.*, 2020). Adicionalmente, trabalhos da literatura evidenciam que pacientes saudáveis desafiados com LPS ou pacientes sépticos regulam negativamente a produção de SPMs (RvE1, RvD1-2), sugerindo que a exposição do hospedeiro a componentes microbianos pode interromper a biossíntese destes mediadores pró-resolutivos, facilitando o desenvolvimento e manutenção da infecção (Dalli *et al.*, 2017; Norris *et al.*, 2018). Assim, nestes quadros, por exemplo, seria primordial para um melhor desfecho clínico, uma suplementação da dieta com ácido graxo ômega 3 ou tratamento farmacológico com membros dos SPMs em doses mais concentradas. Outro aspecto relevante em relação ao uso farmacológico dos SPMs, é o de que estas moléculas são empregadas na fase da inflamação em que há predomínio de mediadores pró-inflamatórios (citocinas, radicais livres e eicosanóides), e ao atuar sobre células imunes e teciduais, modularia suas funções e levaria a expressão de moléculas antiinflamatórias e antioxidantes, limitando “precocemente” a potencial ação danosa das células imunes e de moléculas pró-inflamatórias, além de contribuir para o reparo tecidual.

Os SPMs são autacoides, substâncias fisiologicamente ativas derivadas da atividade enzimática, com efeito usualmente local e ação de curta duração. Em linhas gerais, os poucos trabalhos presentes na literatura que abordam a farmacocinética de alguns membros dos SPMs demonstram que esta classe apresenta meia-vida relativamente curta, metabolização hepática e excreção por via renal e/ou pulmonar.

Yallepeddi e colaboradores (2021) demonstraram que a RvD1 administrada via intravenosa possui meia-vida plasmática de aproximadamente 4,77 horas em camundongos, com níveis indetectáveis após 8 horas, mas detectáveis em tecidos, como a glândula salivar submandibular, dentro de 5 minutos após a administração deste SPM. Corroborando com este trabalho, Irún e colaboradores (2023) demonstram um perfil farmacocinético semelhante relacionado a outros SPMs (MaR1-2, RvD5, PD1 e PDX), em que a suplementação de indivíduos saudáveis com uma emulsão de ômega-3 gera o aumento da concentração plasmática destes SPMs, com posterior declínio da concentração de forma tempo-dependente. Neste estudo, a avaliação dos níveis plasmáticos destes SPMs 3, 6, 9, 12 e 24 horas após suplementação demonstrou que o pico de concentração ocorre na terceira hora e decai linearmente ao longo do tempo. Por exemplo, a concentração plasmática de MaR2 atinge a faixa dos 39 pg/mL na terceira hora após suplementação, reduzindo para 23.08, 3.23, 2.81 e 1.74 pg/mL na 6^a, 9^a, 12^a e 24^a hora após suplementação, respectivamente, evidenciando a curta meia-vida plasmática destes SPMs (Irún *et al.*, 2023).

Contudo, apesar da meia-vida curta, alguns estudos demonstraram que uma única administração de SPMs, como MaR1 e RvD1, pode conferir efeito analgésico de horas (até 15 horas após tratamento) (Zaninelli *et al.*, 2022) até dias (3-5 dias após tratamento) (Fattori *et al.*, 2019), um período consideravelmente longo quando comparado à meia-vida plasmática curta destes SPMs. Possíveis explicações para este efeito a relativo longo prazo envolvem a capacidade de alguns SPMs em promover o aumento da expressão de miRNAs de resolução nas células, amplificando a produção de agentes antiinflamatórios e antioxidantes que possam inibir a ativação de neurônios nociceptivos, assim como induzir uma produção adicional de si próprio e também de outros SPMs, como é o caso da RvD1, que pode contribuir para sua própria produção e também de LXA₄ (Bathina, Das, 2021).

Os SPMs podem ser metabolizados por células hepáticas, através de vias de ω ou β oxidação. Na via de ω -oxidação, há oxidação do carbono- ω , o mais distante do grupo carboxila do ácido graxo, enquanto o processo de β -oxidação envolve a oxidação do carbono- β . Dentre os trabalhos que melhor descrevem o processo de metabolização dos SPMs, há o de Balas e colaboradores (2019), que aborda a metabolização de PD1 via ω - e β -oxidação, e o de Reinertsen e colaboradores (2023) que demonstram a metabolização de RvE4 via ω -oxidação.

Em linhas gerais, nos hepatócitos, a PD1 bioativa sofrerá oxidações sequenciais promovidas pelas enzimas CYP450 e oxidoredutases eicosanóides, como a 12-hidroxi-desidrogenase, levando a geração de metabólitos até alcançar a forma inativa. Primeiramente, a PD1 é convertida em 22-OH-PD1, que em seguida, é metabolizado em 22-COOH-PD1 via ω -oxidação. A partir disso, os próximos metabólitos são gerados via da β -oxidação, isto porque as oxidações passam a ocorrer na cabeça polar da PD1. Como produtos, são gerados os metabólitos inativos de PD1, o dinor-PD1 (C18) e tetranor-PD1 (C20), já sem qualquer ação biológica, sendo excretados posteriormente pelo organismo (Balas *et al.*, 2019). De forma semelhante, Reinertsen e colaboradores (2023) propuseram que a metabolização de RvE4 ocorre somente pela via da ω -oxidação, com geração sequencial de 20-OH-RvE4, 20-COOH-RvE4, e por fim, o metabólito inativo 20-OXO-RvE4. Já foram identificados outros metabólitos inativos gerados por ω -oxidação, como 18-OXO-LXA₄, 18-OXO-RvE1, 8-OXO-RvD1 e 16-OXO-RvD2 (Reinertsen *et al.*, 2023).

Por fim, em relação a via de excreção dos SPMs, alguns trabalhos apontam uma possível eliminação renal e pulmonar. Empregando o uso de espectrometria de massa, Sasaki e colaboradores (2015) detectaram a presença de alguns SPMs na urina de pacientes saudáveis (RvD1, RvE2 e LXA₄), além de seus metabólitos inativos, sugerindo que a excreção destes SPMs ocorre por via renal. Supõe-se que outros SPMs e seus metabólitos inativos, como a PD1 e PDX, também sejam excretados de forma semelhante, mas que a concentração extremamente baixa na urina possa impedir a detecção pela metodologia utilizada. Ainda, alguns estudos apontam a presença de SPMs como PD1 (100 pg/mL), PDX (100 pg/mL), LXA₄ (200 pg/mL), RvD1 (10 pg/mL) e RvD2 (20 pg/mL) em amostras de condensados exalados da respiração (EBC), sugerindo que alguns SPMs podem ser excretados através da via respiratória (Levy *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2019).

Desta forma, os SPMs são imunorresolventes de curta ação importantes na regulação da resposta inflamatória, contribuindo significativamente para o restabelecimento da homeostase tecidual após injúria. A curta meia vida e eficiente metabolização tornam o uso farmacológico dos SPMs seguros em comparação com antiinflamatórios não esteroidais (AINEs), por exemplo, tanto a curto quanto a longo prazo de tratamento, como já demonstrado em alguns trabalhos (Saraiva-Santos *et al.*, 2023; Cardoso *et al.*, 2023).

1.5.1 Protectina DX

A família das protectinas (PDs) é composta por dois membros principais, a Protectina D1 (PD1/NPD1), e seu isômero, a Protectina DX (PDX). Durante a biossíntese destes dois mediadores, originados a partir do DHA, a enzima 15-LOX promove uma primeira hidrólise, levando a clivagem de 16(S),17(S)-ePD epóxi na região estereosseletiva C10, o que resulta na formação do trieno 11E, 13E, 15E, a PD1 (Hansen *et al.*, 2018; Mukherjee *et al.*, 2004). Uma subsequente reação de lipoxigenação, em que há ataque ao carbocátion alélico transitório, e tem como resultado a formação de 11E, 13E, 15Z, a PDX (Mukherjee *et al.*, 2004; Hansen *et al.*, 2018). Outra diferença interessante entre estes dois membros da família das protectinas, é que, em decorrência da diferença estrutural, a PD1 e PDX não atuam sobre o mesmo receptor. Enquanto a PD1 já possui seu receptor específico identificado, o GPR37, o receptor específico da PDX ainda permanece desconhecido (Rasquel-Oliveira *et al.*, 2023).

Apesar de diferentes, estes SPMs apresentam características anti-inflamatórias e pró-resolutivas em comum, contribuindo para a limitação do processo inflamatório e promoção do reparo tecidual (Hong *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2014; Piao *et al.*, 2020; White *et al.*, 2014). Curiosamente, a mucosa do trato respiratório parece ser enriquecida com DHA, havendo uma atividade importante de PDs durante infecções respiratórias virais, por exemplo. Tanto a PD1 quanto a PDX respondem eficientemente contra cepas do vírus influenza (H5N1), demonstrando capacidade antiviral ao inibir a replicação viral em células imunes e do tecido pulmonar. O mecanismo de ação antiviral envolve a interferência direta destes SPMs sobre a maquinaria de exportação do RNA viral, limitando a infecção pelo vírus da gripe (Baillie, Digard, 2013; Fortin *et al.*, 2024; Imai, 2015; Morita *et al.*, 2013).

A PD1, também denominada de neuroprotectina 1 (NPD1) é o membro mais conhecido e melhor caracterizado das PDs. Dentre seus efeitos sobre a resposta inflamatória, a PD1 pode promover a redução de parâmetros como o edema, recrutamento e atividade de células polimorfonucleares e níveis de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-6 e IFN- γ), além de estimular a eferocitose e a depuração bacteriana por macrófagos (Li *et al.*, 2014; Hong *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2021). A PD1 também demonstra eficiente potencial analgésico. Em modelo de dor neuropática induzida por hérnia de disco lombar não compressiva, a administração

de PD1 reduz a expressão de CGRP na medula espinal, conferindo diminuição na hiperalgesia mecânica e térmica (Zhu *et al.*, 2024). Estes dados corroboram com estudos anteriores que demonstraram a PD1 pode regular a atividade de células da glia, como astrócitos e micróglia, atenuando a dor inflamatória a nível espinal (Hong *et al.*, 2014; Park *et al.*, 2011). Ainda, Park e colaboradores (2011) foi o primeiro trabalho que demonstra a modulação do canal TRPV1 por um membro da família das protectinas. Neste artigo, o tratamento com a PD1 bloqueou o aumento da frequência de correntes pós-sinápticas excitatórias espontâneas (sEPSC) evocados por TNF- α e capsaicina, além de inibir de forma eficiente a corrente via TRPV1 induzida pela capsaicina em neurônios DRG. Este efeito inibitório sobre o TRPV1 conferiu uma redução nos parâmetros de dor analisados, demonstrando que a PD1 pode modular a atividade deste canal e promover analgesia em modelo de dor inflamatória (Park *et al.*, 2011).

A PDX também tem demonstrado propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e pró-resolutivas interessantes em modelos de inflamação. A capacidade anti-inflamatória da PDX explorada até o momento tem sido amplamente demonstrada em modelos de lesão pulmonar e sepse. Em modelo de lesão pulmonar induzida por LPS, o tratamento com PDX inibiu o recrutamento leucocitário (neutrófilos e macrófagos) ao reduzir a expressão de MCP-1, MIP-2 e TNF- α (Ye *et al.*, 2020). Um outro modelo de lesão pulmonar induzida por LPS demonstrou efeitos anti-inflamatórios semelhantes, em que a PDX reduziu o edema pulmonar, os níveis de mediadores pró-inflamatórios (IL-1 β , IL-6, TNF- α e MIP-1 α), e consequentemente, inibiu a infiltração leucocitária, além de regular positivamente a expressão de IL-10 (Tan *et al.*, 2018). Em modelo de sepse, a PDX aumentou a taxa de sobrevivência e atenuou a lesão de múltiplos órgãos em camundongos sépticos, favorecendo a depuração bacteriana e reduzindo os níveis de citocinas pró-inflamatórias. Ainda, o tratamento com este SPM promoveu a polarização de macrófagos para o fenótipo M2 (Arg1 e Ym1) no peritônio (Xia *et al.*, 2017), demonstrando importante efeito pró-resolutiva.

Grande parte dos trabalhos que demonstram o perfil antioxidante da PDX empregam metodologias *in vitro*. Por exemplo, em um modelo *in vitro* de estresse oxidativo endotelial estimulado com H₂O₂, o tratamento com PDX promoveu o aumento de expressão de SOD2 e catalase, atenuando a produção de ERO (Hwang *et al.*, 2019). Em outro trabalho, empregando uma cultura de neutrófilos

humanos induzidos por forbol 12-miristato-13- acetato (PMA) e pelo peptídeo N-formil-Met-Leu-Phe (fMLF), o tratamento com PDX inibe o $O_2^{\bullet-}$ produzido via NOX, uma vez que inibe p47^{phox}, e retarda a formação do complexo multiproteico funcional (Liu *et al.*, 2014). Além disso, este estudo demonstrou que a PDX inibe a liberação de MPO pelos neutrófilos, reduzindo a capacidade oxidante destas células, além de diminuir a produção de prostaglandinas via COX-1 e COX-2, demonstrando eficiente efeito antioxidante e anti-inflamatório (Liu *et al.*, 2014). Em cultura de condrócitos primários de ratos estimulada com IL-1 β , a PDX reduziu a via de sinalização do NF- κ B, a expressão de NO, PGE₂, iNOS e COX-2, metaloproteinase 3 (MMP-3), metaloproteinase 13 (MMP-13), e colágeno II em condrócitos, demonstrando efeito anti-inflamatório, antioxidante e de proteção tecidual importante (Piao *et al.*, 2020). Neste mesmo estudo, também foi empregado um modelo de progressão da osteoartrite *in vivo*, em que a PDX inibiu a degradação articular e promoveu a redução dos níveis de TNF- α no soro dos animais, demonstrando efeito protetor (Piao *et al.*, 2020). Outra análise feita *in vivo* empregou a PDX em um modelo de DM1 e DM2. Neste estudo, a administração PDX reduziu o peso corporal dos animais, restaurou os níveis glicêmicos, aumentou a defesa antioxidante ao elevar os níveis de catalase, SOD e GSH, levando a menores quantidades de LPO e NO no plasma, além de reduzir os níveis de IL-6 e TNF- α , demonstrando potente efeito antioxidante e anti-inflamatório em um modelo *in vivo* (Rengachar *et al.*, 2022).

Recentemente, a PDX também demonstrou atividade modulatória sobre o inflamassoma NLRP3 (Jin *et al.*, 2021). Em modelo de artrite reumatóide induzida por colágeno (CIA), o tratamento com a PDX atenuou a lesão articular, reduziu o edema, inibiu a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-18, IL-6 e IL-17A), induziu a produção de citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- β) e restabeleceu o equilíbrio de células Th17/Treg, expandindo a proporção de células T regulatórias em comparação com a população de células Th17 nos animais com artrite reumatóide (Jin *et al.*, 2021). Além disso, *in vitro*, a PDX reduziu os níveis de mRNA e a proteína de NLRP3, de IL-1 β e de CASP-1, demonstrando um novo mecanismo antiinflamatório associado a este SPM em modelo de artrite (Jin *et al.*, 2021).

Contudo, o potencial analgésico da PDX tem sido pouco explorado na literatura. Dentre os trabalhos que demonstram resultados consistentes, há o de Zhao e colaboradores (2021). Neste estudo, os autores investigaram o potencial

1 analgésico da PDX em modelo de dor radicular lombar de hérnia de disco lombar
2 não compressiva. O tratamento com a PDX atenuou a hiperalgesia mecânica e
3 térmica, efeito que parece relacionado à diminuição da expressão de mRNA para IL-
4 6 e IL-1 β , e aumento da expressão de mRNA de TGF- β (Zhao *et al.*, 2021). Em
5 relação a modulação da PDX sobre canais importantes para a ativação e
6 sensibilização neuronal, como o TRPA1 e TRPV1, há ausência de dados que
7 demonstrem tal propriedade. Assim, há necessidade de mais estudos que possam
8 investigar e elucidar seu potencial analgésico.

9 Em linhas gerais, SPMs como a PDX podem ser uma nova
10 alternativa terapêutica para o tratamento da dor e inflamação. Contudo, muitos dos
11 trabalhos que contemplam os efeitos antioxidante da PDX são realizados *in vitro*.
12 Além disso, há escassez de trabalhos que contemplem e tentem elucidar seu
13 potencial e mecanismo analgésico. Desta forma, nosso objetivo foi o de avaliar, *in*
14 *vivo*, o potencial analgésico, anti-inflamatório e antioxidante da PDX em modelo de
15 dor e inflamação desencadeado por uma ERO.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial analgésico, anti-inflamatório e antioxidante da PDX em modelo de dor e inflamação induzido por superóxido de potássio (KO_2), um doador de ânion superóxido, em camundongos.

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

Avaliar o efeito PDX:

- Na hiperalgesia mecânica e térmica em modelo de dor e inflamação induzido por KO_2 ;
- Na alodinia mecânica em modelo de dor e inflamação induzido por KO_2 ;
- No desbalanço na distribuição de peso sobre as patas traseiras dos animais em modelo de dor e inflamação induzido por KO_2 ;
- Nos comportamentos nociceptivos de dor manifesta (contorções abdominais, lambidas de pata e tempo gasto lambendo a pata) em modelo de dor e inflamação induzido por KO_2 ;
- Na alteração da sensibilidade mecânica e térmica basal dos animais, na ausência da injeção de KO_2 ;
- Na atividade locomotora dos animais, na ausência da injeção de KO_2 ;
- No recrutamento leucocitário para o tecido plantar em modelo de dor e inflamação induzido por KO_2 ;
- Na produção de citocinas pró-inflamatórias ($TNF-\alpha$ e $IL-1\beta$) em modelo de dor e inflamação induzido por KO_2 ;
- Nos parâmetros de estresse oxidativo em modelo de dor e inflamação induzido por KO_2 ;
- Na ativação do canal iônico TRPV1 no DRG em modelo de dor e inflamação induzido por KO_2 ;
- Na ativação de neurônios no DRG em modelo de dor e inflamação induzido por KO_2 ;
- Na atividade da MPO estomacal e nos níveis plasmáticos de ALT, AST, creatinina e ureia em modelo de dor e inflamação induzido por KO_2 .

REFERÊNCIAS

- 1
- 2 ABBAS A. K; LICHTMAN A. H.; PILLAI S. *Imunologia Celular e Molecular*. 9ª Edição.
- 3 Rio de Janeiro: Elsevier, 2019, p. 57-93.
- 4 ARITA, M. *et al.* Resolvin E1 Selectively Interacts with Leukotriene B4 Receptor
- 5 BLT1 and ChemR23 to Regulate Inflammation. **The Journal of Immunology**, [s. l.],
- 6 v. 178, n. 6, p. 3912–3917, 2007.
- 7 ARNARDOTTIR, H. *et al.* Human Milk Proresolving Mediators Stimulate Resolution
- 8 of Acute Inflammation. **Mucosal immunology**, [s. l.], v. 9, n. 3, p. 757, 2016.
- 9 ARTERO, A. A. Avaliação do efeito analgésico e anti-inflamatório da
- 10 hesperidinametil chalcona em modelo de artrite induzido por dióxido de titânico em
- 11 camundongos. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde), Universidade
- 12 Estadual de Londrina, Londrina, p. 11-13, 2018.
- 13 BAILLIE, J. K.; DIGARD, P. Influenza--time to target the host?. **The New England**
- 14 **journal of medicine**, [s. l.], v. 369, n. 2, p. 191–193, 2013.
- 15 BALAS, L. *et al.* Rapid Metabolization of Protectin D1 by β -Oxidation of Its Polar
- 16 Head Chain. **Journal of medicinal chemistry**, [s. l.], v. 62, n. 21, p. 9961–9975,
- 17 2019.
- 18 BANG, S. *et al.* Resolvin D1 attenuates activation of sensory transient receptor
- 19 potential channels leading to multiple anti-nociception. **British Journal of**
- 20 **Pharmacology**, [s. l.], v. 161, n. 3, p. 707, 2010.
- 21 BANNENBERG, G. L. *et al.* Molecular circuits of resolution: formation and actions of
- 22 resolvins and protectins. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, [s. l.], v.
- 23 174, n. 7, p. 4345–4355, 2005.
- 24 BARAL, P.; UDIT S.; CHIU, I. M. Pain and immunity: implications of host defense.
- 25 **Nat Rev Immunol.**, [s. l.], v. 19, n. 7, p. 433-447, 2020.

- 1 BASBAUM, A. I. *et al.* Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. **Cell**, [s. l.], v. 139,
2 n. 2, p. 267, 2009.
- 3 BASIL, M. C.; LEVY, B. D. Specialized pro-resolving mediators: endogenous
4 regulators of infection and inflammation. **Nature reviews. Immunology**, [s. l.], v. 16,
5 n. 1, p. 51–67, 2016.
- 6 BATHINA, S.; DAS, U. N. Resolvin D1 Decreases Severity of Streptozotocin-Induced
7 Type 1 Diabetes Mellitus by Enhancing BDNF Levels, Reducing Oxidative Stress,
8 and Suppressing Inflammation. **International journal of molecular sciences**, [s. l.],
9 v. 22, n. 4, p. 1–15, 2021.
- 10 BELAMBRI, S. A. *et al.* NADPH oxidase activation in neutrophils: Role of the
11 phosphorylation of its subunits. **European journal of clinical investigation**, [s. l.], v.
12 48 Suppl 2, 2018.
- 13 BERNARDY, C. C. F. *et al.* Tempol, a Superoxide Dismutase Mimetic Agent, Inhibits
14 Superoxide Anion-Induced Inflammatory Pain in Mice. **BioMed Research**
15 **International**, [s. l.], v. 2017, 2017.
- 16 BIENERT, G. P.; CHAUMONT F. Aquaporin-facilitated transmembrane diffusion of
17 hydrogen peroxide. **Biochemical Biophysical Acta**, [s. l.], v.1840, n.5, p. 1596-
18 1604, 2014.
- 19 BRAZ, J. *et al.* Transmitting pain and itch messages: A contemporary view of the
20 spinal cord circuits that generate Gate Control. **Neuron**, [s. l.], v. 82, n. 3, p. 522,
21 2014.
- 22 BUCKLEY, C. D.; GILROY, D. W.; SERHAN, C. N. Pro-Resolving lipid mediators and
23 Mechanisms in the resolution of acute inflammation. **Immunity**, [s. l.], v. 40, n. 3, p.
24 315, 2014.
- 25 BUETLER, T. M.; KRAUSKOPF, A.; RUEGG, U. T. Role of superoxide as a signaling
26 molecule. **News in Physiological Sciences**, [s. l.], v. 19, n. 3, p. 120–123, 2004.

