THAILA KAWANE EUFLAZIO MAXIMIANO

EFEITOS ANALGÉSICO E ANTI-INFLAMATÓRIO DA RESOLVINA D5 (RVD5) NO MODELO DE DOR E INFLAMAÇÃO INDUZIDO POR CARRAGENINA EM CAMUNDONGOS MACHOS E FÊMEAS

Londrina
2024

THAILA KAWANE EUFLAZIO MAXIMIANO

EFEITOS ANALGÉSICO E ANTI-INFLAMATÓRIO DA RESOLVINA D5 (RVD5) NO MODELO DE DOR E INFLAMAÇÃO INDUZIDO POR CARRAGENINA EM CAMUNDONGOS MACHOS E FÊMEAS

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 Jr

Londrina
2024

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

M464e Maximiano, Thaila Kawane Euflazio.

Efeitos analgésico e anti-inflamatório da resolvina D5 (RvD5) no modelo de dor e inflamação induzido por carragenina em camundongos machos e fêmeas / Thaila Kawane Euflazio Maximiano. - Londrina, 2024.
95 f. : il.

Orientador: Waldiceu Aparecido Verri jr.
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 inflamatória - Tese. 2. Nocicepção - Tese. 3. Mediadores lipídicos pró-resolução - Tese. 4. Dimorfismo sexual - Tese. I. Verri jr, Waldiceu Aparecido . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. III. Título.

CDU 574

THAILA KAWANE EUFLAZIO MAXIMIANO

EFEITOS ANALGÉSICO E ANTI-INFLAMATÓRIO DA RESOLVINA D5(RVD5) NO MODELO DE DOR E INFLAMAÇÃO INDUZIDO POR CARRAGENINA EM CAMUNDONGOS MACHOS E FÊMEAS

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

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

Profa. Dra. Glaura Scantamburlo Alves Fernandes
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Dra. Fernanda Soares Rasquel de Oliveira
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 06 de agosto de 202

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verri Jr, meu orientador, que me acompanhou e ofereceu a oportunidade e estrutura necessárias para a execução desse trabalho e tantos outros.

Aos membros da minha Banca Examinadora, Profª. Dra. Glaura Scantamburlo Alves Fernandes, Profª. Dra. Ivete Conchon costa, Dra. Fernanda Soares Rasquel de Oliveira e Dra. Mariana Marques Bertozzi, pela disponibilidade, paciência e dedicação a este trabalho.

As minhas amigas e colegas de laboratório, Jessica Aparecida Carneiro, Beatriz Hoffmann Salles Bianchini, e Amanda Martins Dionisio, por todo conhecimento técnico, mas principalmente pelo alivio cômico.

Aos professores e demais colegas, Maria Rosana Ferreira De Paula, Tiago Henrique Zaninelli, Kelly Yaekashi, Anelise Franciosi, Geovana Cebinelli, Vitória Araújo, e tantos outros, pelo apoio e dedicação.

A minha família, minha mãe, Lucia Euflazio Maximiano, e irmã, Thais Fernanda Euflazio Maximiano, pilar do meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Aos órgãos de financiamento, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação Araucária (FA) pelas bolsas de auxílio a pesquisa.

“Aprendi que o caminho para o progresso não é rápido e nem fácil”
- Marie Curie

RESUMO

MAXIMIANO, Thaila Kawane Euflazio. **Efeitos analgésico e anti-inflamatório da Resolvina D5 (RvD5) no modelo de dor e inflamação induzido por carragenina em camundongos machos e fêmeas**. 2024. 102. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) — Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2024.

A inflamação é uma resposta imediata causada por um agente agressor ou injúria tecidual. Mediadores químicos gerados durante o processo inflamatório agem sobre receptores específicos presentes nos neurônios nociceptivos primários, nociceptores, responsáveis pela detecção de estímulos dolorosos, promovendo dor. A Resolvina D5 (RvD5) é um mediador lipídico pró-resolução (MLPR) derivado do ácido docosahexaenóico, um metabólito do ômega 3, que apresenta propriedades analgésica, anti-inflamatória e antioxidante, no entanto, muito pouco se sabe sobre os mecanismos pelos quais a RvD5 promove seus efeitos. Este também é o primeiro MLPR em que se foi observado dimorfismo sexual. A carragenina, λ-carragenina, um polissacarídeo sulfatado derivado de algas marinhas vermelhas, é amplamente utilizada em modelos de dor e inflamação dada à sua resposta inflamatória aguda característica, com produção de mediadores pró-inflamatórios, recrutamento de leucócitos, principalmente neutrófilos, e produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Dito isso, esse projeto teve como objetivo avaliar o efeito analgésico e anti-inflamatório da RvD5 na dor e inflamação em dois modelos de dor e inflamação induzidos pelo estímulo de carragenina em camundongos machos e fêmeas. Para isso, camundongos Swiss machos e fêmeas foram tratados com RvD5 nas doses de 3, 10 e 30 nanogramas (ng) para determinação da melhor dose ou veículo via intraperitoneal, i.p., uma hora antes do estímulo de carragenina de 300 µg/ animal via intraplantar, i.pl. e 1 mg/ animal, i.p. Foram realizadas análises de hiperalgesia mecânica (von Frey), hiperalgesia térmica (placa quente e Hargreaves), edema, atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO) e N-Acetil-b-d-Glucosaminidase (NAG) na pata de camundongos. Além disso, foi realizada contagem de leucócitos totais e perfil leucocitário e análise da produção de citocinas (interleucina (IL)-1β, fator de necrose tumoral α (TNF-α), IL-6) em modelo de peritonite. Foi demonstrado que a RvD5 na dose de 10 ng por animal foi capaz de prevenir a indução de hiperalgesia

mecânica e térmica em todos os pontos tempo avaliados. No que se refere ao efeito anti-inflamatório, a RvD5 na dose de 10 ng por animal foi capaz de prevenir a formação de edema em camundongos machos, mas não em fêmeas. RvD5 na dose 10 ng por animal foi capaz de prevenir a indução da atividade da enzima MPO em camundongos machos e fêmeas. Não houve alteração da atividade da enzima NAG em ambos os sexos. Também demonstramos que a RvD5 na dose de 10 ng por animal foi capaz de prevenir a migração de leucócitos totais, polimorfonucleares e mononucleares na cavidade peritoneal. RvD5 na dose de 10 ng por animal também foi capaz de prevenir a indução da produção de citocinas de uma forma sexo-dependente. Em camundongos machos, houve redução da produção de IL-1β com a produção de TNF-α e IL-6 permanecendo inalteradas. Em fêmeas, houve redução da produção de TNF-α com a produção de IL-1β e IL-6 permanecendo inalterada. Portanto, a RvD5 possui efeito analgésico e anti-inflamatório em modelos de dor e inflamação induzidos por carragenina por mecanismos distintos em machos e fêmeas, sendo a RvD5 uma drogapromissora para o tratamento de doenças de cunho inflamatório.

Palavras-chave: Dor; Dor inflamatória; Nocicepção; Mediadores lipídicos pró-resolução; Dimorfismo sexual.

ABSTRACT

MAXIMIANO, Thaila Kawane Euflazio. **Analgesic and anti-inflammatory effects of Resolvin D5 (RvD5) in a model of carrageenan-induced pain and inflammation in male and female mice.** 2024. 102. Dissertation (Master's in Experimental Pathology) —Biological Sciences Center, State University of Londrina, Londrina, 2024.

Inflammation is an immediate response caused by an aggressive agent or tissue injury. Chemical mediators generated during the inflammatory process act on specific receptors present in primary nociceptive neurons, nociceptors, responsible for detecting painful stimuli, promoting pain. Resolvin D5 (RvD5) is a specialized pro-resolving mediator (SPM) derived from docosahexaenoic acid, an omega-3 metabolite, which has analgesic, anti-inflammatory and antioxidant properties. However, very little is known about the mechanisms by which RvD5 promotes its effects. This is also the first SPM in which sexual dimorphism has been observed. Carrageenan, λ-carrageenan, a sulfated polysaccharide derived from red marine algae, is widely used in models of pain and inflammation due to its characteristic acute inflammatory response, with production of pro-inflammatory mediators, recruitment of leukocytes, mainly neutrophils, and production of reactive oxygen and nitrogen species. That said, this project aimed to evaluate the analgesic and anti-inflammatory effect of RvD5 on pain and inflammation in two models of pain and inflammation induced by carrageenan stimulation in male and female mice. For this, male and female Swiss mice were treated with RvD5 at doses of 3, 10 and 30 nanograms (ng) to determine the best dose or vehicle via intraperitoneal, i.p., one hour before carrageenan stimulation of 300 µg/animal via intraplantar, i.pl. and 1 mg/animal, i.p. Mechanical hyperalgesia (von Frey), thermal hyperalgesia (hot plate and Hargreaves), edema, and myeloperoxidase (MPO) and N-Acetyl-b-d-Glucosaminidase (NAG) enzyme activity were analyzed in the paw of mice. In addition, total leukocyte count and leukocyte profile were performed, as well as analysis of cytokine production (interleukin (IL)-1β, tumor necrosis factor α (TNF-α), IL-6) in a peritonitis model. It was demonstrated that RvD5 at a dose of 10 ng per animal was able to prevent the induction of mechanical and thermal hyperalgesia at all time points evaluated. Regarding the anti-inflammatory effect, RvD5 at a dose of 10 ng per animal was able to prevent edema formation in male mice, but not in females. RvD5 at a dose of 10 ng per animal was able to prevent

the induction of MPO enzyme activity in male and female mice. There was no change in NAG enzyme activity in either sex. We also demonstrated that RvD5 at a dose of 10 ng per animal was able to prevent the migration of total, polymorphonuclear and mononuclear leukocytes into the peritoneal cavity. RvD5 at a dose of 10 ng per animal was also able to prevent the induction of cytokine production in a sex-dependent manner. In male mice, there was a reduction in IL-1β production with TNF-α and IL-6 production remaining unchanged. In females, there was a reduction in TNF-α production with IL-1β and IL-6 production remaining unchanged. Therefore, RvD5 has analgesic and anti-inflammatory effects in models of pain and inflammation induced by carrageenan through distinct mechanisms in males and females, making RvD5 a promising drug for the treatment of inflammatory diseases.

Key-words: Pain; Inflammatory pain; Nociception; Specialized pro-resolving mediator; Sexual dimorphism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mecanismos e características da inflamação aguda 22
Figura 2 — Modulação periférica, central e mecanismos descendentes de controle da nocicepção 33
Figura 3 – Estrutura da Resolvina D5 65
Figura 4 – Resolvina D5 previne hiperalgesia mecânica e térmica induzida pela carragenina em camundongos machos e fêmeas 86
Figura 5 — Resolvina D5 previne a formação de edema induzida pela carragenina em camundongos machos, mas não em fêmeas 87
Figura 6 — Resolvina D5 previne a migração de neutrófilos induzida pela carragenina para a pata de camundongos machos e fêmeas 89
Figura 7 — Resolvina D5 previne a migração de leucócitos induzida pela carragenina para o microambiente peritoneal em camundongos machos e fêmeas 90
Figura 8 — Resolvina D5 previne a produção de TNF-α e IL-1β induzida pela carragenina de uma forma sexo-dependente 92