- 1 BUTLER, J.; FLEMING, P.; WEBB, D. Congenital insensitivity to pain--review and
2 report of a case with dental implications. **Oral surgery, oral medicine, oral**
3 **pathology, oral radiology, and endodontics**, [s. l.], v. 101, n. 1, p. 58–62, 2006.
- 4 CALDER, P. C. Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid derived specialised
5 pro-resolving mediators: Concentrations in humans and the effects of age, sex,
6 disease and increased omega-3 fatty acid intake. **Biochimie**, [s. l.], v. 178, p. 105–
7 123, 2020.
- 8 CANTU-MEDELLIN, N.; KELLEY, E. E. Xanthine oxidoreductase-catalyzed reactive
9 species generation: A process in critical need of reevaluation. **Redox Biology**, [s. l.],
10 v. 1, n. 1, p. 353, 2013.
- 11 CARDOSO, R. D. R. *et al.* Resolvin D5 (RvD5) Reduces Renal Damage Caused by
12 LPS Endotoxemia in Female Mice. **Molecules**, [s. l.], v. 28, n. 1, 2023.
- 13 CARRASCO, C. *et al.* Neuropathic Pain: Delving into the Oxidative Origin and the
14 Possible Implication of Transient Receptor Potential Channels. **Frontiers in**
15 **physiology**, [s. l.], v. 9, n. FEB, 2018.
- 16 CARVALHO, Thacyana Teixeira. Doador de ânion superóxido induz hiperalgesia
17 mecânica e contorções abdominais dependentes da ativação espinal de PI₃K, MAPK
18 e células da glia em camundongos. 2014. 65 folhas. Dissertação (Mestrado em
19 Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.
- 20 CHEN Y. H. *et al.* Effects of asymmetric dimethylarginine on bovine retinal capillary
21 endothelial cell proliferation, reactive oxygen species production, permeability,
22 intercellular adhesion molecule-1, and occluding expression. **Molecular Vision**, [s.
23 l.], v.17, p. 332-340.
- 24 CHIANG, N.; SERHA, C. N. Specialized Pro-Resolving Mediator Network: An Update
25 on Production and Actions. **Essays in biochemistry**, [s. l.], v. 64, n. 3, p. 443, 2020.

- 1 CLÀRIA, J. *et al.* Diversity of lipid mediators in human adipose tissue depots.
2 **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, [s. l.], v. 304, n. 12, p. C1141,
3 2013.
- 4 CLÀRIA, J.; SERHAN, C. N. Aspirin triggers previously undescribed bioactive
5 eicosanoids by human endothelial cell-leukocyte interactions. **Proceedings of the**
6 **National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 92, n.
7 21, p. 9475–9479, 1995.
- 8 COLAS, R. A. *et al.* Identification and signature profiles for pro-resolving and
9 inflammatory lipid mediators in human tissue. **American Journal of Physiology -**
10 **Cell Physiology**, [s. l.], v. 307, n. 1, p. C39, 2014.
- 11 COLAS, R. A. *et al.* Proresolving mediator profiles in cerebrospinal fluid are linked
12 with disease severity and outcome in adults with tuberculous meningitis. **The FASEB**
13 **Journal**, [s. l.], v. 33, n. 11, p. 13028, 2019.
- 14 CROASDELL, A.; SIME, P. J.; PHIPPS, R. P. Resolvin D2 decreases TLR4
15 expression to mediate resolution in human monocytes. **FASEB journal : official**
16 **publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**,
17 [s. l.], v. 30, n. 9, p. 3181–3193, 2016.
- 18 CUNHA, T. M. *et al.* A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory
19 hypernociception in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of**
20 **the United States of America**, [s. l.], v. 102, n. 5, p. 1755–1760, 2005.
- 21 DA SILVA, M. D. V. *et al.* Stem cells and pain. **World Journal of Stem Cells**, [s. l.],
22 v. 15, n. 12, p. 1035, 2023.
- 23 DALLI, J. *et al.* Human sepsis eicosanoid and pro-resolving lipid mediator temporal
24 profiles: correlations with survival and clinical outcomes. **Critical care medicine**, [s.
25 l.], v. 45, n. 1, p. 58, 2017.

- 1 DAVID, S.; GREENHALGH, A. D.; LÓPEZ-VALES, R. Role of phospholipase A 2s
2 and lipid mediators in secondary damage after spinal cord injury. **Cell and Tissue**
3 **Research**, [s. l.], v. 349, n. 1, p. 249–267, 2012.
- 4 DUITAMA, M. *et al.* TRP Channels Role in Pain Associated With Neurodegenerative
5 Diseases. **Frontiers in Neuroscience**, [s. l.], v. 14, 2020.
- 6 EID, S. A. *et al.* Nox, Nox, Are You There? The Role of NADPH Oxidases in the
7 Peripheral Nervous System. **Antioxidants & redox signaling**, [s. l.], v. 37, n. 7–9, p.
8 613–630, 2022.
- 9 EIJKELKAMP, N. *et al.* GRK2: A Novel Cell-Specific Regulator of Severity and
10 Duration of Inflammatory Pain. **The Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 30, n. 6, p.
11 2138, 2010.
- 12 ELABDEEN, H. R. *et al.* Ratio of pro-resolving and pro-inflammatory lipid mediator
13 precursors as potential markers for aggressive periodontitis. **PloS one**, [s. l.], v. 8, n.
14 8, 2013.
- 15 ENGLISH, J. T. *et al.* Identification and Profiling of Specialized Pro-Resolving
16 Mediators in Human Tears by Lipid Mediator Metabolomics. **Prostaglandins,**
17 **Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, [s. l.], v. 117, p. 17–27, 2017.
- 18 FATTORI, V. *et al.* Maresin 2 is an analgesic specialized pro-resolution lipid mediator
19 in mice by inhibiting neutrophil and monocyte recruitment, nociceptor neuron TRPV1
20 and TRPA1 activation, and CGRP release. **Neuropharmacology**, [s. l.], v. 216,
21 2022.
- 22 FATTORI, V. *et al.* Specialized pro-resolving lipid mediators: A new class of non-
23 immunosuppressive and non-opioid analgesic drugs. **Pharmacological research**, [s.
24 l.], v. 151, 2020.

- 1 FATTORI, V. *et al.* The specialised pro-resolving lipid mediator maresin 1 reduces
2 inflammatory pain with a long-lasting analgesic effect. **British Journal of**
3 **Pharmacology**, [s. l.], v. 176, n. 11, p. 1728–1744, 2019.
- 4 FATTORI, V. Mecanismos de inibição da inflamação e dor pela curcumina nos
5 modelos de artrite induzida por dióxido de titânio e inflamação induzida por
6 ânionsuperóxido em camundongos. Dissertação (Mestrado em Patologia
7 Experimental), Universidade Estadual de Londrina, Londrina, p. 15-26, 2016.
- 8 FERRARI, L. F. *et al.* Transient decrease in nociceptor GRK2 expression produces
9 long-term enhancement in inflammatory pain. **Neuroscience**, [s. l.], v. 222, p. 392,
10 2012.
- 11 FORTIN, N. *et al.* A protectin DX (PDX) analog with in vitro activity against influenza
12 A(H1N1) viruses. **Journal of medical virology**, [s. l.], v. 96, n. 3, 2024.
- 13 FREDMAN, G. *et al.* Self-limited versus delayed resolution of acute inflammation:
14 temporal regulation of pro-resolving mediators and microRNA. **Scientific reports**, [s.
15 l.], v. 2, 2012.
- 16 FREIRE, M. O.; VAN DYKE, T. E. Natural resolution of inflammation.
17 **Periodontology 2000**, [s. l.], v. 63, n. 1, p. 149–164, 2013.
- 18 GHOSH, S.; HAYDEN, M. S. New regulators of NF-kappaB in inflammation. **Nature**
19 **reviews. Immunology**, [s. l.], v. 8, n. 11, p. 837–848, 2008.
- 20 GIERA, M. *et al.* Lipid and lipid mediator profiling of human synovial fluid in
21 rheumatoid arthritis patients by means of LC-MS/MS. **Biochimica et biophysica**
22 **acta**, [s. l.], v. 1821, n. 11, p. 1415, 2012.
- 23 GIUS, D. *et al.* Intracellular oxidation/reduction status in the regulation of transcription
24 factors NF-kappaB and AP-1. **Toxicology letters**, [s. l.], v. 106, n. 2–3, p. 93–106,
25 1999.

- 1 GOMES-LEAL, W. Inflamação Aguda, Resposta Glial e Degeneração Axonal em um
2 Modelo de Excitotoxicidade na Medula Espinhal. 20D2. 197f. Tese (Pós-Graduação
3 em Ciências Biológicas – Área de concentração em Neurociências) – Centro de
4 Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2002.
- 5 HALLIWELL, B.; CROSS, C. E. Oxygen-derived species: their relation to human
6 disease and environmental stress. **Environmental Health Perspectives**, [s. l.], v.
7 102, n. Suppl 10, p. 5, 1994.
- 8 HANSEN, T. V.; VIK, A.; SERHAN, C. N. The Protectin Family of Specialized Pro-
9 resolving Mediators: Potent Immunoresolvents Enabling Innovative Approaches to
10 Target Obesity and Diabetes. **Frontiers in Pharmacology**, [s. l.], v. 9, n. JAN, 2018.
- 11 HENDERSON, L. M.; CHAPPELL, J. B. NADPH oxidase of neutrophils. **Biochimica**
12 **et biophysica acta**, [s. l.], v. 1273, n. 2, p. 87–107, 1996.
- 13 HONG, S. *et al.* Neuroprotectin/protectin D1: endogenous biosynthesis and actions
14 on diabetic macrophages in promoting wound healing and innervation impaired by
15 diabetes. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, [s. l.], v. 307, n. 11,
16 p. C1058, 2014.
- 17 HUGHES, D. I.; TODD, A. J. Central Nervous System Targets: Inhibitory
18 Interneurons in the Spinal Cord. **Neurotherapeutics**, [s. l.], v. 17, n. 3, p. 874, 2020.
- 19 HWANG, H. J. *et al.* Protectin DX prevents H₂O₂-mediated oxidative stress in
20 vascular endothelial cells via an AMPK-dependent mechanism. **Cellular Signalling**,
21 [s. l.], v. 53, p. 14–21, 2019.
- 22 IRÚN, P. *et al.* Pharmacokinetics and Changes in Lipid Mediator Profiling after
23 Consumption of Specialized Pro-Resolving Lipid-Mediator-Enriched Marine Oil in
24 Healthy Subjects. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 24, n. 22,
25 2023.

- 1 JI, R. R. Specialized Pro-Resolving Mediators as Resolution Pharmacology for the
2 Control of Pain and Itch. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, [s. l.],
3 v. 63, n. Volume 63, 2023, p. 273–293, 2023.
- 4 JI, R. R.; BERTA, T.; NEDERGAARD, M. Glia and pain: Is chronic pain a gliopathy?.
5 **Pain**, [s. l.], v. 154, n. 0 1, p. S10, 2013.
- 6 JIN, S. *et al.* Maresin 1 improves the Treg/Th17 imbalance in rheumatoid arthritis
7 through miR-21. **Annals of the rheumatic diseases**, [s. l.], v. 77, n. 11, p. 1644–
8 1652, 2018.
- 9 JIN, S. *et al.* Protectin DX restores Treg/Th17 cell balance in rheumatoid arthritis by
10 inhibiting NLRP3 inflammasome via miR-20a. **Cell Death & Disease** 2021 12:3, [s.
11 l.], v. 12, n. 3, p. 1–11, 2021.
- 12 JING, W. *et al.* Role of reactive oxygen species and mitochondrial damage in
13 rheumatoid arthritis and targeted drugs. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 14,
14 2023.
- 15 KALLENBORN-GERHARDT, W.; SCHRÖDER, K.; SCHMIDTKO, A. NADPH
16 Oxidases in Pain Processing. **Antioxidants (Basel, Switzerland)**, [s. l.], v. 11, n. 6,
17 p.1162, 2022.
- 18 KATZ B. *et al.* Nociception and pain in human lacking a functional TRPV1 channel.
19 **Journal Clinical Investigation**, [s. l.], v.133, n.3, p. e153558, 2023.
- 20 KEELAN, J. A. *et al.* Effects of maternal n-3 fatty acid supplementation on placental
21 cytokines, pro-resolving lipid mediators and their precursors. **Reproduction**
22 **(Cambridge, England)**, [s. l.], v. 149, n. 2, p. 171–178, 2015.
- 23 KEYER, K.; IMLAY, J. A. Superoxide accelerates DNA damage by elevating free-
24 iron levels. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United**
25 **States of America**, [s. l.], v. 93, n. 24, p. 13635, 1996.

- 1 KOMAKI, Y. *et al.* Cytokine-mediated xanthine oxidase upregulation in chronic
2 obstructive pulmonary disease's airways. **Pulmonary pharmacology &**
3 **therapeutics**, [s. l.], v. 18, n. 4, p. 297–302, 2005.
- 4 KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. Inflamação Aguda e Crônica. Patologia –
5 Bases Patológicas das Doenças. 7ª Edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005, 49-89.
- 6 KUTZNER, L. *et al.* Development of an Optimized LC-MS Method for the Detection of
7 Specialized Pro-Resolving Mediators in Biological Samples. **Frontiers in**
8 **Pharmacology**, [s. l.], v. 10, p. 444504, 2019.
- 9 KUWABARA, Y. *et al.* Unique amino acids cluster for switching from the
10 dehydrogenase to oxidase form of xanthine oxidoreductase. **Proceedings of the**
11 **National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 100, n.
12 14, p. 8170–8175, 2003.
- 13 LANDINO, L. M. *et al.* Peroxynitrite, the coupling product of nitric oxide and
14 superoxide, activates prostaglandin biosynthesis. **Proceedings of the National**
15 **Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 93, n. 26, p.
16 15069–15074, 1996.
- 17 LANGFORD, D. J. *et al.* Social modulation of pain as evidence for empathy in mice.
18 **Science (New York, N.Y.)**, [s. l.], v. 312, n. 5782, p. 1967–1970, 2006.
- 19 LAWRENCE, T.; WILLOUGHBY, D. A.; GILROY, D. W. Anti-inflammatory lipid
20 mediators and insights into the resolution of inflammation. **Nature reviews.**
21 **Immunology**, [s. l.], v. 2, n. 10, p. 787–795, 2002.
- 22 LEE, I. *et al.* The role of reactive oxygen species in capsaicin-induced mechanical
23 hyperalgesia and in the activities of dorsal horn neurons. **Pain**, [s. l.], v. 133, n. 1–3,
24 p. 9, 2007.
- 25 LEI, Y. *et al.* Redox regulation of inflammation: old elements, a new story. **Medicinal**
26 **research reviews**, [s. l.], v. 35, n. 2, p. 306–340, 2015.

- 1 LEVY, B. D. *et al.* Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in
2 resolution. **Nature immunology**, [s. l.], v. 2, n. 7, p. 612–619, 2001.
- 3 LEVY, B. D. *et al.* Protectin D1 Is Generated in Asthma and Dampens Airway
4 Inflammation and Hyperresponsiveness. **Journal of immunology (Baltimore, Md. :
5 1950)**, [s. l.], v. 178, n. 1, p. 496, 2007.
- 6 LI X. *et al.* Protectin D1 promotes resolution of inflammation in a murine model of
7 lipopolysaccharide-induced acute lung injury via enhancing neutrophils apoptosis.
8 **China Medical Journal (Engl)**, [s. l.], v. 127, n.5, p. 810-814, 2014.
- 9 LI, J. *et al.* Resolvin D1 mitigates non-alcoholic steatohepatitis by suppressing the
10 TLR4-MyD88-mediated NF- κ B and MAPK pathways and activating the Nrf2 pathway
11 in mice. **International immunopharmacology**, [s. l.], v. 88, 2020.
- 12 LITTLE, J. W.; DOYLE, T.; SALVEMINI, D. Reactive nitroxidative species and
13 nociceptive processing: determining the roles for nitric oxide, superoxide, and
14 peroxynitrite in pain. **Amino acids**, [s. l.], v. 42, n. 1, p. 75–94, 2012.
- 15 LIU, H. *et al.* Protectin D1 inhibits TLR4 signaling pathway to alleviate non-alcoholic
16 steatohepatitis via upregulating IRAK-M. **Free Radical Biology and Medicine**, [s. l.],
17 v. 210, p. 42–53, 2024.
- 18 LIU, M. *et al.* Protectin DX, a double lipoxygenase product of DHA, inhibits both ROS
19 production in human neutrophils and cyclooxygenase activities. **Lipids**, [s. l.], v. 49,
20 n. 1, p. 49, 2014.
- 21 LOURENCO-GONZALEZ, Y. *et al.* Repurposing of the Nootropic Drug Vinpocetine
22 as an Analgesic and Anti-Inflammatory Agent: Evidence in a Mouse Model of
23 Superoxide Anion-Triggered Inflammation. [s. l.], 2019.

- 1 LU, Y. *et al.* Resolvin D1 inhibits the proliferation of lipopolysaccharide-treated
2 HepG2 hepatoblastoma and PLC/PRF/5 hepatocellular carcinoma cells by targeting
3 the MAPK pathway. **Experimental and therapeutic medicine**, [s. l.], v. 16, n. 4, p.
4 3603–3610, 2018.
- 5 LUKIW, W. J. *et al.* A role for docosahexaenoic acid–derived neuroprotectin D1 in
6 neural cell survival and Alzheimer disease. **Journal of Clinical Investigation**, [s. l.],
7 v. 115, n. 10, p. 2774, 2005.
- 8 MADERNA, P.; GODSON, C. Lipoxins: resolutionary road. **British journal of**
9 **pharmacology**, [s. l.], v. 158, n. 4, p. 947–959, 2009.
- 10 MAINKA, M. *et al.* On the biosynthesis of specialized pro-resolving mediators in
11 human neutrophils and the influence of cell integrity. **Biochimica et Biophysica**
12 **Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, [s. l.], v. 1867, n. 3, p. 159093,
13 2022.
- 14 MAIOLI, N. A. *et al.* The superoxide anion donor, potassium superoxide, induces pain
15 and inflammation in mice through production of reactive oxygen species and
16 cyclooxygenase-2. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista**
17 **brasileira de pesquisas medicas e biologicas**, [s. l.], v. 48, n. 4, p. 321–331, 2015.
- 18 MAITRA, U. *et al.* IRAK-1 contributes to lipopolysaccharide-induced reactive oxygen
19 species generation in macrophages by inducing NOX-1 transcription and Rac1
20 activation and suppressing the expression of antioxidative enzymes. **The Journal of**
21 **biological chemistry**, [s. l.], v. 284, n. 51, p. 35403–35411, 2009.
- 22 MARCHAND, F.; PERRETTI, M.; MCMAHON, S. B. Role of the immune system in
23 chronic pain. **Nature reviews. Neuroscience**, [s. l.], v. 6, n. 7, p. 521–532, 2005.
- 24 MARKEY, C. M. *et al.* Quantitative studies of hydroperoxide reduction by
25 prostaglandin H synthase. Reducing substrate specificity and the relationship of
26 peroxidase to cyclooxygenase activities. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v.
27 262, n. 13, p. 6266–6279, 1987.

- 1 MAS, E. *et al.* Resolvins D1, D2, and Other Mediators of Self-Limited Resolution of
2 Inflammation in Human Blood following n-3 Fatty Acid Supplementation. **Clinical**
3 **Chemistry**, [s. l.], v. 58, n. 10, p. 1476–1484, 2012.
- 4 MASOUDI, S.; ZHAO, Z.; WILLCOX, M. Relation between Ocular Comfort,
5 Arachidonic Acid Mediators, and Histamine. **Current Eye Research**, [s. l.], v. 42, n.
6 6, p. 822–826, 2017.
- 7 MAXIMIANO, T. K. E. *et al.* TRPV1: Receptor structure, activation, modulation and
8 role in neuro-immune interactions and pain. **Cell calcium**, [s. l.], v. 119, 2024.
- 9 MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. **Progress in**
10 **neurobiology**, [s. l.], v. 57, n. 1, p. 1–164, 1999.
- 11 MILLIGAN, E. D.; WATKINS, L. R. Pathological and protective roles of glia in chronic
12 pain. **Nature reviews. Neuroscience**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 23–36, 2009.
- 13 MITTAL, M. *et al.* Reactive Oxygen Species in Inflammation and Tissue Injury.
14 **Antioxidants & Redox Signaling**, [s. l.], v. 20, n. 7, p. 1126, 2014.
- 15 MÓCSAI, A.; WALZOG, B.; LOWELL, C. A. Intracellular signalling during neutrophil
16 recruitment. **Cardiovascular research**, [s. l.], v. 107, n. 3, p. 373–385, 2015.
- 17 MORITA, M. *et al.* The lipid mediator protectin D1 inhibits influenza virus replication
18 and improves severe influenza. **Cell**, [s. l.], v. 153, n. 1, p. 112–125, 2013.
- 19 MUKHERJEE, P. K. *et al.* Neuroprotectin D1: a docosahexaenoic acid-derived
20 docosatriene protects human retinal pigment epithelial cells from oxidative stress.
21 **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of**
22 **America**, [s. l.], v. 101, n. 22, p. 8491–8496, 2004.
- 23 NAZIROĞLU, M.; BRAIDY, N. Thermo-sensitive TRP channels: Novel targets for
24 treating chemotherapy-induced peripheral pain. **Frontiers in Physiology**, [s. l.], v. 8,
25 n. DEC, p. 326620, 2017.

- 1 NAZIROĞLU, M.; ÖZ, A.; YILDIZHAN, K. Selenium and Neurological Diseases:
2 Focus on Peripheral Pain and TRP Channels. **Current Neuropharmacology**, [s. l.],
3 v. 18, n. 6, p. 501, 2020.
- 4 NDENGELE, M. M. *et al.* Cyclooxygenases 1 and 2 contribute to peroxynitrite-
5 mediated inflammatory pain hypersensitivity. **FASEB journal : official publication**
6 **of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, [s. l.], v. 22, n.
7 9, p. 3154–3164, 2008.
- 8 NITURE, S. K.; JAIN, A. K.; JAISWAL, A. K. Retraction: Antioxidant-induced
9 modification of INrf2 cysteine 151 and PKC- δ -mediated phosphorylation of Nrf2
10 serine 40 are both required for stabilization and nuclear translocation of Nrf2 and
11 increased drug resistance. **Journal of cell science**, [s. l.], v. 130, n. 4, p. 816, 2017.
- 12 NORRIS, P. C. *et al.* Identification of specialized pro-resolving mediator clusters from
13 healthy adults after intravenous low-dose endotoxin and omega-3 supplementation: a
14 methodological validation. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 8, n. 1, 2018.
- 15 NUNES, P. R. *et al.* Potential role of uric acid to activate NLRP3 inflammasome
16 triggering endothelial dysfunction in preeclampsia. **Clinical Immunology**
17 **Communications**, [s. l.], v. 2, p. 69–75, 2022.
- 18 O'DONNELL, V. B. *et al.* Failure to apply standard limit-of-detection or limit-of-
19 quantitation criteria to specialized pro-resolving mediator analysis incorrectly
20 characterizes their presence in biological samples. **Nature Communications 2023**
21 **14:1**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 1–5, 2023.
- 22 OGAWA, N.; KUROKAWA, T.; MORI, Y. Sensing of redox status by TRP channels.
23 **Cell calcium**, [s. l.], v. 60, n. 2, p. 115–122, 2016.
- 24 PACQUELET, S. *et al.* Cross-talk between IRAK-4 and the NADPH oxidase.
25 **Biochemical Journal**, [s. l.], v. 403, n. Pt 3, p. 451, 2007.