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	Ácido 2,2'-Azinobis-3-etilbenzotiazolina 6-sulfônico
AINE	Anti-inflamatório não esteroidal
AMPAR	Ácido alfa amino-3-hidroxi-5-metil isoxazol-4-propiônico de receptores ionotrópicos de glutamato
AN	Núcleo acessório
AP-1	Proteína ativadora 1
ASC	Domínio de recrutamento de caspase C-terminal
A1R	Receptor de adenosina A1
A2AR	Receptor de adenosina A2A
A2BR	Receptor de adenosina A2BR
A3R	Receptor de adenosina A3
Bcl10	Linfoma de células B/ leucemia 10
CAT	Catalase
CCI-ION	Constrição crônica do nervo infra orbital
CCL5	Ligante 5 de quimiocina CC
COX-1	Ciclooxigenase do tipo 1
COX-2	Ciclooxigenase do tipo 2
CXCR1	Receptores CXC do tipo 1
CXCR2	Receptores CXC do tipo 2
DAMP	Padrão molecular associado à dano
DHA	Ácido docosahexaenoico
DOR	Receptor opióde delta
DPPH	2,2-Difenil-1-picril-hidrazil
DRV1	Receptor de resolvina D1
DRG	Gânglio da raiz dorsal
Drt	Núcleo reticular dorsal lateral e caudal
DSS	Sulfato de dextrano sódico
D1R	Receptor de dopamina 1
D2R	Receptor de dopamina 2
D3R	Receptor de dopamina 3
D4R	Receptor de dopamina 4

D5R	Receptor de dopamina 5
ETA	Endotelina do tipo A
ETB	Endotelina do tipo B
ET-1	Endotelina-1
EPA	Ácido eicosapentaenóico
ER-α	Receptor de estrógeno alfa
ER-β	Receptor de estrógeno beta
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
E2	Estradiol
FRAP	Capacidade antioxidante redutora de ferro
fPOP	fratura do osso tibial
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GCSF	Fator estimulador de colônias granulocitárias
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
GPCR	Receptores acoplados à proteína G
GPR101	Receptores de proteína G 101
GPX	Glutationa peroxidase
GSH	Glutationa reduzida
HO°	Radicais hidroxil
HO-1	Hemoxigenase-1
H2O2	Peróxido de hidrogênio
IB4	Isolectina B4
IκBα	I kappa B alfa
IKK	Quinase IκB
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-1R	Receptor de IL-1
IL-33	Interleucina 33
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
iNOS	Óxido nitrico sintase induzida
JNK	Quinases c-Jun NH2-terminal

KC	Citocina derivada de queratinócitos
Keap1	Proteína 1 associada a ECH semelhante a Kelch
KOR	Receptores opióde kappa
LC	Locus coeruleus
LOX	Lipoxigenase
LPS	Lipopolissacarídeo
LTB4	Leucotrieno B4
LX	Lipoxinas
MAPK	Proteínas quinase ativada por mitógeno
MDA	Malondialdeído
MLPR	Mediadores lipídicos pró-resolução
MOR	Receptor opióde mu
mPFC	Cortex pré-frontal medial
MPO	Mieloperoxidase
MyD88	Fator de diferenciação mielóide 88
NA	Noradrenalina
NADPH oxidase	Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida oxidase
Nav	Canais de sódio voltagem dependente
NETs	Armadilhas extracelulares de neutrófilos
NFATc1a	Fator nuclear de células T ativadas c1a
NG	Gânglio nodoso
NK1R	Receptor de neurocinina 1
NLR	Receptor do tipo NOD
NLRC4	Receptor da família dos NLRs contendo o domínio CARD 4
NLRP3	Receptor da família dos NLRs contendo o domínio pirina 3
NMDA	N-metil-d-aspartato
NMDAR	Receptores N-metil-d-aspartato
NO	Óxido nitrico
NOR	Receptor de nociceptina
Nrf2	Fator nuclear E2 relacionada ao fator 2
ONOO-	Peroxinitrito
OT	Ocitocina

OTR	Receptor de ocitocina
O^2	Oxigênio
O^{2-}	Superóxido
PAG	Substância cinzenta periaquedutal
PAMP	Padrão molecular associados à patógenos
Penk	Proencefalina
PGE2	Prostaglandina E2
PGI2	Prostaciclina
PKA	Proteínas quinase A
PKC	Proteínas quinase C
PLA2	Fosfolipase A2
PLC	Fosfolipase C
PRR	Receptores de reconhecimento de padrão
PVN	Núcleo paraventricular
RTK	Receptores de tirosina quinase
RvD5	Resolvina D5
RVM	Medula ventromedial rostral
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
SOD	Superóxido dismutase
SON	Núcleo supra óptico
SP	Substância P
ST2	Supressor solúvel de tumorigenicidade 2
TG	Gânglio trigeminal
TLR	Receptor do tipo toll
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TRPV1	Receptor de potencial transiente vanilóide 1
TRPA1	Receptor de potencial transitório anquirina 1
TRPM3	Receptor de potencial transiente melastatin 3
VG	Gânglio vagal
VLM	Medula ventrolateral
VTA	Área tegmental ventral
5-HT	5-hidroxitriptamina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 17
1.1 INFLAMAÇÃO AGUDA... 17
1.1.1 Dor Inflamatória 22
1.2 CARRAGENINA 33
1.2.1 Dimorfismo sexual e modelo de carragenina 47
1.3 MEDIADORES LIPÍDICOS PRÓ-RESOLUÇÃO 59
1.3.1 Resolvina D5 60

2 OBJETIVOS 66
2.1 OBJETIVO GERAL 66
2.1.1 Objetivos Específicos 66

REFERÊNCIAS 67

3 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO (FRONTIERS IN PHARMACOLOGY 78

ANEXOS 100
ANEXO A – Cópia do parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)... 101
ANEXO B – Comprovante de publicação em artigo cientifico no periódico *Cell Cacium* 102

1 INTRODUÇÃO

1.1 INFLAMAÇÃO AGUDA

A inflamação é um mecanismo de defesa desenvolvido pelo hospedeiro que atua em resposta a um estímulo agressor (Buckley; Gilroy; Serhan, 2014). A resposta inflamatória aguda é dividida em duas fases, uma fase inicial, também conhecida como inflamatória, caracterizada pelos sinais/sintomas clássicos da inflamação, incluindo dor, rubor, calor, tumor e, em caso de não resolução, perda de função, e em uma fase de resolução responsável por limitar o processo inflamatório e restaurar a homeostase (Buckley; Gilroy; Serhan, 2014). Os mediadores lipídicos pró-resolução (MLPR) são sintetizados durante a fase de resolução da inflamação aguda, e atuam ativamente para promover a resolução da inflamação (Serhan, 2008).

A resposta inflamatória se inicia com as células imunes residentes, como mastócitos, macrófagos e células dendríticas, reconhecendo o agente agressor e desencadeando uma cascata de sinalização que leva a ativação de fatores de transcrição com subsequente expressão e liberação de mediadores pró-inflamatórios (Varela *et al.,* 2018). Esses mediadores, por sua vez, irão atuar em diversos tipos celulares promovendo diversas respostas (Varela *et al.,* 2018). As moléculas responsáveis por desencadear a resposta inflamatória inicial podem ser de natureza externa, conhecidas como padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) e de natureza interna, conhecidas como padrões moleculares associados à danos (DAMPs) (Barbé *et al.,* 2014). O tipo de resposta gerada pelo hospedeiro irá depender, dentre outros fatores, da natureza do estímulo em questão (Barbé *et al.,* 2014).

Vários receptores presentes interna e externamente às células imunes podem reconhecer PAMPs e DAMPs e gerar uma resposta inflamatória (Kawai; Akira, 2011). Esses receptores são conhecidos como receptores de reconhecimento de padrões (PRRs). Dentre estes receptores estão os receptores do tipo Toll (TLRs) e receptores do tipo NOD (NLRs) (Kawai; Akira, 2011). A cascata de sinalização gerada pela ativação desses receptores leva a produção de diversos mediadores pró-inflamatórios (Kawai; Akira, 2011). O fator de transcrição NF-κB é um heterodímero formado por duas subunidades, p65 e p50, e está relacionado à expressão de diversas citocinas, quimiocinas e enzimas que promovem inflamação (Ghosh; Hayden, 2008; Takeuchi; Akira, 2010). Em seu estado de descanso, inativado, o NF-κB se encontra no citosol e está ligado a IκB, que impede sua translocação (Li *et al.,* 2009). Mediante um estímulo externo, como os fornecidos pelos PRRs, o complexo formado por NF-κB/IκB é fosforilado por proteínas quinase ativada por mitógeno (MAPKs), que são proteínas serina/treonina quinases, incluindo quinases reguladas por sinal extracelular (ERKs), quinases c-Jun NH2-terminais (JNKs), e isoformas p38 (p38 MAPKs), assim como pela quinase IκB (IKK), e o complexo é degradado (Kaminska *et al.,* 2009; Huang *et al.,* 2010). Uma vez libertas, ativas, p65 e p50 são translocadas para o núcleo e se ligam a várias regiões promotoras de genes alvos promovendo sua transcrição (White *et al.,* 2000; Pham *et al.,* 2017).

Algumas citocinas pró-inflamatórias são transcritas em sua forma inativa e necessitam de um complexo proteico para sua maturação, como exemplo, a interleucina 1 beta (IL-1β). A IL-1β é sintetizada em sua forma inativa, também conhecida como imatura, pró-IL-1β (pro-IL-1β; 35 KDa), sendo necessária sua clivagem por uma cisteína protease para obtenção de sua forma ativa, também conhecida como madura, IL-1β (IL-1β; 17 KDa) (Cerretti *et al.,* 1992). Esses complexos

são geralmente formados por NLR, por uma molécula adaptadora, a proteína semelhante a uma mancha associada à apoptose contendo um domínio de recrutamento de caspase C-terminal (ASC), e por caspase-1 ou 11, sendo os inflamassomas receptor da família dos NLRs contendo o domínio pirina 3 (NLRP3) e receptor da família dos NLRs contendo o domínio CARD 4 (NLRC4) os mais caracterizados (Mariathasan *et al.,* 2004; Martinon *et al.,* 2006). A caspase-1 é uma cisteína protease muito conhecida no processamento e maturação da IL-1β (Cerretti *et al.,* 1992; Wang; Lenardo, 2000). Assim como a IL-1β, a caspase-1 é sintetizada em sua forma inativa, zimógeno (pró-caspase-1; 45 KDa), e se torna ativa (caspase- 1; 20 KDa) após sua clivagem pelas várias moléculas que formam um complexo após a sua oligomerização (Martinon *et al.,* 2009). O conjunto formado por receptor, ASC, e caspase-1 formam o complexo canônico do inflamassoma, também conhecido simplesmente como inflamassoma, responsável, dentre outras funções, pela maturação de citocinas.