- 1 PAMPLONA, F. A. *et al.* Anti-inflammatory lipoxin A4 is an endogenous allosteric
2 enhancer of CB1 cannabinoid receptor. **Proceedings of the National Academy of**
3 **Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 109, n. 51, p. 21134–21139,
4 2012.
- 5 PARK C. K. Maresin 1 Inhibits TRPV1 in Temporomandibular Joint-Related
6 Trigeminal Nociceptive Neurons and TMJ Inflammation-Induced Synaptic Plasticity in
7 the Trigeminal Nucleus. **Mediators of inflammation**, [s. l.], v. 2015, 2015.
- 8 PARK, C. K. *et al.* Resolving TRPV1- and TNF- α -mediated spinal cord synaptic
9 plasticity and inflammatory pain with neuroprotectin D1. **Journal of Neuroscience**,
10 [s. l.], v. 31, n. 42, p. 15072–15085, 2011.
- 11 PARK, E. S. *et al.* Levels of mitochondrial reactive oxygen species increase in rat
12 neuropathic spinal dorsal horn neurons. **Neuroscience letters**, [s. l.], v. 391, n. 3, p.
13 108–111, 2006.
- 14 PAYRITS, M. *et al.* Resolvin D1 and D2 inhibit transient receptor potential vanilloid 1
15 and ankyrin 1 ion channel activation on sensory neurons via lipid raft modification.
16 **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 21, n. 14, p. 1–17, 2020.
- 17 PÉREZ, S.; RIUS-PÉREZ, S. Macrophage Polarization and Reprogramming in Acute
18 Inflammation: A Redox Perspective. **Antioxidants**, [s. l.], v. 11, n. 7, 2022.
- 19 PERTWEE, R. G. Lipoxin A4 is an allosteric endocannabinoid that strengthens
20 anandamide-induced CB1 receptor activation. **Proceedings of the National**
21 **Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 109, n. 51, p.
22 20781–20782, 2012.
- 23 PIAO, S. *et al.* Protectin DX attenuates IL-1 β -induced inflammation via the
24 AMPK/NF- κ B pathway in chondrocytes and ameliorates osteoarthritis progression in
25 a rat model. **International Immunopharmacology**, [s. l.], v. 78, p. 106043, 2020.

- 1 PICIU, F. *et al.* TRP Channels in Tumoral Processes Mediated by Oxidative Stress
2 and Inflammation. **Antioxidants**, [s. l.], v. 12, n. 7, 2023.
- 3 PINHO-RIBEIRO, F. A. Dor e inflamação induzidas pelo KO₂: participação do fator
4 de transcrição NF-κB. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental),
5 Universidade estadual de Londrina, Londrina, p.21-22, 2014.
- 6 PINHO-RIBEIRO, F. A. *et al.* Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits superoxide anion-
7 induced pain and inflammation in the paw skin and spinal cord by targeting NF-κB
8 and oxidative stress. **Inflammopharmacology**, [s. l.], v. 24, n. 2–3, p. 97–107, 2016.
- 9 PINHO-RIBEIRO, F. A.; VERRI, W. A.; CHIU, I. M. Nociceptor Sensory Neuron-
10 Immune Interactions in Pain and Inflammation. **Trends in immunology**, [s. l.], v. 38,
11 n. 1, p. 5–19, 2017.
- 12 PLANAGUMÃ, A. *et al.* Lovastatin decreases acute mucosal inflammation via 15-epi-
13 lipoxin A4. **Mucosal immunology**, [s. l.], v. 3, n. 3, p. 270–279, 2010.
- 14 POLUS, A. *et al.* Omega-3 fatty acid supplementation influences the whole blood
15 transcriptome in women with obesity, associated with pro-resolving lipid mediator
16 production. **Biochimica et biophysica acta**, [s. l.], v. 1861, n. 11, p. 1746–1755,
17 2016.
- 18 RAJASAGI, N. K. *et al.* Controlling herpes simplex virus induced ocular inflammatory
19 lesions with the lipid derived mediator Resolvin E1. **Journal of immunology**
20 **(Baltimore, Md. : 1950)**, [s. l.], v. 186, n. 3, p. 1735, 2011.
- 21 RASQUEL-OLIVEIRA, F. S. *et al.* Specialized Pro-Resolving Lipid Mediators:
22 Endogenous Roles and Pharmacological Activities in Infections. **Molecules**, [s. l.], v.
23 28, n. 13, 2023.
- 24 RECCHIUTI, A. *et al.* MicroRNAs in resolution of acute inflammation: identification of
25 novel resolvin D1-miRNA circuits. **The FASEB Journal**, [s. l.], v. 25, n. 2, p. 544,
26 2011.

- 1 REINERTSEN, A. F. *et al.* Metabolization of Resolvin E4 by ω -Oxidation in Human
2 Neutrophils: Synthesis and Biological Evaluation of 20-Hydroxy-Resolvin E4 (20-OH-
3 RvE4). **ACS pharmacology & translational science**, [s. l.], v. 6, n. 12, p. 1898–
4 1908, 2023.
- 5 RENGACHAR, P.; POLAVARAPU, S.; DAS, U. N. Insights in diabetes: Molecular
6 mechanisms-Protectin DX, an anti-inflammatory and a stimulator of inflammation
7 resolution metabolite of docosahexaenoic acid, protects against the development of
8 streptozotocin-induced type 1 and type 2 diabetes mellitus in male Swiss albino mice.
9 **Frontiers in Endocrinology**, [s. l.], v. 13, p. 1053879, 2022.
- 10 ROCHA E SILVA, M. A brief survey of the history of inflammation. **Agents and**
11 **actions**, [s. l.], v. 8, n. 1–2, p. 45–49, 1978.
- 12 SADIK, C. D.; KIM, N. D.; LUSTER, A. D. Neutrophils cascading their way to
13 inflammation. **Trends in immunology**, [s. l.], v. 32, n. 10, p. 452–460, 2011.
- 14 SALVEMINI, D.; KIM, S. F.; MOLLACE, V. Reciprocal regulation of the nitric oxide
15 and cyclooxygenase pathway in pathophysiology: relevance and clinical implications.
16 **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative**
17 **Physiology**, [s. l.], v. 304, n. 7, p. R473, 2013.
- 18 SARAIVA-SANTOS, T. *et al.* Therapeutic activity of lipoxin A4 in TiO₂-induced
19 arthritis in mice: NF- κ B and Nrf2 in synovial fluid leukocytes and neuronal TRPV1
20 mechanisms. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 14, p. 949407, 2023.
- 21 SASAKI, A. *et al.* Determination of ω -6 and ω -3 PUFA metabolites in human urine
22 samples using UPLC/MS/MS. **Analytical and bioanalytical chemistry**, [s. l.], v. 407,
23 n. 6, p. 1625–1639, 2015.
- 24 SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. Can we conquer pain?. **Nature neuroscience**, [s. l.], v. 5
25 Suppl, n. 11s, p. 1062–1067, 2002.

- 1 SCHWARTZ, E. S. *et al.* Oxidative stress in the spinal cord is an important
2 contributor in capsaicin-induced mechanical secondary hyperalgesia in mice. **Pain**,
3 [s. l.], v. 138, n. 3, p. 514–524, 2008.
- 4 SCHWARTZ, E. S. *et al.* Persistent Pain Is Dependent on Spinal Mitochondrial
5 Antioxidant Levels. **The Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 29, n. 1, p. 159, 2009.
- 6 SCHWARZ, B. *et al.* Severe SARS-CoV-2 infection in humans is defined by a shift in
7 the serum lipidome resulting in dysregulation of eicosanoid immune mediators.
8 **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, [s. l.], v. 206, n. 2, p. 329, 2021.
- 9 SEKI, H. *et al.* The Anti-Inflammatory and Proresolving Mediator Resolvin E1
10 Protects Mice from Bacterial Pneumonia and Acute Lung Injury. **Journal of**
11 **immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, [s. l.], v. 184, n. 2, p. 836, 2010.
- 12 SERAFIM, K. G. G. *et al.* Bosentan, a mixed endothelin receptor antagonist, inhibits
13 superoxide anion-induced pain and inflammation in mice. **Naunyn-Schmiedeberg's**
14 **archives of pharmacology**, [s. l.], v. 388, n. 11, p. 1211–1221, 2015.
- 15 SERHAN, C. N. *et al.* Lipid Mediators in the Resolution of Inflammation. **Cold Spring**
16 **Harbor Perspectives in Biology**, [s. l.], v. 7, n. 2, 2015.
- 17 SERHAN, C. N. *et al.* Macrophage proresolving mediator maresin 1 stimulates tissue
18 regeneration and controls pain. **The FASEB Journal**, [s. l.], v. 26, n. 4, p. 1755–
19 1765, 2012.
- 20 SERHAN, C. N.; CHIANG, N.; VAN DYKE, T. E. Resolving inflammation: dual anti-
21 inflammatory and pro-resolution lipid mediators. **Nature reviews. Immunology**, [s.
22 l.], v. 8, n. 5, p. 349–361, 2008.
- 23 SERHAN, C. N.; ROSA, X. D. Ia; JOUVENE, C. C. Human Vagus Produces
24 Specialized Pro-Resolving Mediators of Inflammation with Electrical Stimulation
25 Reducing Pro-Inflammatory Eicosanoids. **Journal of immunology (Baltimore, Md. :
26 1950)**, [s. l.], v. 201, n. 11, p. 3161, 2018.

- 1 SERHAN, C. N.; SHEPPARD, K. A. Lipoxin formation during human neutrophil-
2 platelet interactions. Evidence for the transformation of leukotriene A₄ by platelet 12-
3 lipoxygenase in vitro. **The Journal of clinical investigation**, [s. l.], v. 85, n. 3, p.
4 772–780, 1990.
- 5 SHAM, H. P. *et al.* 15-epi-Lipoxin A₄, Resolvin D₂ and Resolvin D₃ induce NF- κ B
6 regulators in bacterial pneumonia. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**,
7 [s. l.], v. 200, n. 8, p. 2757, 2018.
- 8 SHARMA, M. *et al.* ADMA injures the glomerular filtration barrier: role of nitric oxide
9 and superoxide. **American journal of physiology. Renal physiology**, [s. l.], v. 296,
10 n. 6, 2009.
- 11 SHIBUYA, S. *et al.* Xanthine Oxidoreductase-Mediated Superoxide Production Is Not
12 Involved in the Age-Related Pathologies in Sod1-Deficient Mice. **International**
13 **Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 22, n. 7, p. 3542, 2021.
- 14 SHIVAKOTI, R. *et al.* Lipid Mediators of Inflammation and Resolution in Individuals
15 with Tuberculosis and Tuberculosis-Diabetes. **Prostaglandins & other lipid**
16 **mediators**, [s. l.], v. 147, p. 106398, 2020.
- 17 SIES, H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. **Redox biology**,
18 [s. l.], v. 4, p. 180–183, 2015.
- 19 SINGH, K. P. *et al.* Systemic biomarkers in electronic cigarette users: implications for
20 noninvasive assessment of vaping-associated pulmonary injuries. **ERJ Open**
21 **Research**, [s. l.], v. 5, n. 4, 2019.
- 22 SLIMEN, I. B. *et al.* Reactive oxygen species, heat stress and oxidative-induced
23 mitochondrial damage. A review. **International journal of hyperthermia: the**
24 **official journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North**
25 **American Hyperthermia Group**, [s. l.], v. 30, n. 7, p. 513–523, 2014.

- 1 SMITH, M. L. *et al.* Social transfer of pain in mice. **Science advances**, [s. l.], v. 2, n.
2 10, 2016.
- 3 SOUZA, M. C. *et al.* Lipoxin A4 attenuates endothelial dysfunction during
4 experimental cerebral malaria. **International immunopharmacology**, [s. l.], v. 24, n.
5 2, p. 400–407, 2015.
- 6 SUN, W. *et al.* Resolvin D1 suppresses pannus formation via decreasing connective
7 tissue growth factor caused by upregulation of miRNA-146a-5p in rheumatoid
8 arthritis. **Arthritis Research & Therapy**, [s. l.], v. 22, n. 1, 2020.
- 9 TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern recognition receptors and inflammation. **Cell**, [s.
10 l.], v. 140, n. 6, p. 805–820, 2010.
- 11 TAN, W. *et al.* Protectin DX exhibits protective effects in mouse model of
12 lipopolysaccharide-induced acute lung injury. **Chinese Medical Journal**, [s. l.], v.
13 131, n. 10, p. 1167–1173, 2018.
- 14 TOBÓN-ARROYAVE, S. I. *et al.* Salivary levels of specialized pro-resolving lipid
15 mediators as indicators of periodontal health/disease status. **Journal of clinical**
16 **periodontology**, [s. l.], v. 46, n. 10, p. 978–990, 2019.
- 17 TODD, A. J. Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. **Nature**
18 **reviews. Neuroscience**, [s. l.], v. 11, n. 12, p. 823, 2010.
- 19 TÖRÖCSIK, D. *et al.* Transcriptomic and lipidomic profiling of eicosanoid/docosanoid
20 signalling in affected and non-affected skin of human atopic dermatitis patients.
21 **Experimental Dermatology**, [s. l.], v. 28, n. 2, p. 177–189, 2019.
- 22 VERRI, W. A. *et al.* Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for
23 analgesic drug development?. **Pharmacology & therapeutics**, [s. l.], v. 112, n. 1, p.
24 116–138, 2006.

- 1 WALMSLEY, S. R. *et al.* Hypoxia-induced neutrophil survival is mediated by HIF-
2 1alpha-dependent NF-kappaB activity. **The Journal of experimental medicine**, [s.
3 *l.*], v. 201, n. 1, p. 105–115, 2005.
- 4
- 5 WANG, X. *et al.* Resolution of inflammation is altered in Alzheimer's disease.
6 **Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association**, [s. *l.*], v. 11,
7 n. 1, p. 40, 2015.
- 8 WEISS, G. A. *et al.* High levels of anti-inflammatory and pro-resolving lipid mediators
9 lipoxins and resolvins and declining docosahexaenoic acid levels in human milk
10 during the first month of lactation. **Lipids in Health and Disease**, [s. *l.*], v. 12, n. 1, p.
11 89, 2013.
- 12 WEYDERT, C. J.; CULLEN, J. J. Measurement of superoxide dismutase, catalase
13 and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. **Nature protocols**, [s. *l.*], v. 5,
14 n. 1, p. 51–66, 2010.
- 15 WHITE, P. J. *et al.* Protectin DX alleviates insulin resistance by activating a myokine-
16 liver glucoregulatory axis. **Nature Medicine** 2014 20:6, [s. *l.*], v. 20, n. 6, p. 664–669,
17 2014.
- 18 WIECH, K. *et al.* Influence of prior information on pain involves biased perceptual
19 decision-making. **Current Biology**, [s. *l.*], v. 24, n. 15, p. R679, 2014.
- 20 XIA, H. *et al.* Protectin DX increases survival in a mouse model of sepsis by
21 ameliorating inflammation and modulating macrophage phenotype. **Scientific**
22 **reports**, [s. *l.*], v. 7, n. 1, 2017.
- 23 YAM, M. F. *et al.* General Pathways of Pain Sensation and the Major
24 Neurotransmitters Involved in Pain Regulation. **International Journal of Molecular**
25 **Sciences**, [s. *l.*], v. 19, n. 8, 2018.

- 1 YAMACITA-BORIN, F. Y. *et al.* Superoxide anion-induced pain and inflammation
2 depends on TNF α /TNFR1 signaling in mice. **Neuroscience letters**, [s. l.], v. 605, p.
3 53–58, 2015.
- 4 YE, Y. *et al.* PDX regulates inflammatory cell infiltration via resident macrophage in
5 LPS-induced lung injury. **Journal of cellular and molecular medicine**, [s. l.], v. 24,
6 n. 18, p. 10604–10614, 2020.
- 7 YELLEPEDDI, V. K. *et al.* Predicting Resolvin D1 Pharmacokinetics in Humans with
8 Physiologically-Based Pharmacokinetic Modeling. **Clinical and translational**
9 **science**, [s. l.], v. 14, n. 2, p. 683–691, 2021.
- 10 ZANINELLI, T. H. *et al.* RvD1 disrupts nociceptor neuron and macrophage activation
11 and neuroimmune communication, reducing pain and inflammation in gouty arthritis
12 in mice. **British Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 179, n. 18, p. 4500–4515, 2022.
- 13 ZELKO, I. N.; MARIANI, T. J.; FOLZ, R. J. Superoxide dismutase multigene family: A
14 comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene
15 structures, evolution, and expression. **Free Radical Biology and Medicine**, [s. l.], v.
16 33, n. 3, p. 337–349, 2002.
- 17 ZHAO, Q. X. *et al.* Protectin DX Attenuates Lumbar Radicular Pain of Non-
18 compressive Disc Herniation by Autophagy Flux Stimulation via Adenosine
19 Monophosphate-Activated Protein Kinase Signaling. **Frontiers in Physiology**, [s. l.],
20 v. 12, p. 784653, 2021.

3. ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Dor, Inflamação, Neuropatia e Câncer, da Universidade Estadual de Londrina e segue as normas da revista (Inflammation Research). Os resultados parciais estão descritos no artigo intitulado “Analgesic, anti-inflammatory and antioxidant effect of PDX on superoxide anion-induced pain and inflammation in mice”.

**Analgesic, anti-inflammatory and antioxidant effect of PDX on superoxide
anion-induced pain and inflammation in mice**

Jessica A. Carneiro¹, Nayara A. Artero¹, Beatriz H. S. Bianchini¹, Thaila K. E. Maximiano¹, Geovana M. Cebinelli¹, Anelise Franciosi¹, Matheus D. V. da Silva¹, Thacyana T. de Carvalho¹, Waldiceu A. Verri Jr^{1*}.

¹ Departamento de Imunologia, Parasitologia e Patologia Geral, Universidade Estadual de Londrina – UEL, Rodovia Celso Garcia Cid, km 380, PR 445, 86057-970, Caixa Postal 10.011, Londrina, Paraná, Brasil.

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

1 Abstract

2 **Objective and design:** This study aimed to evaluate the analgesic, anti-inflammatory and
3 antioxidant effect of PDX in KO₂-induced inflammation and pain in mice.

4 **Treatment:** PDX at 1, 3, or 10 ng doses or vehicle (sterile saline) was administrated i.p. 1
5 hour before i.pl. or i.p. KO₂ (30 µg) or vehicle (sterile saline) injection.

6 **Methods:** After KO₂ or vehicle injection, we determined the mechanical hyperalgesia
7 (electronic version of the von Frey filaments), thermal hyperalgesia (hot plate test and
8 Hargreaves test), mechanical allodynia (manual version of von Frey filaments), weight
9 distribution (static weight bearing), and overt pain-like behaviors (abdominal writhings,
10 flinches and licking time). Additional behavioral experiments, without the KO₂ injection,
11 were made to assess mechanical (electronic version of the von Frey filaments) and thermal
12 (hot plate test and Hargreaves test) sensitivity and locomotor activity (rotarod test). Immune
13 cell recruitment was determined by histological and immunofluorescence analysis. Cytokine
14 production (IL-1 β and TNF- α) was assessed by ELISA. The antioxidant effect was evaluated
15 by NBT, ABTS, FRAP, GSH, and catalase assays. TRPV1 and pNF- κ B activation in the
16 DRG was assessed by immunofluorescence method. Toxicity biomarkers (ALT, AST, urea,
17 creatinine and MPO) were measured to determine the safety of acute PDX administration.

18 **Results:** PDX reduced KO₂-induced mechanical hyperalgesia, thermal hyperalgesia and
19 mechanical allodynia. PDX also decreased the overt-pain like behaviors and attenuated the
20 unbalance in body weight distribution over the hind paws. This effect proved to be essentially
21 analgesic, since treatment with PDX did not affect the normal mechanical and thermal
22 sensitivity or locomotor activity of the mice. PDX inhibited KO₂-induced leukocytes
23 recruitment, pro-inflammatory cytokines IL-1 β and TNF- α production, and the oxidative
24 stress. In addition, we observed that PDX reduced KO₂-induced TRPV1 activation, as well
25 TRPV1 co-staining with pNF- κ B, indicating reduction of neuronal activation, demonstrating a
26 new analgesic mechanism about this SPM. Acute treatment with PDX did not alter the plasma
27 levels of ALT, AST, creatinine, and urea, and the activity of stomach myeloperoxidase,
28 demonstrating the safety of administering this SPM.

29 **Conclusion:** PDX presents safe analgesic, anti-inflammatory and antioxidant activity in
30 experimental model of pain and inflammation triggered by a ROS.

31

32 **Key-words:** Specialized pro-resolving mediators; Reactive oxygen species; Pain;
33 Inflammation; Protectins.

1. Introduction

The inflammatory response is an innate immune mechanism that provides the first defense of the organism against a nocifensive stimulus and tissue damage. Pathogens or products derived from tissue injury, such as ATP, formylated peptides, and IL-33, lead to the activation of pattern recognition receptors (PRRs) expressed on immune cells, neurons, and other tissue cell types, promoting the production and secretion of pro-inflammatory mediators in the microenvironment [1-4]. The PRRs activation in resident immune cells, such as mast cells, dendritic cells, and tissue macrophages, culminates in the activation of nuclear factor kappa B (NF- κ B) [5,6]. NF- κ B pathway activation results in the translocation of this factor to the nucleus and subsequent transcription of pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , TNF- α , IL-6 and IL-8), adhesion molecules (E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1), lipid mediators derived from cyclooxygenase (COX) and lipoxygenase (LOX), such as prostaglandins and leukotrienes, and increased production of reactive oxygen (ROS) and nitrogen (RNS) species [4-6]. These factors orchestrate the cellular and vascular characteristic events of the initial phase of inflammation, such as vasodilation, increased vascular permeability, endothelial activation, and leukocyte recruitment.

Molecular oxygen (O_2) is constantly reduced during cellular respiration into reactive oxygen intermediates (ROI), such as superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$). The generation of this ROS occurs mainly through the mitochondrial electron transport chain (ETC) and the enzymatic activities of xanthine oxidase (XO) and NADPH oxidase (NOX) [7-9]. These ROS-generating systems promote the reduction of an oxygen electron, resulting in the successive production of $O_2^{\bullet-}$, hydrogen peroxide (H_2O_2), and hydroxyl radical ($OH^{\bullet}$). In addition, the $O_2^{\bullet-}$ can react with nitric oxide (NO) to form peroxynitrite ($ONOO^-$) [9, 10]. In physiological conditions, the generation and action of ROS are mainly controlled by endogenous enzymatic antioxidant systems, which include superoxide dismutase (SOD), catalase and glutathione peroxidase (GPx), for example [11, 12]. The SOD enzyme dismutates $O_2^{\bullet-}$ into H_2O_2 , while catalase and GPx convert H_2O_2 into H_2O and O_2 [11, 12]. Therefore, these enzymes promote the rapid dismutation of highly reactive components into more stable species that are less damaging to cellular components.