Os mediadores formados irão direta e indiretamente atuar sobre a vasculatura, promovendo vasodilatação, ativação endotelial, e recrutamento de leucócitos (Medzhitov, 2008). Aminas simpáticas (histamina e serotonina) liberadas pelos mastócitos, citocinas pró-inflamatórias (IL-1β, fator de necrose tumoral alfa [TNF-α]), quimiocinas (ligante 5 de quimiocina CC [CCL5]), leucotrienos (leucotrieno B4 [LTB4]), e prostaglandinas (prostaglandina E2 [PGE2]) e prostaciclina [PGI2]) produzidos por células imunes e demais células adjacentes são responsáveis por esses eventos (Buckley *et al.,* 2014; Medzhitov, 2008).

Os leucócitos, como macrófagos e neutrófilos, empregam de diversos mecanismos para eliminação de patógenos e demais agentes agressores, sendo estes mecanismos intra e extracelulares (Kolaczkowska; Kubes, 2013). Dentre os mecanismos está a produção de espécies

reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN). A produção de ERO é iniciada pela fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida (NADPH) oxidase, complexo enzimático constituído de várias enzimas (p40phox , p47phox, P67phox, p22phox , gp91phox) (Borregaard, 2010; Segal, 2005), que catalisa a redução de moléculas de oxigênio (O^2) para superóxido (O^{2-}). O superóxido, então, pode ser convertido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroxil (HO°) pela superóxido dismutase (SOD) (Seixas *et al.,* 2022). Ademais, o óxido nítrico (NO) produzido pela óxido nítrico sintase induzida (iNOS), enzima altamente sintetizada em contexto inflamatório, pode interagir com superóxido para gerar alguns produtos adicionais, como peroxinitrito ($ONOO^-$) (Bogdan *et al.,* 2000). Portanto, essas moléculas auxiliam na resposta de defesa do hospedeiro ao gerar essa “explosão respiratória”. ERO e ERN são efetivas na eliminação de patógenos por serem moléculas extremamente reativas à estruturas biológicas, como proteínas, ácidos nucléicos e lipídios (Seixas *et al.,* 2022).

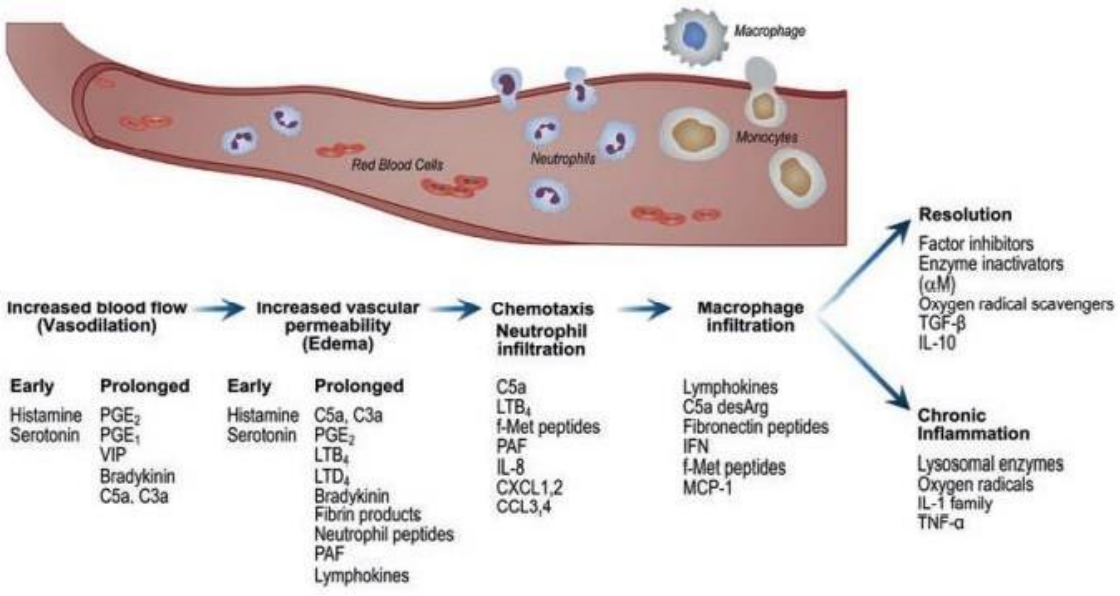
De forma a sobreviver às agressões promovidas pela própria produção de ERO e ERN, os hospedeiros adotaram diversos mecanismos de proteção. A SOD, catalase e glutationa são as principais enzimas responsáveis pela degradação de ERO. Após a conversão de O^{2-} em H_2O_2 pela SOD, H_2O_2 pode ser facilmente metabolizada pela catalase e peroxidase glutationa em H_2O e O^2 (Borregaard, 2010; Seixas *et al.,* 2022). O desbalanço entre a produção de ERO e a capacidade de eliminá-los é chamado de estresse oxidativo (Seixas *et al.,* 2022). O fator nuclear E2 relacionado ao fator 2 (Nrf2) é responsável pela transcrição de diversos componentes antioxidantes. A Proteína 1 associada a ECH semelhante a Kelch (Keap1) é uma molécula responsável por manter o fator de transcrição Nrf2 em seu estado inativo (Saha *et al.,* 2020; Yamamoto *et al.,* 2018; Liu *et al.,* 2016). Uma vez fosforilado, o complexo Keap1-Nrf2 é degradado e Nrf2 é translocado para o

núcleo (Saha *et al.,* 2020; Yamamoto *et al.,* 2018; Liu *et al.,* 2016).