However, in some cases, such as during the inflammatory response, the inflammatory mediators (IL-1 β and TNF- α) release and inflammatory cells (neutrophils and macrophages) activation generates an exacerbated production of ROS, exceeding the antioxidant capacity of the organism. This imbalance between oxidant and antioxidant agents is termed oxidative

stress. Excess ROS causes damage to several cellular components, such as lipids, proteins, and nucleic acids. In the tissue microenvironment, in response to inflammatory stimuli, neutrophils, and macrophages produce large amounts of $O_2^{\bullet-}$ via NOX2 activation, in an NF- κ B-dependent manner [6,8,13]. The generation of ROS in the phagolysosomes of these phagocytes is essential for an effective microbicidal response. However, at elevated levels, these reactive species can reach the cytoplasm, promoting additional ROS production and resulting in intracellular pathways activation that produce pro-inflammatory mediators, such as cytokines, chemokines, and lipid mediators [14, 15, 16]. Thus, $O_2^{\bullet-}$ can promote endothelial activation, edema formation, leukocyte recruitment, and the development of hyperalgesia [17-19].

The presence of neutrophils in the inflammatory focus and the production of ROS by these cells is closely related to the development of inflammatory pain. As well as generating ROS, these polymorphonuclear cells produce significant levels of IL-1 β , TNF- α , and IL-33, contributing to the inflammatory response [20, 21]. The production of IL-33 initiates a sequential cascade for the generation of prostaglandins, a mediator capable of sensitizing nociceptive neurons. In general, IL-33 stimulates the production of TNF- α , which generates IL-6, which in turn promotes the production of IL-1 β , which, via stimulation of COX-2, produces PGE₂ [20, 21]. These mediators, including the ROS, promote the activation of protein kinases such as PKA, PKC, and MAPK, which phosphorylate ion channels such as TRPA1 (Transient Receptor Potential Channel Ankyrin 1) and TRPV1 (Transient Receptor Potential Channel Vanilloid 1), increasing their expression and activity and contribute to the activation and sensitization of nociceptors [22,23].

A crucial modulatory effect of ROS on nociceptive neurons is their ability to produce redox modifications in the free thiol groups in Transient Potential Receptor (TRP) channels, such as TRPV1 [24]. Since its discovery, TRPV1 has been linked directly to pain. TRPV1 is a capsaicin-responsive thermosensitive channel widely expressed in nociceptor C-fibers whose cell bodies reside in the dorsal root ganglion (DRG) and innervate tissues such as the skin [25]. ROS can generate redox modifications on cysteine residues present in the intra- and extracellular portions of TRPV1, resulting in its activation, with subsequent influx of Ca^{2+} through the pore and neuronal activation [26]. To investigate the pro-inflammatory and pro-nociceptive effects of $O_2^{\bullet-}$ activity, our research group has standardized a model that uses potassium superoxide (KO₂), a superoxide anion donor compound, as an agent to induce pain and inflammation from ROS [17]. In this model, the injection of KO₂ efficiently induces inflammation, oxidative stress, hyperalgesia, allodynia, and overt pain-like behaviors. The

inflammatory and hyperalgesic responses induced by KO₂ are dependent on the expression of TNF- α , COX-2, and endothelin-1 [17-19].

Inadequate treatment of acute pain has a negative impact on patients' quality of life and increase the risk of developing chronic pain. The usual pharmacological therapy for pain and inflammation is mainly the use of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). Although effective, these drugs can have side effects associated with prolonged use, such as kidney and gastrointestinal damage, immunosuppression, and infectious complications [27]. New research into effective anti-inflammatory and analgesic therapies with more limited adverse effects is needed.

Specialized pro-resolving mediators (SPMs) actively promote the resolution of inflammation in a time-dependent manner. SPMs are biosynthesized from ω -6 fatty acids, such as lipoxins (Lxs) derived from arachidonic acid, and ω -3 fatty acids, such as resolvins of the E series (RvE), derived from eicosapentaenoic acid (EPA), and resolvins of the D series (RvD), maresins (MaR) and protectins (PD), derived from docosahexaenoic acid (DHA) [28]. The principal effects exerted by SPMs on limiting the inflammatory response involve a reduction in the production of pro-inflammatory mediators (IL-1 β , TNF- α , IL-6, ROS, PGE₂), cessation of leukocyte infiltration, increase in the secretion of anti-inflammatory cytokines (IL-10, TGF- β), a switch in macrophage phenotype, efferocytosis, bacterial clearance, resolution of exudates to homeostasis and induction of tissue repair [28].

Protectin DX (PDX), an isomer of Protectin D1 (PD1), is a member of the protectin family and exerts efficient effects in limiting the inflammatory response. In LPS-induced lung injury models, PDX administration reduced pulmonary edema, leukocyte recruitment, and the expression of pro-inflammatory mediators (MCP-1, MIP-2, TNF- α , IL-1 β , IL-6, and MIP-1 α), as well as increasing IL-10 levels [29,30]. In a sepsis model, treatment with PDX favored bacterial clearance, reduced levels of pro-inflammatory cytokines, and induced switching towards the M2 macrophage phenotype, conferring improved survival and attenuation of multiple organ damage [31]. Recently, a study showed that PDX can modulate the activation of the NLRP3 inflammasome in a rheumatoid arthritis model, inhibiting the production of pro-inflammatory cytokines, increasing the production of anti-inflammatory cytokines, and expanding the population of regulatory T cells, attenuating the inflammatory response in this condition [32]. To the present, PDX has demonstrated anti-inflammatory and antioxidant effects in *in vitro* and *in vivo* models. However, its analgesic effect on inflammatory pain has not been explored consistently. Therefore, we aimed to investigate the PDX effects and mechanisms on pain and inflammation induced by superoxide anion in mice.

2. Material and methods

2.1 General experimental procedures

To define the dose-response curve, one hour before intraplantar (i.pl.) injection of vehicle (control group, sterile saline, NaCl 0.9%, 20 μ L) or KO₂ (30 μ g, 20 μ L), mice were treated with intraperitoneal (i.p.) vehicle (sterile saline, NaCl 0.9%, 100 μ L) or PDX (1, 3 or 10 ng, diluted in saline, 100 μ L). The dose of KO₂ used and the experimental protocols of the model were standardized in the laboratory [17]. Mechanical hyperalgesia, measured by electronic von Frey, and thermal hyperalgesia, initially determined by Hot Plate Test, were evaluated at times: 0 (baseline), 0.5, 1, 3, 5 and 7 hours after intraplantar injection of KO₂ or vehicle. The dose of 10 ng/animal of PDX was selected for the subsequent experiments. Thermal hyperalgesia was also evaluated using the Hargreaves Test at times 0 (baseline), 0.5, 1, 3, 5 and 7 hours after the injection intraplantar of KO₂ or vehicle. The mechanical allodynia was evaluated using manual von Frey filaments at times 0 (baseline), 0.5, 1, 3, 5 and 7 hours after the injection intraplantar of KO₂ or vehicle. The overt pain-like behaviors were assessed by the number of abdominal writhings, flinches and licking time after stimulus expressed cumulatively over 20 minutes and 30 minutes, respectively. Unbalanced weight distribution in the hind paws was determined using the static weight bearing (SWB) apparatus at times 0 (baseline), 1, 3, 5 e 7 hours after stimulation. To evaluate the baseline pain threshold, in the absence of KO₂ stimulation, mice received i.p. treatment with PDX (10 ng, 100 μ L) or sterile saline (NaCl 0.9%, 100 μ L). Mice were subjected to measurements of mechanical hyperalgesia, evaluated by electronic von Frey, at times 0 (baseline), 0.5, 1, 3, 5 and 7 hours after the treatment, and thermal hyperalgesia, determined by hot plate and Hargreaves test, at times 0 (baseline), 1, 3, 5 and 7 hours after the treatment. In addition, the motor function was evaluated using the rotarod performance test, in which mice were evaluated 0 (baseline), 0.5, 1, 3, 5 and 7 hours after the treatment with PDX (10 ng, 100 μ L) or vehicle (sterile saline, NaCl 0.9%, 100 μ L). After that, the following additional experiments were performed: neutrophil and macrophage recruitment to the paw skin 7 hours after KO₂ stimulus (H&E staining and LysM-eGFP fluorescence measurement). Determination of cytokine levels (ELISA) in the hind paw skin was performed 4 hours after intraplantar injection of KO₂ or vehicle. Oxidative stress assays were performed 1 (catalase assay) and 3 hours (FRAP, ABTS, NBT and GSH assays) after intraplantar injection of KO₂ or vehicle, reflected by the measurements of antioxidant defenses and superoxide anion production. TRPV1 and pNF- κ B activation in the DRG was assessed by immunofluorescence method 5 hours after stimulation

with KO₂ or vehicle. To determine whether acute treatment with PDX (10 ng, i.p.) could cause gastric, hepatic, or renal damage, stomach, and plasma samples were collected 7 hours after the intraplantar injection of KO₂ to determine stomach myeloperoxidase (MPO) activity and plasma concentrations of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), urea, and creatinine. In these toxicity assessment tests, positive control groups were treated with indomethacin (2.5 mg/kg, i.p., sampling within seven days) for gastric injury, acetaminophen (650 mg/kg, orally, sampling within 24 hours) for liver injury, or diclofenac (200 mg/kg, orally, sampling within 24 hours) for kidney injury. Briefly, Figure 1 shows the experimental protocols applied in this study.

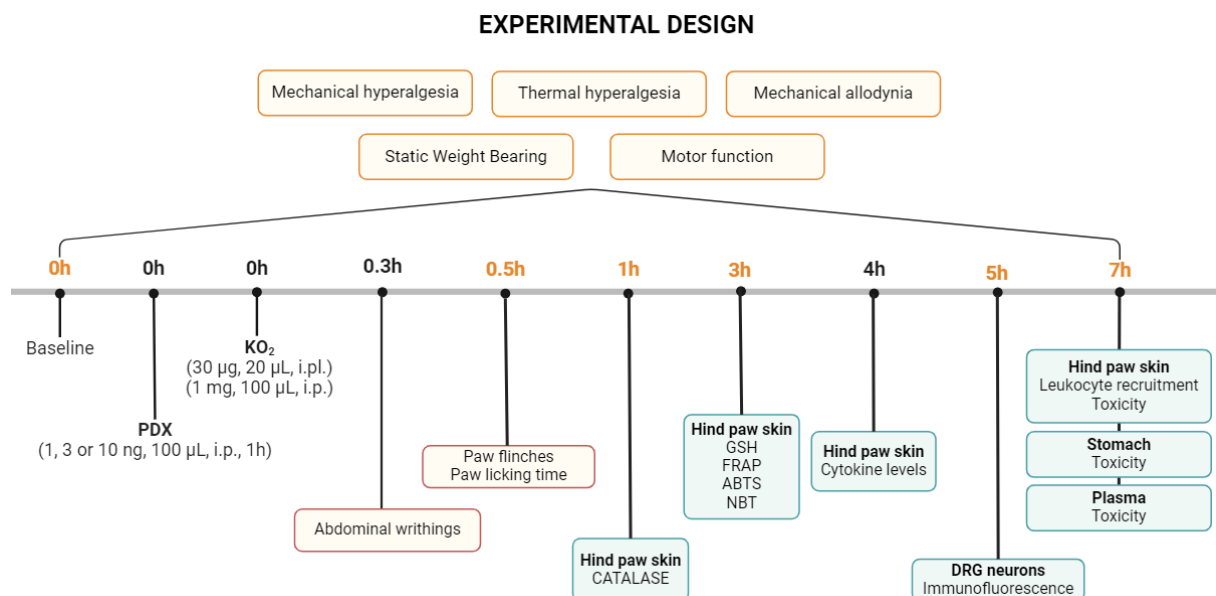


Figure 1 – Experimental design. Mice were treated with PDX (1, 3, or 10 ng/animal, i.p.) or vehicle (sterile saline) 1 hour before intraplantar injection of KO₂ (30 µg, 20 µL/animal) or vehicle (sterile saline, NaCl 0.9%, 20 µL/animal). The dose-response curve was determined by analyzing the parameters of mechanical hyperalgesia and thermal hyperalgesia determined by electronic von Frey and hot plate, respectively, were evaluated 0, 0.5, 1, 3, 5, and 7 hours after the KO₂ injection. Once the most efficient dose of PDX (10 ng) had been defined, other pain parameters were evaluated, such as thermal hyperalgesia and mechanical allodynia, determined by the Hargreaves test and von Frey filaments, respectively, were assessed 0, 0.5, 1, 3, 5 and 7 hours after the KO₂ injection. For analysis of non-evoked pain parameters, weight distribution on the hind paws was evaluated using static weight bearing at 0, 1, 3, 5, and 7 hours after the inflammatory stimulus. The overt-pain like behaviors evaluated were abdominal writhings, paw flinches, and paw licking time. Exceptionally, for the abdominal writhings, the mice received a KO₂ intraperitoneal injection (1 mg, 100 µL/animal), and the number of abdominal writhings was counted over 20 minutes. The paw flinches and licking time were counted over 30 minutes after the KO₂ intraplantar injection (30 µg, 20 µL/animal). To evaluate the baseline pain threshold and motor function, in the absence of KO₂ stimulation, mice were treated with PDX (10 ng, i.p.) or vehicle (sterile saline). Subsequently, mechanical hyperalgesia was evaluated by electronic von Frey, at times 0, 0.5, 1, 3, 5, and

7 hours after the treatment, the thermal hyperalgesia, determined by hot plate and Hargraves test, at times 0, 1, 3, 5 and 7 hours after the treatment, and the motor function was evaluated using the rotarod performance test at times 0, 0.5, 1, 3, 5 and 7 hours after the treatment. The hind paw skin was collected at 1, 3, 4, and 7 hours after the stimulus to assess the parameters of oxidative stress (catalase, GSH, FRAP, ABTS, and NBT assays), cytokine production, and leukocyte recruitment, respectively. In the fifth hour after the KO₂ injection, the DRG neurons were obtained for the immunofluorescence assay. Stomach and plasma samples were collected 7 hours after the stimulus to assess toxicity parameters.

2.2 Animals

Male swiss mice or LysM-eGFP C57/BL6 background mice from Londrina State University, Paraná, Brazil. The weight of the mice selected for the study was between 20-25 g. The mice were separated in appropriate plastic cages according to their respective groups, with food and water *ad libitum* and a light/dark-programmed 12/12h cycle in a room with a temperature of $21 \pm 1^\circ\text{C}$ and an air exhaust. Behavioral analyses were always conducted during the light cycle. Euthanasia was performed by three sequential procedures to minimize animals suffering. First, mice were anesthetized with a sublethal dose (5%) of isoflurane, followed by cervical dislocation, and subsequently decapitation. All experiments, including handling procedures and animal care, were approved by Londrina State University Ethics Committee under process number 003.2021 and were in accordance with the International Association for Study of Pain (IASP) guidelines.

2.3 Chemicals and drugs

Drugs and reagents used in the present study were obtained from the following sources: Protectin DX (10(S), 17(S)-DiHDHA) was from Cayman Chemical (Ann Arbor, Michigan, USA); superoxide anion (KO₂) 96.5% was from Alfa Aesar (Ward Hill, Massachusetts, USA); saline solution (NaCl 0.9%) was from Fresenius Kabi Brazil Ltda. (Aquiraz, CE, Brazil); isoflurane was from Abbott Laboratories (Abbott Park, Illinois, USA); Nitroblue tetrazolium (NBT) was from Amresco (Solon, Ohio, USA); and ferric chloride hexahydrate, 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ) and ABTS (2,20-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)) was from Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA).

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 compartment (12x10x17 cm) with a grid underneath. The tests consist 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 0.05mm² polypropylene tip, until a nociceptive reaction characteristic of withdrawal and shaking of the paw. Basal thresholds were determined before pre-treatment with PDX (1, 3 and 10 ng, 100 µL, i.p., 1 hour before the stimulus) or vehicle (sterile saline, NaCl 0.9%, 100 µL, i.p., 1 hour before the stimulus) and the i.pl. injection of the inflammatory stimulus with KO₂ (30 µg/20 µL/paw) or sterile saline (NaCl 0.9%, 20 µL/paw). Additional measurements were performed at 0.5, 1, 3, 5 and 7 hours after stimulus administration. In addition, the evaluation of mechanical hyperalgesia was also used to determine the baseline mechanical sensitivity threshold in the absence of i.pl. injection of KO₂. Basal thresholds were determined before i.p. treatment with PDX (10 ng, 100 µL) or sterile saline (NaCl 0.9%, 100 µL). Additional measurements were performed at 0.5, 1, 3, 5 and 7 hours after treatment. The results are expressed in delta (Δ), and these were calculated by subtracting the values obtained at measurement times 0.5, 1, 3, 5, 7 hours after the stimulus, from the basal value (T₀) before the stimulus [17].

2.5 Evaluation of thermal hyperalgesia

Plantar cutaneous thermal hyperalgesia was assessed using the Hargreaves Test and Hot Plate Test. In the hot plate test, the animals are placed on a metal plate with a constant temperature (52°C±1°C) and the end point was characterized by the removal of the paw followed by clear hind paw flinching or licking movements [17]. In this test, a metal plate heated to a noxious temperature stimulates both hind paws together, leading to the activation of supraspinal pathways and the appearance of behaviors such as jumping, paw flinching and licking. Therefore, to use another methodology that can integrate the data related to thermal hyperalgesia, we also used the Hargreaves test, in which the thermal stimulus derived from a radiant heat source (laser) is focused on only one of the hind paws, characterizing a more local and less comprehensive stimulus, there is also activation of supraspinal pathways, with the appearance of nociceptive behaviors such as paw flinching and licking. In the Hargreaves test, mice were individually confined to plexiglass chambers, and a high-intensity projector bulb was positioned to deliver beneath the right hind paw to a direct thermal stimulus [33]. The withdrawal latency period of the injected paw was determined with an electronic clock circuit.

Basal thresholds were determined before pre-treatment with PDX (1, 3 and 10 ng, 100 µL, i.p., 1 hour before the stimulus) or vehicle (sterile saline, NaCl 0.9%, 100 µL, i.p., 1 hour

before the stimulus) and the i.pl. injection of the inflammatory stimulus with KO₂ (30 µg/20 µL/paw) or sterile saline (NaCl 0.9%, 20 µL/paw). Additional measurements were performed at 0.5, 1, 3, 5 and 7 hours after stimulus administration. In addition, the evaluation of thermal hyperalgesia was also used to determine the baseline thermal sensitivity threshold in the absence of i.pl. injection of KO₂. Basal thresholds were determined before i.p. treatment with PDX (10 ng, 100 µL) or sterile saline (NaCl 0.9%, 100 µL). Additional measurements were performed at 1, 3, 5 and 7 hours after treatment. The results are expressed by withdrawal latency (in seconds). Care was taken to avoid any potential tissue damage by setting the cut-off at 20 seconds.

2.6 Evaluation of mechanical allodynia

Basal thresholds were determined before pre-treatment with PDX (10 ng, 100 µL, i.p., 1 hour before the stimulus) or vehicle (sterile saline, NaCl 0.9%, 100 µL, i.p., 1 hour before the stimulus) and the i.pl. injection of the inflammatory stimulus with KO₂ (30 µg/20 µL/paw) or sterile saline (NaCl 0.9%, 20 µL/paw). Additional measurements were performed at 0.5, 1, 3, 5 and 7 hours after stimulus administration. Mice were placed in a transparent plastic box with a wire mesh bottom and allowed behavioral habituation for approximately 15 minutes. The area tested was the mid-plantar left hind paw. A series of filaments (0.04, 0.07, 0.016, 0.4, 0.6, 1, 1.4, 2, 4, 6, 8, 10 and 15 g) was applied in sequence to starting with one that possessed a bucking weight of 0.6 g, was applied in sequence to the plantar surface of the ipsilateral paw with a pressure that caused the filament to buckle. Lifting of the paw was recorded as a positive response and the next lightest filament was chosen for the subsequent measurement. The absence of a response up was chosen for the subsequent measurement. The absence of a response up prompted the use of the next filament of increasing weight. The 50% g withdrawal threshold was determined using the up-down method of Dixon (1980), modified by Chaplan, Bach, Pogrel, Chung, and Yaksh (1994).

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

Before the stimulus with KO₂ to induce the overt pain-like behaviors, the animals were pre-treated with PDX (10 ng, 100 µL, i.p., 1 hour before the stimulus) or vehicle (sterile saline, NaCl 0.9%, 100 µL, i.p., 1 hour before the stimulus). Animal abdominal writhings were induced by i.p. administration of KO₂ (1 mg, 100 µL) or vehicle (sterile saline, 100 µL) [17]. Right after KO₂ injections, mice were gently and individually placed in a glass cylinder

with enough space for free movement. The total number of abdominal writhing responses in a period of 20 minutes following KO₂ i.p. stimulus was quantitated as a measure of nociceptive behavior. For this assay, a positive response was considered when the animal performed a stretching of the hind limbs associated with a slow abdominal wall contraction. Regarding paw flinches and the time spent licking the paw, behaviors were analyzed during 30 minutes immediately after i.p. stimulus with KO₂ (30 µg/20 µL/paw) or vehicle (sterile saline, 20 µL/paw) [17]. The same conditions and glass utensil described for the use of the abdominal contortion analysis were used for the quantification of paw flinches and the time spent licking the paw. Results were expressed as the total number of abdominal writhings, paw flinches and the time spent licking (in seconds) after the stimulus.

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

Unilateral peripheral inflammation produces changes in paw weight distribution toward the non-injured paw [34]. 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 gently placed into an acrylic chamber, where the animals are comfortably maintained while their hind paws rest on two separate sensor plates. Mice were habituated for four consecutive days prior to the behavioral testing. The animals stand and makes a natural adjustment to the degree of pain by adapting weight distribution on the non-injured rear paw, and the value of the weight applied on each sensor is displayed on the LCD screen of the control unit. Mice were tested before (baseline values) and after treatment and stimulus. The results are expressed by right/left paw ratio, which was calculated by using the mean of two measurements at 0 (baseline value), 1, 3, 5 and 7 hours after KO₂ injection (30 µg/20 µL/paw) or vehicle (NaCl 0.9%, 20 µL/paw).

2.9 Motor Performance Assessment

To evaluate whether treatment with PDX (10 ng, 100 µL, i.p.) affects the motor function of mice, motor performance was assessed using the rotarod performance test. The test is used to quantitate the effects of varied conditions and procedures upon motor planning with very high reliability [35]. The apparatus consists of a bar with a diameter of 2.5 cm, subdivided into four compartments by disks of 25 cm in diameter (Ugo Basile, model 7600). During the measurements, the bar rotates at a constant speed of 22 rotations per minute. Mice were evaluated 0 (baseline), 0.5, 1, 3, 5 e 7 hours after the treatment with PDX (10 ng, 100 µL, i.p.) or vehicle (sterile saline, NaCl 0.9%, 100 µL, i.p.). The cut-off time used was 180s.

2.10 Paw Tissue Histology

Plantar tissue was collected 7 hours after KO₂ stimulus (30 µg/20 µL/paw) or vehicle (sterile saline, NaCl 0.9%, 20 µL/paw). Paraffin-embedded hind paw tissue was processed for hematoxylin and eosin (H&E) staining. Samples were fixed with 10% paraformaldehyde in PBS prior to embedding. The sectioned tissues (7 µm) were stained with hematoxylin-eosin (HE) for later examination under an optical microscope (Olympus OX31, Olympus, Japan; original magnification, 40x). The analysis was performed using a clinical score, where neovascularization and inflammatory infiltrate were evaluated, being scored from 0-3, demonstrating a degree of tissue degradation according to the increasing level, with 0 for no change and 3 for the most serious change, in which case it could be a significant increase in new vessels and inflammatory infiltrate that damage the tissue. Analyses were performed on ImageJ 1.44 software for Windows (Java image software in public domain: <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) using the threshold tool and performed on RGB images without further treatment. Leukocyte recruitment was determined using 1086333 pixels as the dimension area.

2.11 Paw Tissue Fluorescence

The paw was collected 7 hours after the i.pl. injection of KO₂ or vehicle. Optimum cutting temperature reagent (Tissue-Tek 1, O.C.T. Compound, IA018, ProSciTech, Australia) embedded paw tissue dissected from LysM-eGFP⁺ CD57BL/6 background mice were used for this assay. LysM-eGFP mice express enhanced green fluorescent protein (eGFP) expression controlled by the lysozyme M promoter (LysM) present in neutrophils and macrophage granules. Hind paw tissue was dissected 7 hours after i.pl. stimulus with KO₂ (30 µg/20 µL/paw) or vehicle (sterile saline, NaCl 0.9%, 20 µL/paw) and maintained in 4% paraformaldehyde (PFA, 24 hours) and then in 30% sucrose (72 hours). Fluoromount G reagent (00-4958-02, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) was added to 30 µm sections that were put in slides to complete their assembly. Imaging was performed using a confocal microscope (Leica TCS SP8, Leica, Wetzlar, Germany) with a 40x objective. Images were processed using Leica EL6000 software (Leica, Wetzlar, Germany). The intensity of fluorescence was quantified by an investigator blinded to the treatment in randomly selected fields (one field per sample, n=8) of different groups as an indication of neutrophil/macrophage recruitment to the paw tissue. The results are expressed as eGFP fluorescent intensity (%).

2.12 Cytokine Measurement

Paw skin tissue was collected 2 hours after stimulation with KO₂ (30 µg/20 µL/paw) or vehicle (sterile saline, NaCl 0.9%, 20 µL/paw), processed using a surgical scalpel blade, and placed in a 24-well plate containing DMEM (Dulbeccos Modified Eagles Medium) culture medium and incubated in a humid oven (37°C, 5% CO₂) for 2 hours. After the incubation time, the culture medium was collected for the test. Thus, cytokine levels were measured 4 hours after the KO₂ injection. IL-1β and TNF-α were determined by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using eBioscience kits (eBioscience, San Diego, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The measurements were conducted at 450 nm. The results were expressed as picograms (pg) per mL of medium of each cytokine.

2.13 Measurement of Reduced Glutathione (GSH) levels

For determination of GSH levels, samples of the hind paw skin were dissected 3 hours after intraplantar injection of KO₂ (30 µg/20 µL/paw) or vehicle (sterile saline, NaCl 0.9%, 20 µL/paw). Homogenates were mixed with 25 µL of 50% trichloacetic acid, vortexed three times for 15 minutes, and centrifuged (15 min, 1500g, 4°C) and the resulting supernatant was added to 200 µL of 0.2 M Tris buffer, pH 8.2, and 10 µL of 0.01 M DTNB. After 5 minutes of incubation at room temperature, the absorbance was measured at 412 nm. A standard curve of GSH was used, and the results are expressed as GSH (nmol per mg of protein).

2.14 Measurement of catalase levels

The analysis of catalase activity was evaluated by measuring the decay in the concentration of H₂O₂ and the generation of oxygen. For determination of catalase levels, samples of the hind paw skin were dissected 1 hour after intraplantar injection of KO₂ (30 µg/20 µL/paw) or vehicle (sterile saline, NaCl 0.9%, 20 µL/paw). Samples were homogenized in 500 µL of 0.02 M EDTA using a Tissue-Tearor (Biospec), and centrifuged twice (2,700 g, 10 min, 4°C). The reaction mixture contained 10 µL of sample, 160 µL of buffer Tris-HCl 1 M with EDTA 5mM (pH 8.0), 20 µL of deionized water and 20 µL of H₂O₂ 200 mM. The catalase activity was determined through the difference between the initial reading and the reading conducted 30s after the addition of H₂O₂ at 240 nm in a microplate reader (EnSpire, Perkin Elmer) at 25°C. The catalase values were expressed as unit of catalase/mg of tissue/minute.

2.15 Superoxide Anion Production

Superoxide anion production in paw tissue samples was evaluated using the NBT reduction assay, as previously described [36]. Samples were collected 3 hours after stimulation with KO₂ (30 µg/20 µL/paw) or vehicle (sterile saline, NaCl 0.9%, 20 µL/paw) and then incubated (37°C, 1 hour) with an NBT reagent (100 µL, 1 mg/mL). The supernatant was then accurately removed by pipetting, and the reduced formazan formed was solubilized with KOH (120 µL) and DMSO (140 µL). Measurement was performed immediately after adding KOH and DMSO at 600 nm using a microplate spectrophotometer reader (Multiskan GO, Thermo Fisher Scientific). The results are expressed as NBT reduction (OD/mg of paw skin tissue).

2.16 Total Antioxidant Capacity: Ferric Reducing Ability Potential (FRAP) and Ability to Scavenge the 2'2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic Acid (ABTS) Radical Assays.

The capacity to counteract oxidative deleterious effects was evaluated in paw skin samples by FRAP and ABTS tests 3 hours after stimulation with KO₂ (30 µg/20 µL/paw) or vehicle (sterile saline, NaCl 0.9%, 20 µL/paw). Samples of paw skin tissue were dissected and homogenized in KCl buffer, for subsequent centrifugation (200g x 10min x 4°C). The supernatant was used for both FRAP and ABTS tests. For the FRAP assay, samples were incubated (37°C, 30 min) with 150 µL of FRAP reagent and read at 595 nm (Multiskan GO, Thermo Fisher Scientific, Vantaa, Finland), while for the ABTS assay, samples were incubated (25°C, 6 min) with 200 µL of ABTS and read at 730 nm. A standard Trolox curve (0.02-20 nmol) was used to equalize FRAP and ABTS tests. The results are presented as nanomols of Trolox equivalent/milligram of paw tissue.

2.17 Immunofluorescence

DRG (L4-L6 segments) was dissected 5 hours after intraplantar injection of KO₂ (30 µg/20 µL/paw) or vehicle (sterile saline, NaCl 0.9%, 20 µL/paw). Mice were first intracardially perfused with PBS followed by 4% PFA. DRG samples were then post-fixed with 4% PFA overnight at 4°C and then replaced with 30% sucrose for 3 days at 4°C. DRG was embedded in optimum cutting temperature (OCT) compound, and 10 µm sections were cut in a cryostat and processed for immunofluorescence. Before incubation with antibodies, slides were blocked with 5% goat serum in BS, 0.5% Triton X-100 (0.5% PBST). Primary

antibodies used in this study were: anti-TRPV1 (TRPV1; 1:200, cat #sc-12498, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA; RRID: AB_2241046) and anti-pNF- κ B (pNF- κ B; 1:200, cat #sc-136546, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA; RRID:106103691). All primary antibodies were incubated overnight at 4°C (2% goat serum in 0.5% PBST) and then washed four times with 0.5% PBST before proceeding with secondary antibody incubations. Secondary antibodies used in this study were: Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit (1:500, cat #ab98488, Abcam; Cambridge, UK RRID: AB_10676096) and Alexa Fluor 647 goat anti-mouse (1:500, cat #ab150075, Abcam, Cambridge, UK; RRID: AB_2752244). The nuclei were constrained with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol (1:500, cat #14285, Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA). All secondary antibodies were incubated for 50 min at room temperature (2% goat serum in 0.5% PBST). Stained slides were then washed five times with 0.3% PBST and mounted in Fluoromount-G compound (cat #0100-01, SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA). Slides labeled only with secondary antibodies were used as a positive control, in order to exclude the possibility of nonspecific labeling. The images were taken in a Confocal microscope (TCS SP8, Leica Microsystems, Mannheim, Germany) and fluorescence intensity measured using Leica EL6000 software (Leica, Wetzlar, Germany). The results are expressed as fluorescent intensity and by manually counting the total number of TRPV1⁺ neurons (expressed in percentage) and the number of TRPV1⁺/pNF- κ B neurons (expressed in percentage).

2.18 Stomach Toxicity Assay (Myeloperoxidase)

The myeloperoxidase (MPO) activity was used to determine stomach toxicity via a colorimetric assay, at this is a reliable marker for non-steroidal anti-inflammatory-drug-induced lesions [37]. Mice were treated with PDX (10 ng, i.p.), one hour before the KO₂ intraplantar injection. For this assay, the positive control used was daily intraperitoneal treatment with indomethacin (2.5mg/kg) over 7 days [38]. After 7 hours or 7 days, stomach samples were collected in 50 mM K₂HPO₄ buffer (pH 6.0) containing 0.5% hexadecyl trimethylammonium bromide (HTAB) and kept at -80°C until use. Frozen samples were homogenized using a tissue turrax (Tissue-Tearor 985370, BioSpec Products, Bartlesville, OK, USA), centrifuged (2 min, 14.000 rpm, 4°C), and the resulting supernatant was assayed using a spectrophotometer (Multiskan GO Microplate Spectrophotometer, Thermo Scientific, Vantaa, Finland) to determine MPO activity at 450 nm. The MPO activity of samples was compared to a standard curve of neutrophils. Briefly, 15 μ L of sample was mixed with 200 μ L of 50 mM phosphate buffer (pH 6.0) containing 0.167 mg/mL of O-

dianisidinedihydrochloride and 0.015 hydrogen peroxide. The results were represented as MPO activity (number of neutrophils/mg of tissue).

2.19 Liver and kidney toxicity assays

Elevated plasma ALT and AST levels are indicative of hepatic damage [39], as well as high levels of creatinine and urea in plasma are biomarkers of kidney damage [40]. For these tests, mice were treated with PDX (10 ng, i.p.), one hour before the KO₂ intraplantar injection. For the ALT and AST tests, the positive control used was a once oral treatment with acetaminophen (650 mg/kg), with plasma collected 24 hours after treatment [41]. For the urea and creatinine assays, the positive control used was a once oral treatment with diclofenac (200 mg/kg), with plasma collected 24 hours after treatment [42]. Thus, after 7 hours or 24 hours, blood was harvested in microtubes containing 50 µL of the anticoagulant heparin (5000 IU/mL), centrifuged (200 x g, 10 min, 4°C), and the plasma was separated. In order to determine enzymatic activities of AST and ALT as indicators of hepatotoxicity compared to acetaminophen, and to ascertain urea and creatinine levels as indicators of nephrotoxicity compared to diclofenac, plasma samples were processed according to the manufacturer's instructions (Labtest Diagnóstico S.A, Lagoa Santa, Brazil). Results were presented as U/mL (ALT and AST) or mg/dL (urea and creatinine) of plasma.

2.20 Data analysis

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

3. Results

3.1 PDX reduces KO₂-induced mechanical hyperalgesia, thermal hyperalgesia and mechanical allodynia.

Firstly, we conducted a dose-response curve of PDX to determine which dose presented a higher analgesic effect using mechanical hyperalgesia, thermal hyperalgesia and mechanical allodynia tests. KO₂ (30 µg/20 µL/paw) produced an increase in mechanical and thermal response intensity when compared to the saline group (Figure 2).

In the mechanical hyperalgesia analysis (Figure 2A), the three doses of PDX (1, 3 and 10 ng/animal, 100 µL, i.p.) significantly reduced the parameters of mechanical hyperalgesia at all times of analysis. In the thermal hyperalgesia analyses, determined using the hot plate test (Figure 2B), the doses 3 and 10 ng of PDX (100 µL, i.p.), reduced the hyperalgesia from the first hour until the seventh. The 1 ng dose showed analgesic potential only in the third hour. The 10 ng of PDX (100 µL, i.p.) dose demonstrated the best analgesic potential compared to the other doses. Therefore, this dose of PDX was adopted for the subsequent experiments.

The 10 ng dose of PDX (100 µL, i.p.) was also effective in reducing mechanical allodynia (Figure 2C), as well as reducing thermal hyperalgesia, as assessed by the Hargreaves Test (Figure 2D) induced by KO₂ injection. Furthermore, it is important to emphasize that by using two different methodologies to determine the thermal hyperalgesia parameter (hot plate and Hargreaves test), we limited some possible experimental biases, allowing the evaluation of the analgesic potential of PDX to be carried out with greater precision when compared to previous studies that evaluated this pain parameter [43]. Thus, in our study, we demonstrated that PDX can reduce the thermal hyperalgesia parameter in a broader test (hot plate, stimulation with the heat source of both the ipsilateral and contralateral paw) (Figure 2B) and a more targeted test (Hargreaves test, heat source stimulation of the ipsilateral paw exclusively) (Figure 2D).

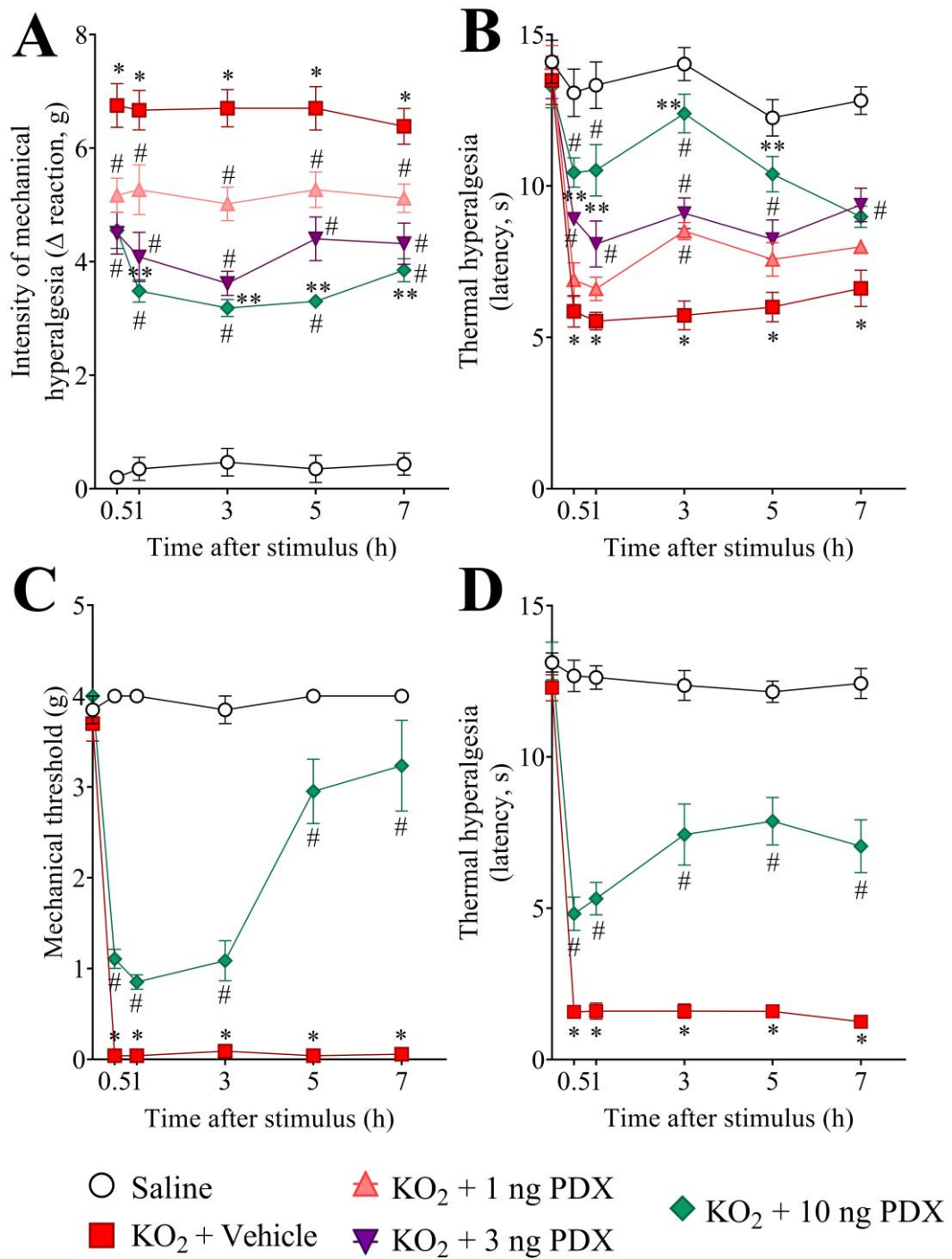


Figure 2 – PDX reduces KO₂-induced mechanical hyperalgesia, thermal hyperalgesia and mechanical allodynia. Intensity of mechanical hyperalgesia (A), thermal hyperalgesia (B, D) and mechanical allodynia (C) was evaluated 0.5, 1, 3, 5 and 7 hours after stimulus using an electronic von Frey, hot plate apparatus, Hargreaves apparatus and von Frey manual filaments, respectively. Results are presented as Δ mean $\pm$ SEM; $n = 6$ mice per group per experiment (* $P < 0.05$ vs saline group; # $P < 0.05$ vs vehicle group; ** $P < 0.05$ vs 1 ng of PDX group [two-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test]).

3.2 PDX decreases KO₂-induced overt pain-like behaviors and the unbalanced body weight distribution in the hind paws.

To determine the efficacy of PDX on KO₂-induced non-evoked pain (Figure 3), the mice were treated with 10 ng PDX (i.p.) or vehicle (sterile saline, i.p.), one hour before receiving the stimulus.

Thus, we next evaluate whether the treatment with PDX decreases KO₂-induced overt pain-like behavior (Figure 3A-C). The abdominal writhings were determined over 20 minutes after intraperitoneal injection of KO₂ (1 mg/100 μ L) (Figure 3A). Intraperitoneal stimulus with KO₂ increased the number of abdominal writhings when compared to the saline group. Treatment with PDX (10 ng) reduces significantly KO₂-induced number of abdominal writhings (Figure 3A). The paw flinches (Figure 3B) and time spent licking the paw (Figure 3C) were determined over 30 minutes after intraplantar injection of KO₂ (30 μ g/20 μ L/paw). Intraplantar stimulus with KO₂ increased the number of paw flinches and time spent licking the paw when compared to the saline group (Figure 3B, 3C). Treatment with PDX (10 ng) reduces significantly KO₂-induced number of paw flinches (Figure 3B) and the time spent licking the paw (Figure 3C).

To examine pain using a non-reflexive method, we assessed the distribution of body weight on the hind paws determined by SWB apparatus. Intraplantar administration of KO₂ (30 μ g/20 μ L/paw) induced unbalanced weight distribution on the rear paws, evidenced by the decreased the right/left paw ratio (Figure 3D). The heat map shows the right/left hind paw ratio of each mouse (Figure 3E). Thus, the treatment with PDX (10 ng, i.p.) increased the right/left paw ratio (Figure 3D), reducing the unbalanced weight distribution on the hind paws, demonstrating the analgesic effect in a nonreflexive method of pain measurement.

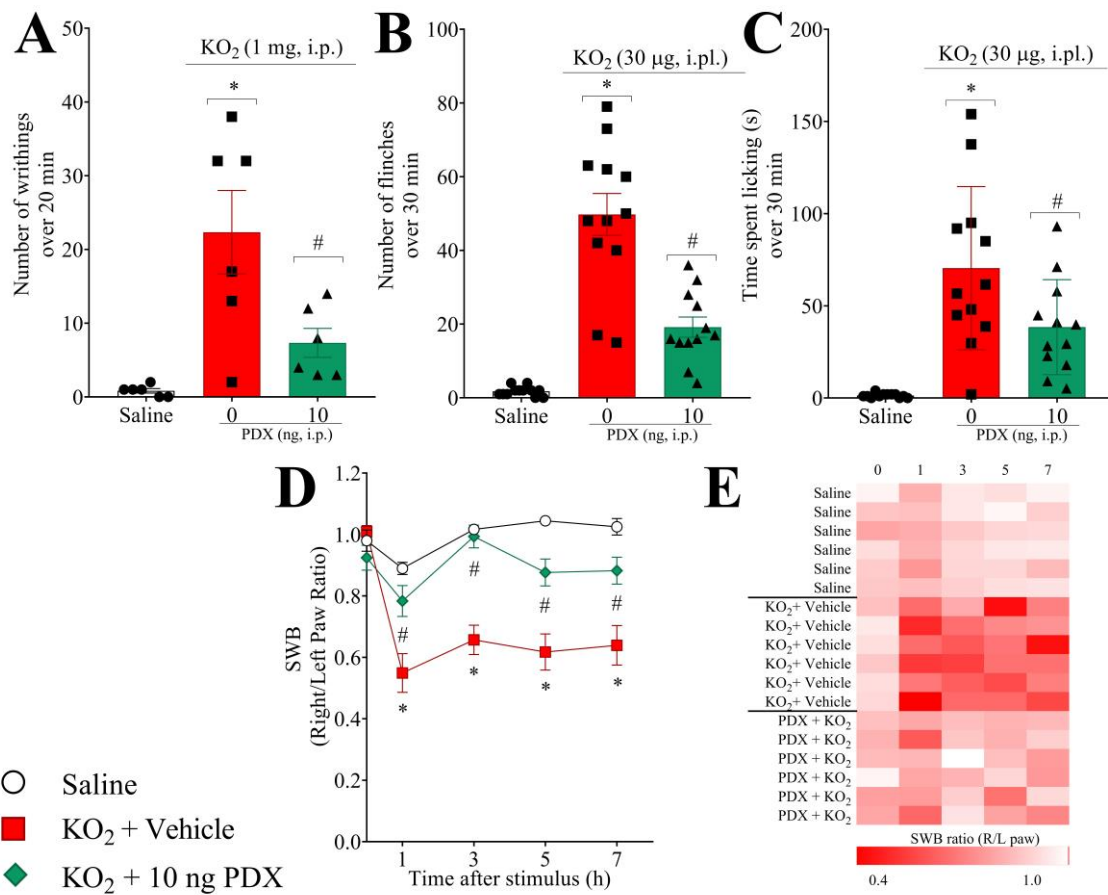


Figure 3 – PDX decreases KO₂-induced overt pain-like behaviors and unbalanced body weight distribution in the hind paws. The number of abdominal contortions over 20 min (A) after intraperitoneal injection of KO₂ (1 mg/cavity). The number of paw flinches (B) and time spent licking the paw (C) were determined over 30 min after intraplantar injection of KO₂ (30 µg/paw). Results are presented as total number of writhings (over 20 min) (mean $n \pm$ SEM; $n=6$ mice per group per experiment), flinches and time spent licking the paw (over 30 min) (mean $n \pm$ SEM; $n=12$ mice per group per experiment) (* $P < 0.05$ vs saline group; # $P < 0.05$ vs vehicle group). SWB was used as a nonreflexive method of pain measurement (D), and this parameter was evaluated 1, 3, 5 and 7 hours after stimulus. The heat map shows the right/left hind paw ratio of each mouse (E). Results are presented as weight ratio of left/right hind paw; $n=6$ mice per group per experiment (* $P < 0.05$ vs saline group; # $P < 0.05$ vs vehicle group [one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test (A-C) or two-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test (B)]).