O neutrófilo, célula mais abundante durante a fase inicial da inflamação, dispõe de um mecanismo especial para a eliminação de agentes agressores que não foram fagocitados, as armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs). Para formação de NETs, o neutrófilo expõe seu material genético e grânulos citoplasmáticos para o ambiente extracelular, favorecendo a eliminação do patógeno (Kolaczkowska; Kubes, 2013). O material genético exposto auxilia na neutralização e opsonização de patógenos, e agentes antimicrobicidas, como as histonas, promovem a formação de poros em membranas microbianas. Também há a produção de ERO por enzimas liberadas dos grânulos citoplasmáticos, como a mieloperoxidase (MPO) (Barth *et al.,* 2016; Wang *et al.,* 2024).

Os monócitos recrutados podem se diferenciar em duas subclasses de macrófagos, M1 e M2. Os macrófagos M1 atuam na fase inicial da inflamação e promovem a produção de mediadores pró-inflamatórios auxiliando no quadro inflamatório. Já os macrófagos M2 atuam na fase de resolução da inflamação e apresentam atividade pró-resolutiva e anti-inflamatória (Murray; Wynn, 2011). A não- resolução da inflamação pode resultar em diversas doenças, como artrites, doenças cardiovasculares e doenças degenerativas, acarretando na diminuição da qualidade de vida de indivíduos acometidos por essas condições (Serhan; Levy, 2018; Tungen; Aursnes; Hansen, 2015).

Figura 1 – Mecanismos e características da Inflamação aguda



Fonte: Imagem de Germolec *et al.,* 2018

1.1.1 DOR INFLAMATÓRIA

A dor pode ser definida como uma sensação sensorial desconfortável carregada de componentes emocionais (Wiech *et al.,* 2014; Smith *et al.,* 2016). De fato, a associação internacional para o estudo da dor classifica a dor como “Uma experiência sensorial e emocional desagradável que é associada ou semelhante a lesões teciduais reais ou potenciais” (Raja *et al.,* 2020). Os neurônios nociceptivos periféricos, também conhecidos como nociceptores, são uma classe de neurônios aferentes primários que têm seus corpos celulares localizados em quatro regiões anatômicas: gânglio da raiz dorsal (DRG), gânglio trigeminal (TG), gânglio vagal (VG), e gânglio nodoso (NG) (Maximiano *et al.,* 2024). Os nociceptores estão presentes principalmente em fibras nervosas sensoriais amielínicas do tipo C, mas também estão presentes, em menor

proporção, em fibras nervosas sensoriais mielínicas do tipo Aδ (Maximiano *et al.,* 2024). Fibras nervosas sensoriais amielínicas do tipo C podem ser peptidérgicas e não peptidérgicas (Mickle *et al.,* 2015). A expressão do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e substância P (SP) são comumente usados como marcadores de fibras nervosas peptidérgicas e a ligação a isolectina B4 (IB4), glicoproteína que se liga a resíduos de carboidratos de α-D- galactose expressos na membrana de neurônios não peptidérgicos, é usado como marcador de fibras nervosas não peptidérgicas (Kim *et al.,* 2010; Barabas *et al.,* 2012).

Os nociceptores possuem alto limiar de ativação e são responsáveis por detectar estímulos nocivos de natureza química, mecânica e térmica (Fattori *et al.,* 2020). Ao projetar suas fibras para o sistema nervoso periférico (SNP) e para o sistema nervoso central (SNC), os nociceptores garantem a integridade do hospedeiro, sendo a dor de natureza aguda, em essência, uma resposta protetiva (Fattori *et al.,* 2020). Uma vez atingido o ponto máximo de excitação neuronal, estímulos provenientes da periferia promovem a despolarização neuronal e, então, os nociceptores transmitem o potencial de ação periférico gerado para o SNC (Pinho- ribeiro *et al.,* 2017).

Uma das consequências da produção de mediadores pró- inflamatórios pelas células imunes e demais células adjacentes é a sensibilização periférica. Mediadores produzidos por células presentes no foco de inflamação promovem a sensibilização de neurônios aferentes primários, tais como os nociceptores (Pinho-ribeiro *et al.,* 2017). Em outras palavras, mediadores como citocinas, quimiocinas, prostaglandinas e aminas simpáticas, interagem com seus respectivos receptores presentes na membrana dos nociceptores fazendo com que estes sejam mais suscetíveis a geração de um potencial de ação. Portanto, estes mediadores

produzidos durante o processo inflamatório “facilitam” a propagação do estímulo doloroso após fornecido um estímulo adicional (Pinho-ribeiro *et al.,* 2017). A sensibilização dos nociceptores por estes mediadores pode desencadear a hiperalgesia e alodinia (Verri et al., 2006). Na hiperalgesia, há a exacerbação de um estímulo doloroso após adicional de um estímulo previamente doloroso (Verri *et al.,* 2006). Um bom exemplo é a aplicação de uma temperatura nociceptiva a um local de inflamação. Na alodinia, há a exacerbação de um estímulo doloroso após adicional de um estímulo até então não doloroso (Verri *et al.,* 2006). Isso ocorre, por exemplo, em vítimas de queimadura que se tornam sensíveis ao toque no local de lesão.