3.3 Treatment with PDX does not alter baseline mechanical sensitivity, heat sensitivity and motor function in naïve animals.

To examine whether treatment with PDX (10 ng), in the absence of KO₂ stimulus, would cause changes in mechanical sensitivity, thermal sensitivity and motor function (Figure 4), the mice were treated with PDX (10 ng, i.p.) or vehicle (sterile saline, i.p.) one hour before the start of the experiments.

The mechanical sensitivity was assessed using the electronic von Frey method at 0, 0.5, 1, 3, 5 and 7 hours after treatment with PDX or vehicle. PDX did not generate a significant change in mechanical sensitivity over all the analysis times (Figure 4A). The thermal sensitivity was determined using the hot plate method and the Hargreaves test at 0, 1, 3, 5, and 7 hours after treatment with PDX or vehicle. PDX also did not produce any change in the heat sensitivity in either of the analysis periods (Figure 4B, 4C). Finally, motor function was analyzed using the rotarod apparatus at 0.5, 1, 3, 5 and 7 hours after treatment with PDX or vehicle. PDX did not cause any motor function deficits in the mice at either of the analysis times (Figure 4D). These additional behavioral experiments aimed to verify that the reduction in pain provided by the administration of PDX is derived from an analgesic effect, and not from an anesthetic or muscle relaxation effect, which could prevent the animals from responding adequately to mechanical and thermal stimuli, as well as affecting normal motor function. Thus, the results confirmed that the administration of PDX provides an analgesic effect, rather than an anesthetic or muscle relaxation action, since the baseline threshold of mechanical (Figure 4A) and thermal sensitivity (Figure 4B, 4C), as well as the motor activity of the animals (Figure 4D), were not altered after treatment with the drug.

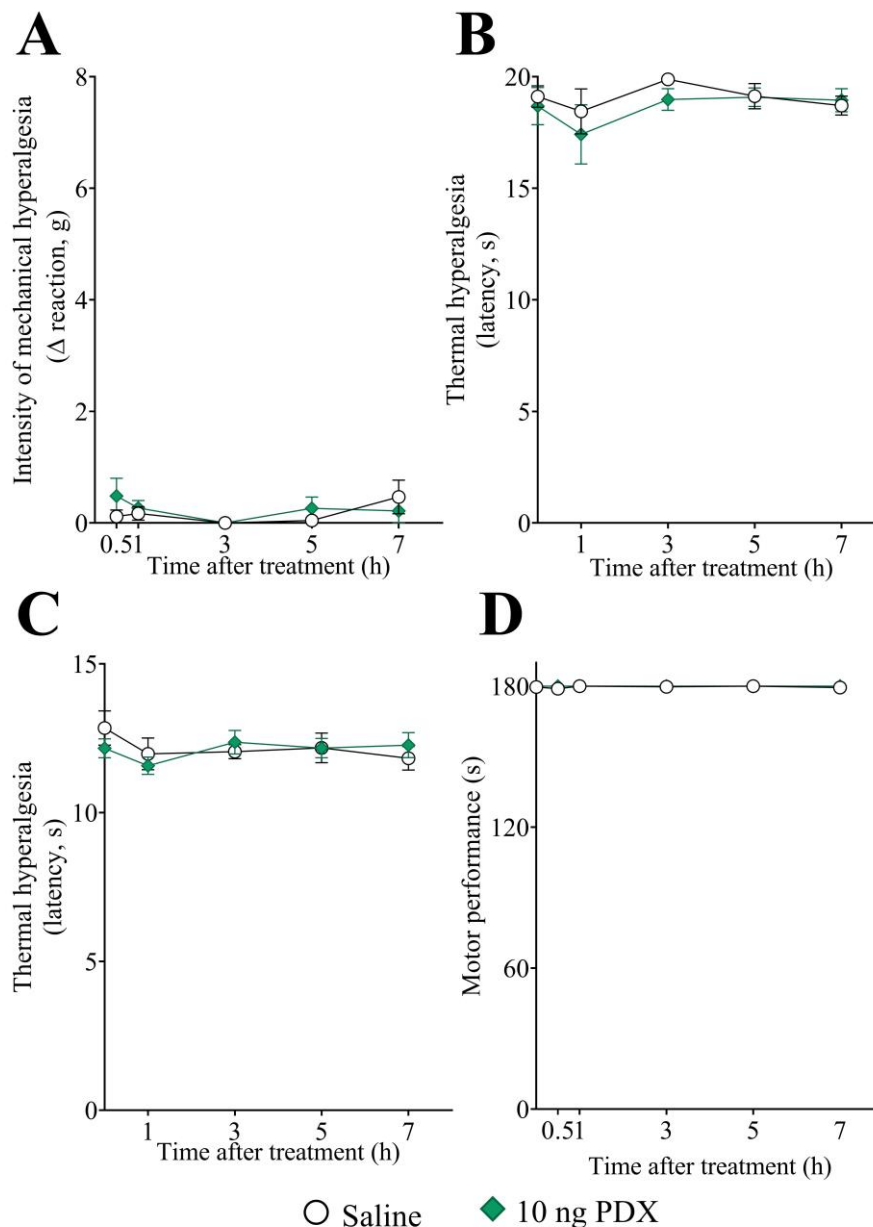


Figure 4 – Treatment with PDX does not alter baseline mechanical sensitivity, heat sensitivity and motor function in naïve animals. The mechanical sensitivity (A), determined by von Frey electronic method, heat sensitivity (B, C), determined by hot plate method (B) and Hargreaves Test (C), and motor function (D), determined by rotarod test, were evaluated one hour after the treatment with PDX (10 ng, i.p.) or vehicle (sterile saline, i.p.) over 7 hours. Results are expressed as mean $\pm$ SEM; n=6 mice per group per experiment (*P < 0.05 vs saline group [two-way ANOVA followed by Sidak's post hoc test]).

3.4 PDX reduces KO₂-induced leukocyte recruitment to the paw.

The hind paw skin was collected 7 hours after stimulus to evaluate the effect of PDX treatment on leukocyte recruitment (Figure 5). Initially, the plantar tissue of swiss mice was used for a histopathological analysis focusing on the dermal region on the hind paw skin was performed using H&E staining (Figure 5A-H). In the representative images of the clinical score (Figure 5B-5E), the green arrow indicates the leukocyte infiltrate and the red arrow the

1 angiogenesis process, better visualized in the magnified photomicrograph (Figure 5D). In
2 addition, image analysis and processing using Image J software showed that the treatment
3 with PDX (10 ng, i.p.) decreased the leukocyte infiltrate in the demarcated area of the dermis
4 (Figure 5G-I), which was confirmed by statistical analysis (Figure 5F).

5 Although efficient for evaluating parameters such as the clinical score, one of the
6 limitations of using histology with H&E staining is the inability to differentiate the types of
7 leukocytes present in the tissue, since in addition to neutrophils and macrophages, other cells
8 such as lymphocytes can also be present. In this way, we used the LysM-eGFP mice, which
9 have the enhanced green fluorescent protein (eGFP) inserted into the promoter region of
10 Lysozyme M (LysM) (expressed mainly in the granules of neutrophils, but which can also be
11 expressed in macrophages), which would allow a more specific analysis of the effect of PDX
12 on the recruitment of these leukocyte characteristic of acute inflammation to the plantar tissue
13 (Figure 5J-L). Thus, this methodology was used to demonstrate the potential of PDX on the
14 preferential migration of neutrophils to the inflammatory site in our model. The treatment
15 with PDX (10 ng, i.p.) reduced the infiltrate of neutrophils into the dermis of plantar tissue
16 stimulated with KO₂ (Figure 5K-M). In this way, these results showed that the treatment with
17 10 ng of PDX reduced the KO₂-induced total leukocyte infiltrate in plantar tissue,
18 demonstrating the efficient anti-inflammatory potential of this SPM.

19

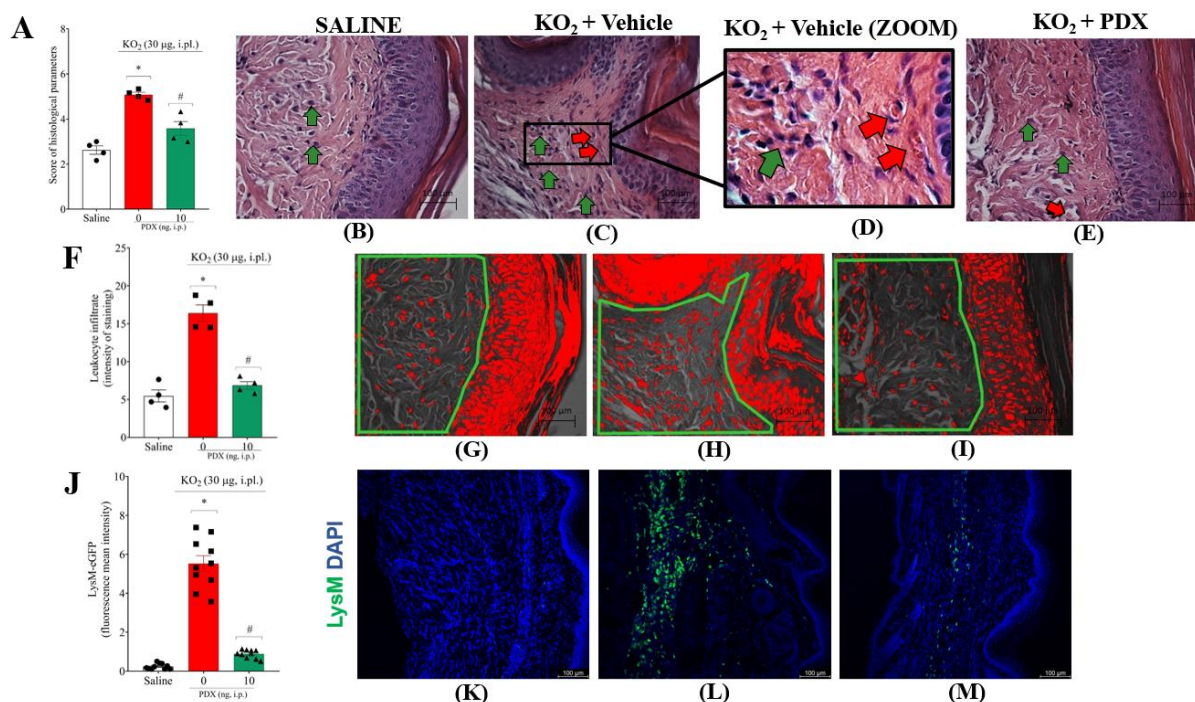


Figure 5 – PDX reduces KO₂-induced leukocyte recruitment to the paw. Seven hours after intraplantar injection of KO₂ (30 µg/20 µL/paw), the skin of the hind paw of swiss mice (A-I) was dissected for histopathological analysis by H&E staining using a light microscope (original magnification 40x). In (D) a magnified photomicrograph showing the leukocyte infiltrate (green arrow) and angiogenesis (red arrow). The analysis was performed using a clinical score (A) where neovascularization, tissue integrity and inflammatory infiltrate (B-D) were evaluated and the percentage of inflammatory infiltrate per area (highlighted area in green (F-I)) using the Image J software of each group with 4 animals. In addition, the plantar tissue of LysM-eGFP mice (J-M) was dissected seven hours after stimulus for the determination of fluorescence intensity using a confocal microscope. Percentage of fluorescence is represented in (I) and representative images are shown in (J-L) (N=8 animals per group). *P < 0.05 vs saline group; #P < 0.05 vs vehicle group, non-parametric Kruskal-Wallis test was used, followed by Dunn's test (A); One-way ANOVA followed by Tukey's post-test (B, I); mean ± SEM.

3. 5 PDX decreases KO₂-induced TNF-α and IL-1β production.

The hind paw skin was dissected 2 hours after the stimulus and cultivated in a culture medium for a further 2 hours (a total of 4 hours after KO₂ injection) to evaluate the effect of PDX treatment on the production of the proinflammatory cytokines TNF-α and IL-1β (Figure 6). Treatment with PDX (10 ng, i.p.) efficiently decreased the KO₂-triggered production of TNF-α (Figure 6A) and IL-1β (Figure 6B), demonstrating an important anti-inflammatory effect of this SPM.

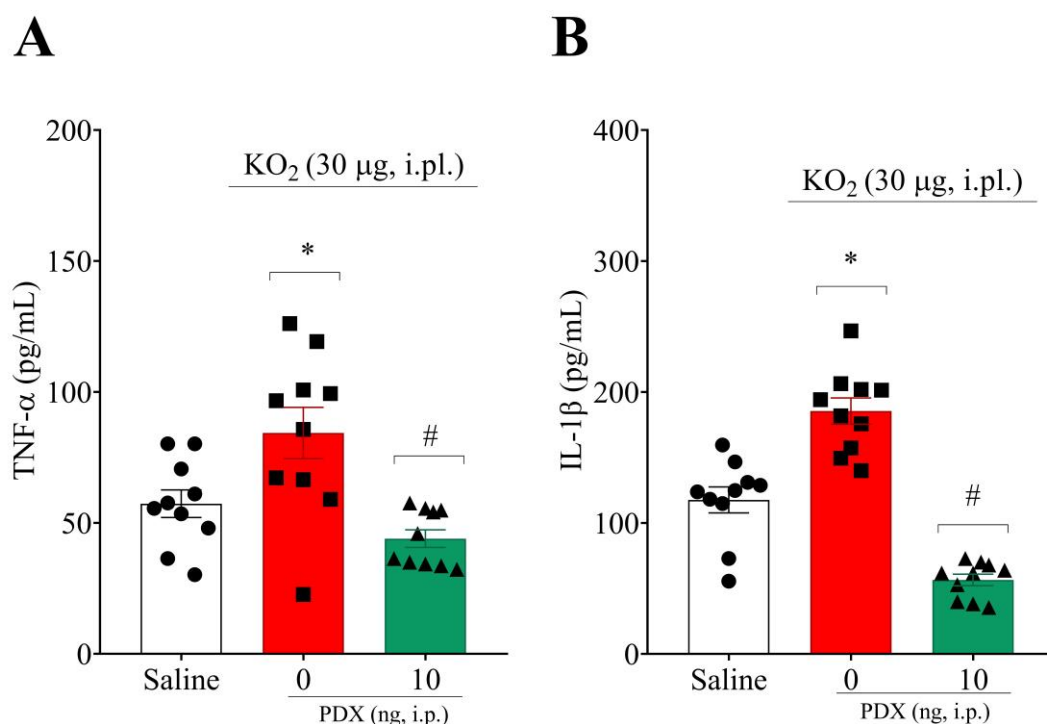


Figure 6 – PDX decreases KO₂-induced TNF-α and IL-1β production. The levels of proinflammatory cytokines TNF-α (A) and IL-1β (B) were assayed by ELISA. Hind paw skin was dissected 2 hours after intraplantar injection of KO₂ (30 μg/20 μL/paw), processed using a surgical scalpel blade and cultivated in culture medium for 2 hours (a total of 4 hours after KO₂ injection). Results are expressed as mean ± SEM; n=10 mice per group per experiment (*P < 0.05 vs saline group; #P < 0.05 vs vehicle group [one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test]).

3.6 PDX increases the levels of antioxidant enzymes, normalizes total antioxidant capacity and reduces superoxide anion production induced by KO₂.

Given that this is a model of pain with a direct connection with ROS [17], we assessed the capacity of PDX to inhibit KO₂-induced oxidative stress (Figure 7). Treatment with PDX (10 ng, i.p.) increased levels of antioxidant enzymes important in neutralizing ROS, GSH (Figure 7A) and catalase (Figure 7B). Furthermore, the treatment with PDX (10 ng, i.p.) restored the total antioxidant capacity as observed by the normalization of the capacity to reduce ferric ion (FRAP assay, Figure 7C) and scavenger ability (ABTS assay, Figure 7D). In addition, PDX also reduced superoxide anion production (NBT assay, Figure 7E), demonstrating efficient antioxidant potential.

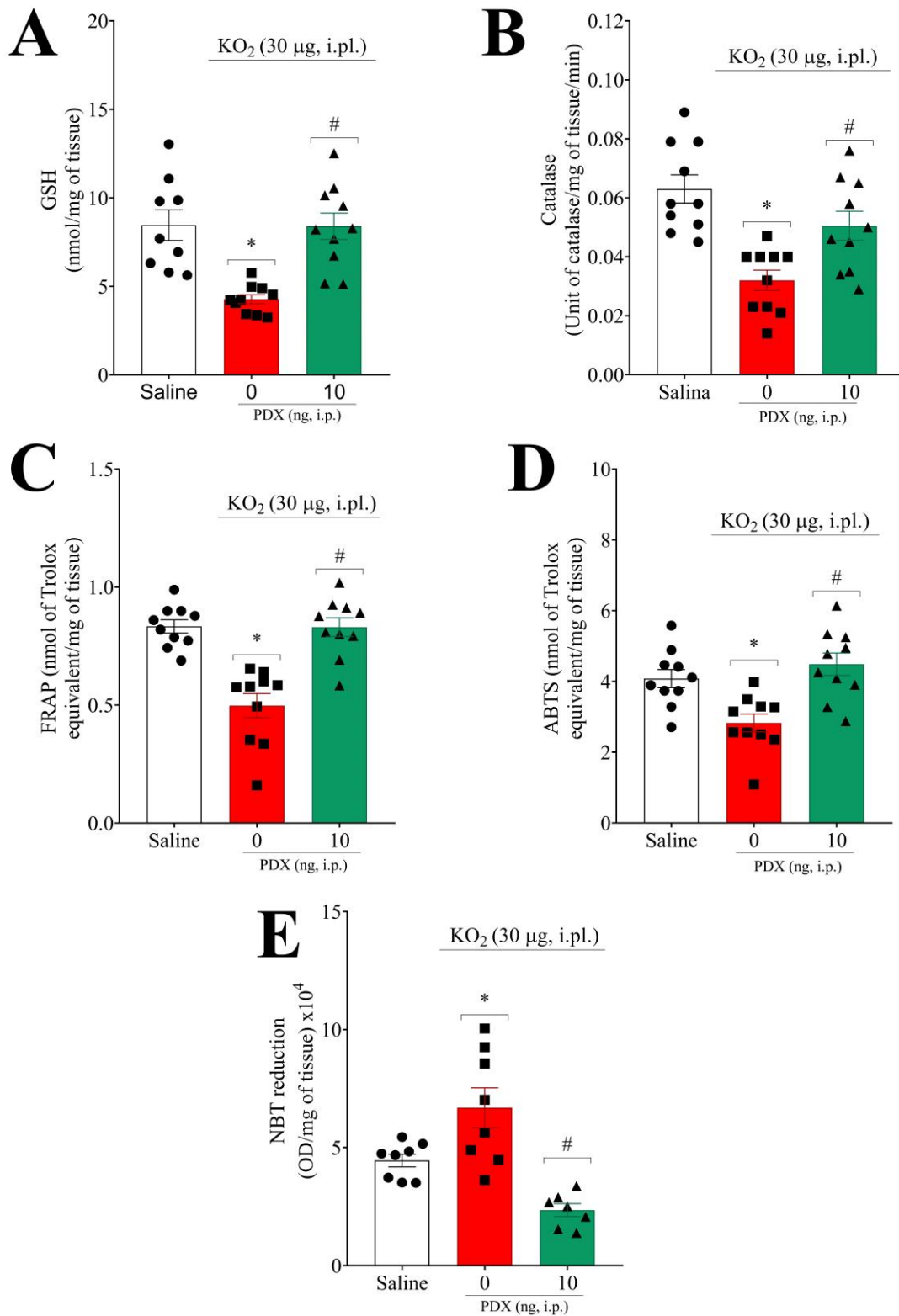


Figure 7 - PDX increases the levels of antioxidant enzymes, normalizes total antioxidant capacity and reduces superoxide anion production induced by KO_2 . Hind paw was dissected 1 hour or 3 hours after KO_2 intraplantar injection (30 μ g/20 μ L/paw) for determination of GSH (A) and Catalase (B) levels, total antioxidant capacity (C, FRAP assay, E, ABTS assay) and superoxide anion production (E) using colorimetric assays. Results are expressed as mean $\pm$ SEM; n=10 mice per group per experiment, except for the NBT assay (n= 10 mice per group per experiment). (*P < 0.05 vs saline group; #P < 0.05 vs vehicle group [one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test]).

3.7 PDX inhibits TRPV1 activation in DRG neurons and reduces NF- κ B activation in TRPV1-positive neurons induced by KO₂.

Based on the results obtained regarding the mechanism of PDX, our next step was to evaluate the effect of this SPM on neuronal activation. Thus, we investigated whether TRPV1⁺ neurons co-express pNF- κ B in KO₂-induced DRG as a surrogate marker of neuronal activation. Immunofluorescence shows that the intraplantar injection of KO₂ (30 μ g/20 μ L/paw) increased the percentage of TRPV1⁺ positive neurons co-stained with p-NF κ B and that treatment with PDX (10 ng, i.p.) can reduce it (Figure 8). To exclude the possibility of nonspecific labeling, slides labeled only with the secondary antibodies for TRPV1 and pNF- κ B were used as a control. Thus, PDX inhibits TRPV1 activation in DRG (Figure 8A, 8G) and reduces pNF- κ B activation (Figure 8B, 8E), which reflects the inhibition of neuronal activation. To confirm the nuclear location of pNF- κ B, we analyzed its co-stained with the nuclear marker DAPI (Figure 8C). Figure 8F-8T shows representative images of the experimental groups. The nuclear localization of p-NF- κ B in TRPV1⁺ cells can be better observed in magnified images (Figure 8J, 8O, 8T). These data further demonstrate that TRPV1⁺ neurons are activated in KO₂ inflammation and that PDX treatment reduces their activation, conferring an analgesic mechanism of this drug at the neuronal level.