Alguns mediadores promovem a sensibilização direta de nociceptores, enquanto outros levam a produção dos chamados mediadores finais do processo inflamatório (Verri *et al.,* 2006; Pinho-ribeiro *et al.,* 2017; Fattori *et al.,* 2020). Após a indução de um estímulo inflamatório, citocinas e quimiocinas são liberadas em cascata e de forma ordenada culminando na liberação de prostaglandinas e aminas simpáticas (Verri *et al.,* 2006; Pinho-ribeiro *et al.,* 2017). Prostaglandinas e aminas simpáticas, mediadores finais do processo inflamatório, interagem com receptores de tirosina quinase (RTK) e receptores acoplados à proteína G (GPCR) gerando uma cascata de sinalização (Verri *et al.,* 2006; Maximiano *et al.,* 2024). A ativação de vias de sinalização com subsequente ativação de segundos mensageiros, como as proteínas quinase A (PKA) e C (PKC), levam à fosforilação e subsequente ativação de canais de sódio voltagem dependente (Nav [Nav 1.9, Nav1.8 e Nav1.7]) e ligante dependente (receptor de potencial transiente vanilóide 1 [TRPV1], receptor de potencial transitório anquirina 1 [TRPA1], e receptor de potencial transiente melastatin 3 [TRPM3]), e a inibição de canais de potássio voltagem dependentes (Verri *et al.,* 2006; Mickle *et al.,* 2015;

Maximiano *et al.,* 2024). Como resultado, o maior aporte de cátions no meio intracelular de neurônios nociceptivos leva ao aumento da excitabilidade da membrana neuronal.

TRPV1 é um canal catiônico não específico que possui preferência por íons Ca2+. Este canal pode ser ativado por substâncias vanilóides como a capsaicina, componente pungente presente na pimenta, assim como por calor nocivo e prótons (Maximiano *et al.,* 2024). TRPV1 é altamente expresso em fibras nervosas sensoriais amielínicas do tipo C e, em menor proporção, fibras nervosas sensoriais mielínicas do tipo Aδ (Cavanaugh *et al.,* 2011). Em fibras nervosas de neurônios nociceptivos periférricos, TRPV1 é predominantemente, mas não exclusivamente, expresso em fibras peptidérgicas (Hwang *et al.,* 2005; Cavanaugh *et al.,* 2011). Usando camundongos TRPV1 Cre que foram cruzados com camundongos Rosa26 lox-STOP-lox DTA para criar camundongos TRPV1creDTA, Rogoz *et al.* (2014) observaram que os neurônios TRPV1+ correspondem a aproximadamente metade da população de neurônios aferentes primários, e que neurônios TRPV1+ correspondem a aproximadamente 80% da população de neurônios nociceptivos periféricos (Cavanaugh *et al.,* 2011; Rogoz *et al.,* 2014; Maximiano *et al.,* 2024). A ativação desse canal contribui para a hiperalgesia térmica induzida por calor (Maximiano *et al.,* 2024).

TRPA1, assim como TRPV1, é um canal catiônico não específico que possui preferência por íons Ca2+. Este canal pode ser ativado por substâncias derivadas de plantas como isotiocianato de alila, componente pungente da mostarda e wasabi, assim como nicotina, por frio e calor nocivos, e prótons (Hoffmann *et al.,* 2013; Kobayashi *et al.,* 2015; Vandewauw *et al.,* 2018; Araújo *et al.,* 2020). É expresso principalmente em fibras nervosas sensoriais amielínicas do tipo C e, em menor proporção, em fibras nervosas sensoriais mielínicas do tipo Aδ (Araújo *et al.,* 2020). Em fibras nervosas

sensoriais de neurônios nociceptivos periféricos, TRPA1 é co-expresso com TRPV1, correspondendo a aproximadamente a 50% da população de neurônios nociceptivos TRPV1+, e raramente é expresso sem TRPV1 (Kobayashi *et al.,* 2015). TRPA1 é expresso em menor proporção em fibras peptidérgicas e em maior proporção, cerca 70%, em fibras não peptidérgicas (Barabas *et al.,* 2012; Mickle *et al.,* 2015). A ativação desse canal contribui para a hiperalgesia mecânica e hiperalgesia térmica induzida pelo calor e frio (Araújo *et al.,* 2020).

Muitos dos mediadores que promovem a produção de prostanóides e aminas simpáticas, como as citocinas, podem levar a sensibilização dos nociceptores de forma direta ao se ligar a seus respectivos GPCRs e RTK expressos na membrana neuronal dos neurônios nociceptivos ativando diversos canais, incluindo TRPV1 e TRPA1 (Verri *et al.,* 2006; Pinho-Ribeiro *et al.,* 2017). Em essência, a ativação de canais TRPV1 e TRPA1 leva ao disparo de potenciais de ação e a liberação de neuropeptídeos, como glutamato, CGRP, SP e prostanóides, por neurônios nociceptivos periféricos. Os neuropeptídeos liberados então interagem com células neuronais e não neuronais, estabelecendo um quadro inflamatório. Esse processo é conhecido como inflamação neurogênica (Maximiano *et al.,* 2024).

A despolarização de neurônios nociceptivos periféricos induz a liberação de neuropeptídeos não somente no corno dorsal da medula espinhal, mas também promove um sinal antidrômico com a liberação de neuropeptídeos na periferia (Liddle, 2007). SP e CGRP são particularmente importantes para a indução da vasodilatação, edema e infiltração de leucócitos no foco inflamatório (Liddle, 2007). SP liberada na periferia se liga ao receptor de neurocinina 1 (NK1R) em células endoteliais e células epiteliais promovendo extravasamento de plasma e edema (Liddle, 2007). Em concordância, o uso de antagonistas de NK1R foi capaz de prevenir extravasamento de

plasma no trato gastrointestinal e pâncreas (Figini *et al.,* 1997; Grady *et al.,* 2000). CGRP, neuropeptídeo comumente co-expresso com SP, também têm ação importante no sistema vascular ao interagir com seu receptor, CGRP1, em células musculares lisas (Fernandes *et al.,* 2009).