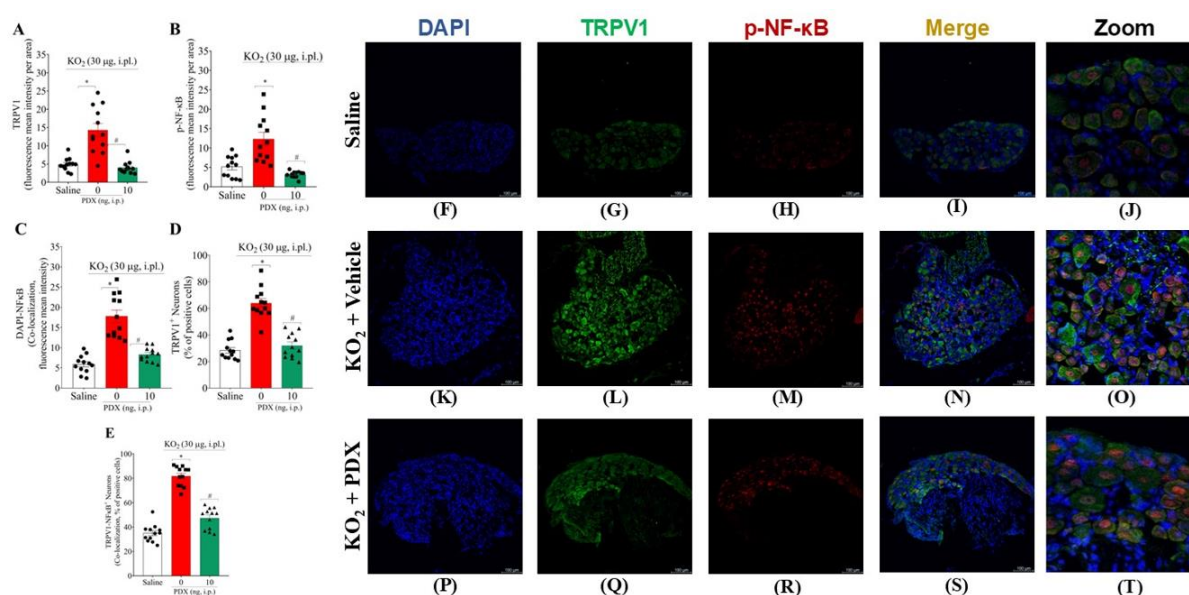


Figure 8 – PDX inhibits TRPV1 activation in DRG neurons and reduces NF- κ B activation in TRPV1-positive neurons induced by KO₂. Five hours after KO₂ intraplantar injection (30 μ g/20 μ L/paw), DRG samples (L4-L6) were dissected for immunofluorescent TRPV1 and p65 p-NF- κ B staining. The graphs (A) and (B) shows to the quantification of TRPV1 and p-NF κ B by fluorescence intensity per area. (C) shows the DAPI co-stained with p-NF κ B in nucleus by fluorescence intensity. (D) shows the percent of TRPV1 positive cells. (E) shows the percent of TRPV1 positive cells co-stained with p-NF κ B and (E) shows the DAPI co-stained with p-NF κ B in nucleus by fluorescence intensity. (F-T) shows the representative images of the number of positive cells per area

TRPV1 (green) and the number of of positive cells per area p-NFκB (red) with nuclear staining DAPI (blue) in DRGs (20x magnification with 0.75x zoom). (J, O and T) shows the magnification of the images demonstrates the nuclear localization of p-NF-kB in TRPV1 positive neurons. The Results are expressed as mean ± SEM; n=12 mice per group per experiment) (*P < 0.05 vs saline group; #P <0.05 vs vehicle group [one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test]).

3.8 Acute treatment with PDX does not induce liver, kidney, or stomach damage.

Mice were treated with PDX (10 ng) one hour before receiving the KO₂ intraplantar injection. Seven hours after the stimulus, plasma and stomach samples were collected to evaluate whether the acute treatment with PDX would induce gastric, hepatic or renal damage, which are common side effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). Toxicity was assessed through the plasmatic concentrations of AST, ALT, urea, and creatinine, and stomach MPO activity as previously described [45, 46]. Mice were treated once with acetaminophen (650 mg/kg, orally) as a positive control for liver damage and had their plasma collected 24 hours after treatment. Mice were treated once with diclofenac (200 mg/kg, orally) as a positive control for kidney damage, and plasma was collected 24 hours after treatment. Finally, for positive control of stomach damage, the mice were treated daily with indomethacin over seven days (2.5 mg/kg, i.p.), with plasma collected on the 7th day after treatment.

The treatment with 10 ng/animal of PDX did not modify the MPO activity in the stomach (Figure 9A), the plasmatic concentration of ALT (Figure 9B), AST (Figure 9C), urea (Figure 9D), or creatinine (Figure 9E) compared with positive controls. Therefore, our data suggest that acute treatment does not induce detectable gastric, hepatic, or renal lesion/damage.

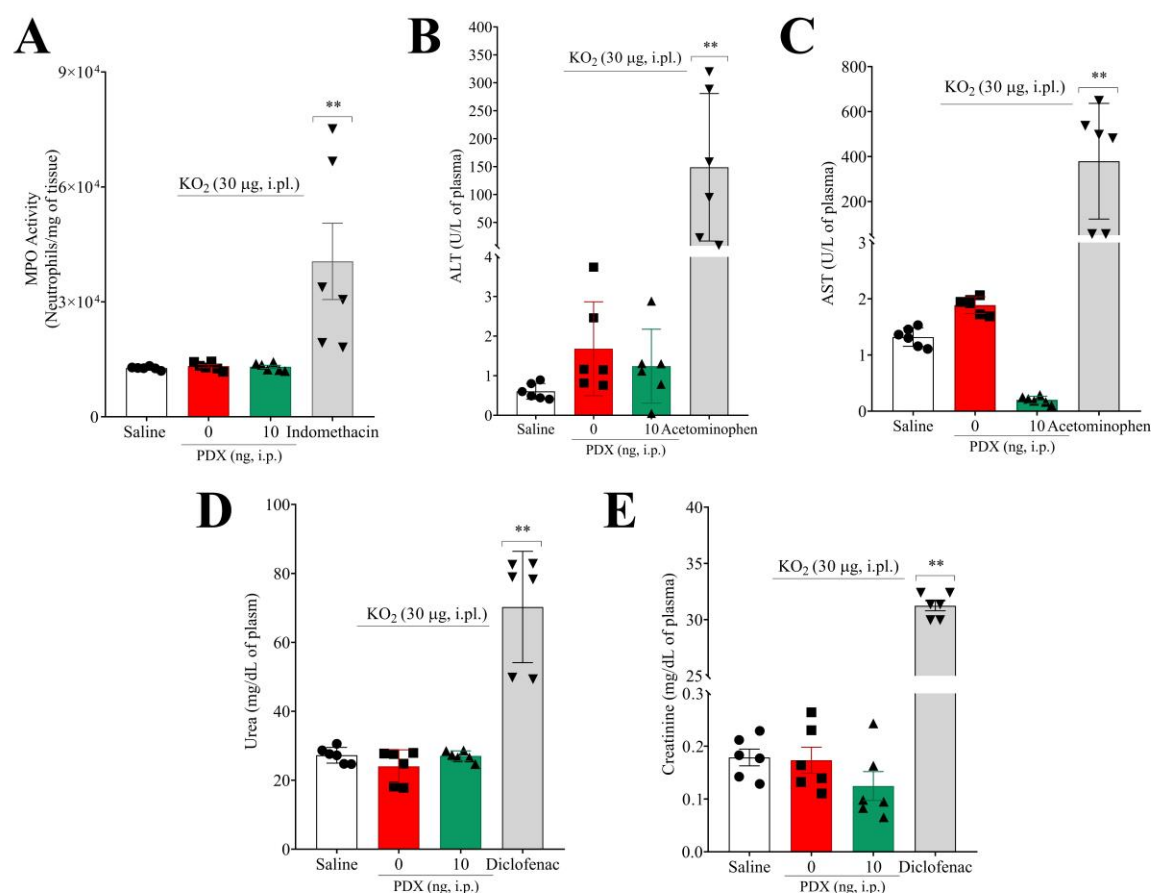


Figure 9 – Acute treatment with PDX does not induce liver, kidney, or stomach damage. Mice were treated with PDX (10 ng) one hour before receiving the KO₂ intraplantar injection. There were also treatments with drugs that induce specific organ damage, which included acetaminophen (650 mg/kg, administered orally) for liver injury, diclofenac (200 mg/kg, administered orally) for kidney injury, and indomethacin (2.5 mg/kg, administered i.p.) for stomach injury. MPO activity was quantitated in samples of stomach (A), and the levels of ALT (B), AST (C), urea (D), and creatinine (D) were quantitated in the serum. Results are expressed as mean ± SEM; n=6 mice per group per experiment (**P < 0.05 vs saline group, vehicle group and treatment group [one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test]).

4. Discussion

In the present work, we showed that PDX reduces pain and inflammation initiated by superoxide anion in mice. The administration of PDX efficiently reduces the pain parameters evaluated, which include mechanical and thermal hyperalgesia, mechanical allodynia, unbalanced body weight distribution in the hind paws, and overt pain-like behaviors. Additional behavioral experiments related to the basal mechanical and thermal sensitivity and motor activity of the animals confirmed that treatment with PDX confers an analgesic effect, and not an anesthetic or muscle relaxation action, since it does not alter the normal withdrawal response or locomotor activity of the mice. PDX inhibited leukocyte recruitment and the histopathological changes associated with the inflammatory process, a result explained by the reduction in the levels of pro-inflammatory cytokines (TNF- α and IL-1 β) and reactive oxygen species, as well as increasing tissue antioxidant capacity. Corroborating these data, we demonstrated for the first time the modulatory effect of PDX at the neuronal level. PDX inhibited the activation of the pain-related ion channel TRPV1 in DRG neurons. As a result, PDX reduces the activation of TRPV1⁺ DRG neurons, as evidenced by reduced nuclear immunostaining of pNF- κ B. In addition, we demonstrated that acute pharmacological treatment with PDX is safe since it does not increase stomach MPO activity or in ALT, AST, urea, and creatinine levels, recognized biomarkers of gastric, hepatic, and renal injury specifically.

Intraplantar injection of KO₂ induces inflammation and pain from superoxide anion [17-19]. Pain is one of the cardinal signs of inflammation and, when left untreated, can lead to reduced quality of life for patients [47]. The usual therapies include the use of anti-inflammatory and analgesic drugs, such as NSAIDs and opioids. However, several studies have highlighted the problem of long-term use of these pharmacological classes, which include multiple adverse effects, addiction, high cost, and toxicity, resulting in limited efficacy [27]. Therefore, the development of new effective therapeutic strategies for pain management is essential for acute inflammatory pain, as is the case with pain triggered by KO₂ injection.

Therefore, considering the usual adverse effects of treatment with NSAIDs, we evaluated in our study whether acute treatment with PDX (10 ng, i.p.) could increase the levels of biomarkers of gastric (stomach MPO activity), hepatic (plasma levels of ALT and AST) and renal (plasma levels of urea and creatinine) injury. As a result, we demonstrated that in our acute model, PDX administration, compared to positive controls for each type of

damage, did not alter plasma levels of ALT, AST, creatinine, and urea, as well as stomach MPO activity, showing that this SPM does not induce the common side effects of NSAIDs. Similarly, in a sepsis model induced by cecal ligation-puncture (CLP), septic mice treated once with PDX (300 ng, i.p.) showed a reduction in plasma levels of ALT, AST, urea, and creatinine compared to septic mice that received the vehicle, demonstrating the hepatic and renal protective effect provided by this SPM [48]. Acute treatment with other SPMs, such as PD1 used in a non-alcoholic steatohepatitis (NASH) model [49], RvD5 in an LPS-induced sepsis model [50], and MaR1 in a CLP-induced sepsis model [51], also reduce plasma levels of ALT, AST, urea, and creatinine, indicating a safe and protective profile for this pharmacological class. Considering long-term pharmacological safety, Saraiva-Santos et al. (2023) [52] showed that treatment with LXA₄ (10 ng, i.p.) every 2 days for 30 days in a TiO₂-induced arthritis model did not alter MPO activity and serum levels of ALT, AST, urea and creatinine, demonstrating that chronic treatment with LXA₄ does not induce gastric, hepatic or renal damage, indicating safety in pharmacological treatment with this SPM [52]. In another study, daily treatment over 14 days with RvD1 (100 ng or 300 ng, i.p.) in a NASH model reduced plasma levels of ALT and AST, demonstrating a protective effect on liver tissue [53]. Thus, together these findings indicate the safe use of these SPMs compared to NSAIDs, indicating them as a promising new therapeutic approach for the treatment of pain and inflammation.

Superoxide anion increases endothelial activation and vascular permeability, contributing to leukocyte recruitment [14, 54, 55]. In turn, the neutrophils and macrophages that migrate to the inflammatory focus, stimulated by the presence of mediators such as histamine, IL-1 β , and TNF- α , start to produce high levels of O₂^{•-} via NOX2, as well as secreting pro-inflammatory cytokines (IL-6, IL-1 β , and TNF- α) into the microenvironment, amplifying the inflammatory process and contributing to the maintenance of inflammatory hyperalgesia [8, 13, 20]. In this study, treatment with PDX inhibited the KO₂-induced recruitment of neutrophils and macrophages to the plantar tissue, as well as decreasing levels of pro-inflammatory cytokines (TNF- α and IL-1 β). Thus, these results demonstrate the anti-inflammatory effects of PDX in a superoxide anion-induced *in vivo* model.

Previous studies using different models have demonstrated similar anti-inflammatory properties of PDX. In models of lung injury induced by LPS [29, 30] or hyperoxia [55], PDX administration reduces endothelial activation and pulmonary edema formation, resulting from lower vascular permeability [55] and inhibition of neutrophils and macrophages recruitment [29, 30]. The mechanisms involved in these anti-inflammatory effects include an increase in

anti-inflammatory cytokines, such as IL-10 [30], and glyocalyx components, such as heparan sulfate (HS) [55], and a reduction in the levels of pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β and IL-6) and chemokines (MCP-1, MIP-2 and MIP-1 α) [29, 30, 55]. In a model of obesity, evaluated *in vivo* and *in vitro*, PDX inhibited the NF- κ B pathway [56]. In this study, this SPM inhibits the phosphorylation of the p65 subunit and the degradation of the inhibitory factor I κ B, preventing the translocation of this factor to the nucleus, and consequently leading to a reduction in the expression of pro-inflammatory molecules such as TNF- α and MCP-1 [56]. Thus, supported by this data, we can assume that the anti-inflammatory mechanisms presented by PDX include inhibition of the NF- κ B pathway, which reduces the levels of pro-inflammatory mediators and consequently leads to inhibition of leukocyte recruitment.

The attenuation of inflammation and pain can be mediated by antioxidant molecules such as quercetin [14], curcumin [36], vinpocetine [57], tempol [18, 58], or apocynin [18], emphasizing the importance of ROS in the mechanisms of development and maintenance of inflammatory pain. In this study, we demonstrated that PDX reduces superoxide anion levels, restores total antioxidant defense (as evidenced by the normalization of iron reduction levels and elimination of the ABTS radical in plantar tissue), and increases levels of endogenous antioxidant enzymes such as catalase and GSH. Other studies using PDX, especially *in vitro*, corroborate our results. Liu and colleagues (2014) [59] evaluated *in vitro* the inhibitory capacity of PDX on the production of ROS by neutrophils induced by PMA and fMLF. As a result, this study demonstrated that PDX inhibits the activation of NADPH oxidase, resulting in lower O₂^{•-} generation, as well as reducing MPO release and inhibiting COX-1 and COX-2 activity, limiting the oxidative and pro-inflammatory capacity of these cells [59]. In another *in vitro* model of endothelial oxidative stress induced by H₂O₂, the administration of PDX promotes an increase in the expression of SOD2 (MnSOD) and catalase, attenuating oxidative stress [60]. In addition, PIAO and colleagues (2020) [61] also demonstrated ability of PDX to inhibit RNS generation. In this study, pre-incubation of PDX with primary rat chondrocytes *in vitro* reduced the expression of the enzyme inducible nitric oxide synthase (iNOS) and NO, and reduced the expression of PGE₂ [61]. Finally, one of the only *in vivo* studies shows that PDX increases levels of catalase, SOD, and GSH, leading to a reduction in lipid peroxides (LPO) and NO in plasma in a model of type 1 (DM1) and type 2 (DM2) diabetes mellitus [62]. Thus, our work highlights an important *in vivo* mechanism of PDX modulation in the oxidative stress triggered by superoxide anion.

Few studies have investigated the analgesic capacity of PDX. Fonseca et al. (2017) [63] used PDX in a model of inflammatory pain induced by carrageenan, but their results showed

that intraplantar treatment with PDX is not effective in reducing mechanical hyperalgesia. On the other hand, in a model of lumbar radicular pain from disc herniation, intrathecal administration of PDX reduces the expression of IL-6 and IL-1 β and increases the expression of TGF- β , which promotes a reduction in mechanical and thermal hyperalgesia parameters [43]. Our results corroborate and contribute to the findings of Zhao and colleagues (2021) [43] since PDX (10 ng) reduced mechanical hyperalgesia, thermal hyperalgesia, mechanical allodynia, overt pain-like behavior, and the imbalance in the distribution of body weight on the hind paws. Furthermore, our results show that treatment with PDX (10 ng, i.p.), in the absence of KO₂ injection, does not alter the basal mechanical and thermal sensitivity and motor activity of the animals. This is an interesting observation, since it shows that the inhibitory effect on pain behaviors provided by PDX administration is an analgesic action, excluding possible anesthetic or muscle relaxation properties that could be provided by the SPM, considering that the animals were able to respond adequately to the stimuli to which they were exposed. Corroborating our results, Park et al. (2011) [64] showed that intrathecal treatment with RvD2 (10 ng) also did not affect the basal thermal threshold and motor activity of mice, demonstrating an analgesic effect of this SPM. Thus, these data suggest that SPMs reduce nociceptive behaviors through analgesic mechanisms.

ROS and RNS contribute to peripheral and central activation and sensitization. ROS production causes an increase in the excitability of peripheral nociceptive neurons and the dorsal horn of the spinal cord [58, 65]. KO₂ can generate Ca²⁺ influx into the nociceptive neuron through superoxide anion, facilitating neuronal firing [67]. ROS and RNS can activate nociceptors directly and indirectly. The high levels of ROS generated during the inflammatory response can act directly on intracellular residues of ion channels for neuronal activation, such as TRPV1, generating alterations that facilitate the opening of these channels [24]. In particular, nociceptive neurons in the periphery significantly express TRPV1, a channel that is particularly sensitive to the redox state and very important for the genesis of pain and inflammation. At a molecular level, ROS can interact with cysteine residues distributed along the structure of TRPV1 or, in the case of RNS, promote the nitration or nitrosylation of these residues [16, 26, 67]. The redox alterations facilitate the activation of nociceptive neurons via the influx of Ca²⁺ through TRPV1, contributing to inflammatory pain [67]. ROS can also facilitate the nociception process indirectly by stimulating the secretion of pro-inflammatory mediators (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, PGE2) [6]. In turn, these mediators can act on their cognate receptors expressed on the neuronal membrane, leading to the activation of signaling pathways such as NF- κ B, MAPK and PLC, which result in the activation of protein kinases

1 such as PKA and PKC, capable of phosphorylating channels such as TRPV1, facilitating
2 neuronal activation [22, 23, 68]. In this way, molecules that target the metabolism and activity
3 of ROS become interesting anti-inflammatory and analgesic approaches.

4 To date, some SPMs have demonstrated the capacity to inhibit neuronal activation.
5 Fattori and colleagues (2022) [69] demonstrated that Maresin-2 (MaR2) promotes analgesia in
6 an inflammatory pain model. In this work, MaR2 reduced the levels of pro-inflammatory
7 cytokines, the release of CGRP, and the activation of TRPV1 and TRPA1 expressed in DRG
8 neurons, resulting in the attenuation of evoked and non-evoked pain behaviors [69]. Similarly,
9 the other member of the maresin family, Maresin-1 (MaR1) inhibited inflammatory pain by
10 reducing leukocyte recruitment, NF- κ B activation, IL-1 β and TNF- α production, CGRP
11 release, and Nav1.8 and TRPV1 mRNA expression in DRG neurons [70].

12 Curiously, to date there has only been evidence of modulation of TRPV1
13 channel activity by the protectin family. Park and colleagues (2011) [71] demonstrated in a
14 TNF- α -induced inflammatory pain model that PD1 inhibits TRPV1 channel activity in DRG
15 neurons, reducing the frequency of spontaneous excitatory postsynaptic currents (sEPSC), and
16 thus neuronal activation, conferring an analgesic effect. In this way, our study demonstrates a
17 new analgesic mechanism of PDX in a model of inflammatory pain. In our work,
18 intraperitoneal administration of PDX reduced the activation of TRPV1⁺ neurons KO₂-
19 induced, proving that this SPM can modulate neuronal activity by inhibiting this important
20 ion channel related to the pathophysiology of pain. Other mechanisms behind this TRPV1
21 inhibition can include the reduction of pro-inflammatory cytokines (TNF- α and IL-1 β) and
22 ROS levels since these molecules can modulate TRPV1 expression and activity. Thus, the
23 capacity of PDX to reduce the production and action of these pro-inflammatory mediators,
24 combined with inhibition of TRPV1, results in a reduction in hyperalgesia, allodynia, and
25 overt pain-like behaviors.

26 Therefore, this study demonstrates the analgesic, anti-inflammatory, and
27 antioxidant effects of PDX in a model of inflammatory pain induced by ROS, indicating this
28 SPM as a potential new strategy for conditions caused by oxidative stress.

1 5. Conclusion

2 Therefore, our research group has demonstrated for the first time, in an
3 acute inflammatory model *in vivo*, that PDX inhibits the production of pro-inflammatory
4 cytokines and ROS, increases levels of antioxidant agents, reduces leukocyte recruitment,
5 TRPV1 channel activation and neuronal activation, providing a reduction in evoked and non-
6 evoked pain parameters triggered by the administration of a superoxide anion donor. In this
7 way, we expanded the anti-inflammatory, antioxidant, and analgesic mechanisms of PDX in
8 an animal model. Thus, PDX could be a potential therapeutic approach for the treatment of
9 diseases caused by the nocifensive effects of ROS, such as inflammatory and
10 neurodegenerative diseases, for example.

6. Conflict of interest

Authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

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

References

- [1] Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*. 2008; 454: 428-35.
- [2] Mariathasan S, Weiss DS, Newton K, McBride J, O'Rourke K, Roose-Girma M, et al. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature*. 2006; 440: 228-32.
- [3] Zarpelon AC, Rodrigues FC, Lopes AH, Souza GR, Carvalho TT, Pinto LG, et al. Spinal cord oligodendrocyte-derived alarmin IL-33 mediates neuropathic pain. *FASEB J*. 2016; 30:54-65.
- [4] Takeuchi, O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*. 2010; 140:805-820.
- [5] Medzhitov R. Toll-like Receptors and Innate Immunity. *Nat. Rev. Immunol*. 2001; 1: 135-45.
- [6] Ghosh S, Hayden MS. New regulators of NF- κ B in inflammation. *Nat. Rev. Immunol*. 2008; 8: 837-48.
- [7] Jomova K, Raptova R, Alomar SY, Alwasel SH, Nepovimova E, Kuca K, et al. Reactive oxygen species, toxicity, oxidative stress and antioxidants: chronic diseases and aging. *Arch Toxicol*. 2023; 97(10): 2499-2574.
- [8] Mittal M, Siddiqui MR, Tran K, Reddy SP, Malik AB. *Antioxid Redox Signal*. 2014; 20(7): 1126-1167.
- [9] Belambri SA, Rolas L, Raad H, Hurtado-Nedelec M, Dang PMC, El-Benna J. NADPH oxidase activation in neutrophils: Role of the phosphorylation of its subunits. *Eur J Clin Invest*. 2018; 48:e12951.
- [10] Buetler TM, Krauskopf A, Ruegg UT. Role of superoxide as a signaling molecule. *News Physiol Sci*. 2004; 19:120-123.
- [11] Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZnSOD (SOD1), MnSOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution and expression. *Free Radical Biology & Medicine*. 2002; 33:337-349.
- [12] Weydert CJ, Cullen JJ. Measurement of superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nature protocols*. 2010; 5(1):51.
- [13] Henderson LM, Chappel JB. NADPH oxidase of neutrophils. *Biochim Biophys Acta*. 1996; 1273(2):87-107.
- [14] Maitra U, Singh N, Gan L, Ringwood L, Li L. IRAK-1 contributes to lipopolysaccharide-induced reactive oxygen species generation in macrophages by inducing NOX-1 transcription and Rac1 activation and suppressing the expressing of antioxidative enzymes. *J Biol Chem*.

2009; 403(3):451-461.

[15] Pacquelet, S, Johnson JL, Ellis BA, Brzezinska AA, Lane WS, Munafo DB, et al. Cross-talk between IRAK-4 and the NADPH oxidase. *Biochem J.* 2007; 400(3):451-461.

[16] Lei Y, Wang K, Deng L, Chen Y, Nice EC, Huang C. Redox regulation of inflammation: old elements, a new story. *Medicinal research reviews.* 2015. 1273(2):87-107.

[17] Maioli NAA, Zarpelon ACC, Mizokami SSS, Calixto-Campos C, Guazelli CFSF, Hohmann MSNS, et al. 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.* 2015;48:321–31.

[18] Yamacita-Borin FY, Zarpelon AC, Pinho-Ribeiro FA, Fattori V, Alves-Filho JC, Cunha FQ, et al. Superoxide anion-induced pain and inflammation depends on TNF α /TNFR1 signaling in mice. *Neurosci Lett.* 2015; 605:53-58.

[19] Serafim KGG, Navarro SA, Zarpelon AC, Pinho-Ribeiro FA, Fattori V, Cunha TM. Bosentan, a mixed endothelin receptor antagonist, inhibits superoxide anion-induced pain and inflammation in mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2015, 388(11):1211-1221.

[20] Cunha TM, Verri WA, Silva JS, Poole S, Cunha FQ, Ferreira SH. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102:1755-1760.

[21] Verri WA, Cunha TM, Parada CA, Poole S, Cunha FQ, Ferreira SH. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development? *Pharmacol Ther.* 2006; 112: 116-138.

[22] Braz J, Solorzano C, Wang X, Basbaum AI. Transmitting pain and itch messages: a contemporary view of spinal cord circuits that generate gate control. *Neuron.* 2014; 82(3): 522-536.

[23] Scholz J, Woolf CJ. Can we conquer pain? *Nat Neurobiol.* 1999; 57(1):1062-1067.

[24] Carrasco C, Naziroglu M, Rodríguez A, Pariente JÁ. Neurophaticc Pain: Delving into the oxidative origin and the possible implication of transient receptor potential channels. *Front Physiol.* 2018; 9:95.

[25] Maximiano TK, Carneiro JA, Fattori V, Verri WA. TRPV1: Receptor structure, activation, modulation and role in neuro-immune interactions and pain. *Cell Calcium.* 2024; 119: 102870.

[26] Piciu F, Balas M, Badea MA, Cucu D. TRP Channels in tumoral process mediated by oxidative stress and inflammation. *Antioxidants (Basel).* 2023; 12(7): 1327.

- [27] Fattori V, Zaninelli TH, Rasquel-Oliveira FS, Casagrande R, Verri WA. Specialized pro-resolving lipid mediators: A new class of immunosuppressive and non-opioid analgesic drugs.
- [28] Serhan CN, Chiang N, Dalli J. The resolution code of acute inflammation: Novel pro-resolving lipid mediators in resolution. *Seminars in Immunology*. 2015; 27(3): 200-215.
- [29] Ye Y, Zhang HW, Mei HX, Xu HR, Xiang SY, Yang Q, et al. PDX regulates inflammatory cell infiltration via resident macrophage in LPS-induced lung injury. *J Cell Mol Med*. 2020; 24(18):10604-10614.
- [30] Tan W, Chen L, Wang YX, Hu LS, Xiong W, Shang Y, et al. Protectin DX exhibits protective effects in mouse model of lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *Chin Med J (Engl)*. 2018; 131(10):1167-1173.
- [31] Xia H, Chen L, Liu H, Sun Z, Yang W, Yang Y, et al. Protectin DX increases survival in mouse model of sepsis by ameliorating inflammation and modulating macrophage phenotype. *Sci Rep*. 2017; 7(1):99.
- [32] Jin S, Sun S, Ling H, Ma J, Zhang X, Xie Z, et al. Protectin restores Treg/Th17 cell balance in rheumatoid arthritis by inhibiting NLPR3 inflammasome via miR-20a. *Cell Death & Disease*. 2021; 12:280.
- [33] Segato-Vendrameto C, Zanluca C, Zuculoto AZ, Zaninelli, TH, Bertozzi MM, Saraiva-Santos T. et al. Chikungunya virus and its envelope Protein E2 induce hyperalgesia in mice: Inhibition by Anti-E2 Monoclonal Antibodies and by Targeting TRPV1. *Cells*. 2023; 12(4): 556.
- [34] Laboureyras E, Chateuraynaud, J, Richebe P, Simonnet G. Long-term pain vulnerability after surgery in rats: Prevention by nefopam, an analgesic with antihyperalgesic properties. *Anesth Analg*. 2009; 109:623-631.
- [35] Borghi, S. M., Bussulo, S. K. D, Pinho-Ribeiro, F. A., Fattori, V., Carvalho, T. T., Rasquel-Oliveira, F. S. et al. Intense Acute Swimming Induces Delayed-Onset Muscle Soreness Dependent on Spinal Cord Neuroinflammation. *Front Pharmacol*. 2021; 12: 734091.
- [36] Fattori, V., Pinho-Ribeiro, F.A, Borghi, S. M. et al. Curcumin inhibits superoxide anion-induced pain-like behavior and leukocyte recruitment by increasing Nrf2 expression and reducing NF- κ B activation. *Inflammation research*, 2015; 64 (12): 993-1003.
- [37] Khan, A. A., Alsahli M. A., Rahmani A. H. Myeloperoxidase as an Active Disease Biomarker: Rec. Biochemical and Pathological Perspectives. *Med Sci(Basel)*., 2018; 6(2): 33.
- [38] Tastekin E., Ayvaz S., Usta U., Aydogdu N., Cancilar E., Puyan F. O. et al. Indomethacin-induced gastric damage in rats and the protective effect of donkey milk. *Arch Med Sci*., 2018; 14(3): 671-678.

- [39] Tamber S. S., Bansal P., Sharma S., Singh R. B., Sharma R. et al. Biomarker of liver diseases. *Mol Biol Rep.*, 2023; 50(9): 7815-7823.
- [40] Brookes E. M., Power D. A. Elevated serum urea-to-creatinine ratio is associated with adverse inpatient clinical outcomes in non-end stage chronic kidney disease. *Sci Rep.*, 2022; 12(1): 20827.
- [41] Liao J., Lu Q., Li Z., Li J., Zhao Q., Li J. et al. Acetaminophen-induced liver injury: Molecular mechanism and treatments from natural products. *Front Pharmacol.*, 2023; 27(14): 1122632.
- [42] Stömer J., Gwinner W., Derlin K., Immenschuh S., Rong S., Jang M. Shushakova N. et al. A Single Oral Dose of Diclofenac Causes Transition of Experimental Subclinical Acute Kidney Injury to Chronic Kidney Disease. *Biomedicines*, 2022; 10(5): 1198.
- [43] Zhao QX, Wang YH, Wang SC, Xue S, Cao ZX, Sun T. Protectin DX attenuates lumbar radicular pain of non-compressive disc herniation by autophagy flux stimulation via adenosine monophosphate-activated protein kinase signaling. *Front Physiol.* 2021; 12:784653.
- [44] Bindu S., Mazumder S., Bandyopadhyay U. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: A current perspective. *Biochem Pharmacology*, 2020; 180: 114147.
- [45] Artero A. A., Manchope M. F., Carvalho T. T., Saraiva-Santos T., Bertozzi M. M., Carneiro J. A. et al. Hesperidin Methyl Chalcone Reduces the ARthritis Caused by TiO₂ in Mice: Targeting Inflammation, Oxidative Stress, Cytokine Production, and Nociceptor Sensory Neuron Activation. *Molecules*, 2023; 28(2): 872.
- [46] Fattori V., Borghi S. M., Guazelli C. F. S., Giroldo A. C., Crespigio J., Bussmann A. J. C. et al. Vipocentine reduces diclofenac-induced acute kidney injury through inhibition of oxidative stress, apoptosis, cytokine production, and NF-κB activation in mice. *Pharmacological research*, 2017; 120: 10-22.
- [47] Sinatra R. Causes and consequences of inadequate management of acute pain. *Pain Medicine*. 2010. 11(12):1859-1871.
- [48] Xia H., Chen L., Liu H., Sun Z., Yang W., Yang Y. Protectin DX increases survival in a mouse model of sepsis by ameliorating inflammation and modulating macrophage phenotype. *Scientific Reports*, 2017; 7(1):99.
- [49] Liu H., Li N., Kuang G. Gong X., Wang T., Hu J. Protectin D1 inhibits TLR4 signaling pathway to alleviate non-alcoholic steatohepatitis via upregulating IRAK-M. *Free Radical Biology and Medicine*, 2024; 210: 42-53.
- [50] Cardoso R. D. R., Chambo S. D., Zaninelli T. H., Bianchini B. H. S., Bertozzi M. M.,

- 1 Saraiva-Santos T. et al. Resolvin D5 (RvD5) Reduces Renal Damage Caused by LPS
- 2 Endotoxemia in Female Mice. *Molecules*, 2023; 28(1): 121.
- 3 [51] Li R., Wang Y., Ma Z., Wang D., Xie G., Yin Y. et al. Maresin 1 Mitigates Inflammatory
- 4 Response and Protects Mice from Sepsis. *Mediators Inflamm.*, 2016; 2016: 3798465.
- 5 [52] Saraiva-Santos T., Zaninelli T. H., Manchope M. F., Andrade K. C., Ferraz C. R.,
- 6 Bertozzi M. M. et al. Therapeutic activity of lipoxin A₄ in TiO₂-induced arthritis in mice: NF-
- 7 κ B and Nrf2 in synovial fluid leukocytes and neuronal TRPV1 mechanisms. *Front Immunol.*,
- 8 2023; 14: 949407.
- 9 [53] Li J., Deng X., Bai T., Wang S., Jiang Q., Xu K. et al. Resolvin D1 mitigates non-
- 10 alcoholic steatohepatitis by suppressing the TLR4-MyD88-mediated NF- κ B and MAPK
- 11 pathways and activating the Nrf2 pathway in mice. *International Immunopharmacology*,
- 12 2020; 88: 106961.
- 13 [54] Sharma M, Zhou Z, Miura H, Papapetropoulos A, McCarthy ET, Sharma R. et al. ADMA
- 14 injures the glomerular filtration barrier: role of nitric oxide and superoxide. *American journal*
- 15 *of physiology. Renal physiology*. 2009; 296(6):F1386-95.
- 16 [55] Liang Z, Yue H, Xu C, Wang Q, Jin S. Protectin DX Relieve Hyperoxia-induced lung
- 17 injury by protecting pulmonary endothelial glycocalyx. *J Inflamm. Res.* 2023; 16:421-431.
- 18 [56] Jung TW, Chung YH, Kim HC, El-Aty AMA, Jeong JH. Protectin DX attenuates LPS-
- 19 induced inflammation and insulin resistance in adipocytes via AMPK-mediated suppression
- 20 on the NF- κ B pathway. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2018; 315(4):E543-E551.
- 21 [57] Lourenco-Gonzalez Y, Fattori V, Domiciano TP, Rossaneis AC, Borghi SM, Zaninelli
- 22 TH, et al. Repurposing of the nootropic drug vinpocetine as an analgesic and anti-
- 23 inflammatory agent: Evidence in a Mouse Model of Superoxide Anion-Triggered
- 24 Inflammation. *Research Article*. 2019; 2019:6481812.
- 25 [58] Bernardy CA, Zarpelon AC, Pinho-Ribeiro F, Calixto-Campos C, Carvalho TT, Fattori
- 26 V, et al. Tempol, a superoxide dismutase mimetic agente, inhibits superoxide anion-induced
- 27 inflammatory pain in mmice. *Research article*. 2017; 2017:9584819.
- 28 [59] Liu M, Bousseta T, Makni-Maalej K, Fay M, Driss F, El-Benna J, et al. Protectin DX, a
- 29 double lipoxygenase product of DHA, inhibits both ROS production in human neutrophils
- 30 and cyclooxygenase activities. *Lipids*. 2014; 49(1): 49-57.
- 31 [60] Hwang HJ, Jung TW, Kim JW, Kim JA, Lee YB, Hong SH, et al. Protectin DX prevents
- 32 H₂O₂-mediated oxidative stress in vascular endothelial cells via an AMPK-dependent
- 33 mechanism. *Cell Signal*. 2019. 53:14-21.
- 34 [61] Piao S, Du W, Wei Y, Yang Y, Feng X, Bai L. Protectin DX attenuates IL-1 β -induced

- inflammation via the AMPK/NF- κ B pathway in chondrocytes and ameliorates osteoarthritis progression in a rat model. *International Immunopharmacology*, 2020; 78:106043.
- [62] Rengachar P, Polavarapu S, Das UN. Insights in diabetes: Molecular mechanisms- Protectin DX, an anti-inflammatory and a stimulator of inflammation resolution metabolite of docosahexaenoic acid, protects against the development of streptozotocin-induced type 1 and 2 diabetes mellitus in male swiss albino mice. *Fron Endocrinol (Lausanne)*. 2022; 13:1053879.
- [63] Fonseca FC, Orlando RM, Turchetti-Maia RM, Francischi JN. Comparative effects of ω 3 polyunsaturated fatty acid derivatives resolvins E1 and D1 and protectin DX in models of inflammation and pain. *J Inflamm Res*. 2017; 10:119-133.
- [64] Park C., Xu Z., Liu T., Lü N., Serhan C. N. Ji R. Resolvin D2 Is a Potent Endogenous Inhibitor for Transient Receptor Potential Subtype V1/A1, inflammatory Pain, and Spinal Cord Synaptic Plasticity in Mice: Distinct Roles of Resolvin D1, D2 and E1. *J Neurosci*, 2011; 31(50): 18433-18438.
- [65] Kim HY, Lee I, Chun SW, Kim HK. Reactive oxygen species donors increase the responsiveness of dorsal horns and induce mechanical hyperalgesia in rats. *Neural Plasticity*. 2015; 2015:293423.
- [66] Lee HI, Park BR, Chun SW. Reactive oxygen species increase neuronal excitability via activation of nonspecific cation channel in rat medullary dorsal horn neurons. *Korean J Physiol Pharmacol*. 2017; 21:371-376.
- [67] Ogawa N, Kurokawa T, Mori Y. Sensing of redox status by TRP channels. *Cell Calcium*. 2016; 60(2): 115-122.
- [68] Pinho-Ribeiro FA, Verri WA, Chiu IM. Nociceptor sensory neuron-immune interactions in pain and inflammation. *Trends Immunol*. 2017; 38(1): 5-19.
- [69] Fattori V, Zaninelli TH, Ferraz CR, Brasil-Silva L, Borghi SM, Cunha JM, et al. Maresin 2 is an analgesic specialized pro-resolution lipid mediator in mice by inhibiting neutrophil and monocyte recruitment, nociceptor neuron TRPV1 and TRPA1 activation and CGRP release. *Neuropharmacology*. 2022; 216: 109189.
- [70] Fattori V, Pinho-Ribeiro FA, Staurengo-Ferrari L, Borghi SM, Rossaneis AC, et al. The specialised pro-resolving lipid mediator maresin 1 reduces inflammatory pain with a long-lasting analgesic effect. *Br J Pharmacol*. 2019; 176(11):1728-1744.
- [71] Park CK, Lu N, Xu ZZ, Liu T, Serhan CN, Ji RR. Resolving TRPV1- and TNF- α mediated spinal cord synaptic plasticity and inflammatory pain with neuroprotectin D1. *J Neurosci*. 2011; 31(42):15072-15085.

3. CONCLUSÃO

Neste trabalho evidenciamos a eficácia anti-inflamatória, antioxidante e analgésica da PDX. Este SPM reduziu os parâmetros de dor analisados, como a hiperalgesia mecânica e térmica, a alodinia mecânica, os comportamentos de dor manifesta (contorções abdominais, sacudidas de pata e tempo gasto lambendo a pata) e o desbalanço na distribuição de peso corporal sobre as patas traseiras. Ainda, o tratamento intraperitoneal com a PDX não afetou a sensibilidade mecânica e térmica basal dos animais, assim como não alterou a capacidade motora. Este dado reflete que o tratamento com PDX confere essencialmente um efeito analgésico, e não de cunho anestésico ou de relaxamento muscular, o que incapacitaria os animais de responderem normalmente a estímulos mecânicos e térmicos, além de afetar a capacidade motora. A PDX inibiu o recrutamento leucocitário (neutrófilos e macrófagos) e diminuiu a produção de citocinas pró-inflamatórias e ERO, demonstrando significantes efeitos anti-inflamatório e antioxidante. Além disso, a PDX atenuou a ativação neuronal ao inibir o canal iônico TRPV1, demonstrando um importante e inédito mecanismo analgésico desta droga. Assim, este estudo demonstrou pela primeira vez que a PDX possui capacidade de modular a atividade neuronal em modelo de dor inflamatória aguda. Ainda, o tratamento agudo com PDX não levou ao desenvolvimento de lesões gástricas, hepáticas ou renais, refletidas pela avaliação da atividade da MPO estomacal e dos níveis plasmáticos de ALT, AST, ureia e creatinina. Este resultado indica a segurança no tratamento agudo com a PDX, uma vez a administração deste SPM não promoveu o desenvolvimento de efeitos adversos comuns dos AINEs, por exemplo. Desta forma, a PDX apresenta-se como uma segura estratégia promissora para o controle da dor e inflamação resultantes da produção exacerbada das ERO e seus subsequentes efeitos deletérios.

ANEXO 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-cpi-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-se 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.

Prof.ª Dr.ª 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

ANEXO B

Cell Calcium 119 (2024) 102870



Contents lists available at ScienceDirect

Cell Calcium

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ceca

TRPV1: Receptor structure, activation, modulation and role in neuro-immune interactions and pain

Thaila Kawane Euflazio Maximiano^{a,1}, Jessica Aparecida Carneiro^{a,1}, Victor Fattori^{b,*}, Waldiceu A. Verri^{b,*}^a Laboratory of Pain, Inflammation, Neuropathy, and Cancer; Department of Pathology, Center of Biological Sciences, Londrina State University, Londrina, Paraná, Brazil^b Vascular Biology Program, Department of Surgery, Boston Children's Hospital-Harvard Medical School, Karp Research Building, 300 Longwood Ave, 02115, Boston, Massachusetts, United States

ARTICLE INFO

Keywords:
Calcium
Pain
TRPV1

ABSTRACT

In the 1990s, the identification of a non-selective ion channel, especially responsive to capsaicin, revolutionized the studies of somatosensation and pain that were to follow. The TRPV1 channel is expressed mainly in neuronal cells, more specifically, in sensory neurons responsible for the perception of noxious stimuli. However, its presence has also been detected in other non-neuronal cells, such as immune cells, β -pancreatic cells, muscle cells and adipocytes. Activation of the channel occurs in response to a wide range of stimuli, such as noxious heat, low pH, gases, toxins, endocannabinoids, lipid-derived endovanilloids, and chemical agents, such as capsaicin and resiniferatoxin. This activation results in an influx of cations through the channel pore, especially calcium. Intracellular calcium triggers different responses in sensory neurons. Dephosphorylation of the TRPV1 channel leads to its desensitization, which disrupts its function, while its phosphorylation increases the channel's sensitization and contributes to the channel's rehabilitation after desensitization. Kinases, phosphoinositides, and calmodulin are the main signaling pathways responsible for the channel's regulation. Thus, in this review we provide an overview of TRPV1 discovery, its tissue expression as well as on the mechanisms by which TRPV1 activation (directly or indirectly) induces pain in different disease models.

1. Introduction

1.1. General Aspects

The transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1), formerly called vanilloid receptor subtype 1 (VR1) or simply capsaicin receptor in the past, is one of the so-called "nociceptive transient receptor potential (TRP) channels" and one of the "thermo TRP channels" [1]. Its classification tells a lot about its nature. TRPV1 channels are expressed in a great variety of cells and tissues (Table 1). As a polymodal signal integrator, responds to several stimuli, including noxious temperatures ($>43^\circ\text{C}$), low pH (<5.9), anandamide, and environment components, including capsaicin, the active component of chili peppers, the most classic and studied environment component (Table 2).

The activation of the channel leads to a conformational change that allows the passage of cations, especially calcium (Ca^{2+}), to the intracellular medium [2]. Ca^{2+} is a second messenger that is associated with several physiological and pathological processes [3]. Ca^{2+} increasing in the cytosol (Ca^{2+}_i) is a result of extracellular membrane influx or intracellular stores efflux, such as mitochondria (Ca^{2+}_m) and endoplasmic reticulum (ER) (Ca^{2+}_r) [4]. However, TRPV1 Ca^{2+}_i increase is essentially from the extracellular medium and not from internal Ca^{2+} stores [3].

In nociceptors, sensory afferent neurons specialized in the detection of noxious stimuli, Ca^{2+} permeation through the channel results in the activation/depolarization of the neuron and firing of action potentials. This also initiates a process of neurogenic inflammation that amplifies the message of the local stimuli [1,2,5,6]. In fact, intradermal

^{*} Corresponding author.^{**} Corresponding authors: Departamento de Ciências Patológicas, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid Km480 PR445, 86057-970, Post-office box 10.011, Londrina, Paraná, Brazil.E-mail addresses: victor.fattori@ch.harvard.edu (V. Fattori), waveru@uel.br (W.A. Verri).¹ Equal contribution.<https://doi.org/10.1016/j.ceca.2024.102870>

Received 30 November 2023; Received in revised form 6 March 2024; Accepted 6 March 2024

Available online 8 March 2024

0143-4160/© 2024 Elsevier Ltd. All rights reserved.