Também vale ressaltar que muitas das citocinas ditas anti- inflamatórias podem ser liberadas de forma concomitante às citocinas ditas pró- inflamatórias, possivelmente em uma tentativa de controle para limitar possível dano tecidual (Verri *et al.,* 2006). Portanto, o conjunto de mediadores produzidos e liberados em resposta ao estímulo inflamatório irão atuar, sinergicamente, na sensibilização de neurônios nociceptivos por meio da modulação de vias de sinalização específicas que irão, em última instância, levar à ativação de canais presentes na membrana de neurônios nociceptivos levando a aumento de excitabilidade neuronal e facilitação da geração de potenciais de ação.

A histamina, mediador produzido principalmente por mastócitos, promove a sensibilização de nociceptores ao se ligar aos seus receptores H1 e H2 (Qiu *et al.,* 2012). Ao interagir com esses receptores, a histamina promove o aumento da expressão de canais Nav1.8 promovendo aumento da hiperalgesia mecânica e térmica (Qiu *et al.,* 2012). Além do mais, ERO podem sensibilizar nociceptores pela indução de cicloxigenases do tipo 1 (COX-1) e tipo 2 (COX-2) e pela ativação de canais TRPV1 (Salvemini *et al.,* 2011). As citocinas TNF-ὰ, IL-1β e interleucina 6 (IL- 6) também promovem nocicepção. A IL-1β é capaz de sensibilizar nociceptores via p.38 MAPK com subsequente fosforilação de canais Nav1.8 resultando em hiperalgesia mecânica e térmica (Binshtok *et al.,* 2008). A IL-1β também estimula a expressão de COX-2 promovendo a liberação de seus produtos, como as prostaglandinas que, em última instância, sensibilizam os

nociceptores (Verri *et al.,* 2006). A TNF-ὰ, ao interagir com seu receptor, promove a sensibilização direta dos nociceptores via p38 MAPK com subsequente fosforilação de canais Na+ (TTX-R) resistentes (Jin; Gereau, 2006). A TNF-ὰ também promove sensibilização dos nociceptores devido a produção de prostanóides e aminas simpáticas (Verri et al., 2006). A TNF-ὰ também promove a produção de IL-1β (Verri *et al.,* 2006). A IL-6, ao interagir com receptores gp130, promove a sensibilização direta de nociceptores. Também foi observado que a IL-6 promove aumento da expressão de TRPV1 e TRPA1, contribuindo para a nocicepção (Fang *et al.,* 2015; Malsch *et al.,* 2014). Além de que, a IL-6 também promove a produção de prostanóides (Fang *et al.,* 2015; Malsch*et al.,* 2014).

Em DRGs, os nociceptores, neurônios pré-sinápticos que expressam fibras peptidérgicas, projetam suas fibras em neurônios de segunda ordem, pós sinápticos, no corno dorsal da medula espinal (Foster *et al.,* 2015). Estímulos periféricos são reconhecidos por nociceptores na periferia que, em resposta, promovem a liberação de glutamato em neurônios de lâmina I e IIo, parte externa da lâmina II, no corno dorsal da medula espinal (Yang *et al.,* 1998; Purkiss *et al.,* 2000; Baccei *et al.,* 2003). Lâmina IIo interneurônios então, fazem sinapse com neurônios de projeção da lâmina I, principalmente pela liberação de SP, que projetam suas fibraspara os centros superiores do SNC (Zheng *et al.,* 2010; Todd *et al.,* 2010; Purkiss *et al.,* 2000). Curiosamente, nociceptores, neurônios pré-sinápticos não-peptidérgicos, promovem a liberação de glutamato em neurônios IIi, parte interna da lâmina II, no corno dorsal da medula espinhal (Barabas *et al.,* 2012). Projeções de neurônios nociceptivos não peptidérgicos em lâmina IIi estão intimamente relacionadas à hiperalgesia mecânica (Cavanaugh *et al.,* 2009).

Mediadores produzidos por células da glia presentes na medula espinal também contribuem no

processamento do estímulo nociceptivo periférico. Células da glia presentes no SNC são divididas em três tipos: microglia, astrócitos, e oligodendrócitos (Ji *et al.,* 2013). A microglia ativada em resposta a um estímulo nociceptivo periférico promove a ativação de astrócitos e oligodendrócitos. Em conjunto, essas células contribuem para o processamento nociceptivo por meio da liberação de mediadores. Por exemplo, TNF-ὰ e IL-1β produzidas pelas células da glia aumentam as correntes de neurônios de lâmina I e II, ao qual foi associado com o aumento da liberação de glutamato por nociceptores em neurônios de lâmina II (Kawasaki *et al.,* 2008; Gruber-Schoffnegger *et al.,* 2013). TNF-ὰ e IL-β também contribuem para o aumento de potenciais de ação em neurônios pós-sinápticos no corno da raiz dorsal via ácido alfa amino-3-hidroxi-5-metil isoxazol-4-propiônico de receptores ionotrópicos de glutamato (AMPARs) e receptores N-metil-d-aspartato (NMDARs) (Kawasaki *et al.,* 2008; Choi et al., 2010). IL-1β promove a fosforilação de NMDAR no núcleo trigeminal, contribuindo para o processo nociceptivo (Guo *et al.,* 2007). Além do mais, IL-1β e IL-6 são capazes de inibir correntes de neurônios inibitórios via receptores de ácido gama-aminobutírico (GABA) e glicina, promovendo excitação neuronal (Kawasaki *et al.,* 2008). Ademais, infiltrados de células T na medula espinal contribuem para a sensibilização central, especialmente em fêmeas (Sorge *et al.,* 2015; Taves *et al.,* 2016).

Uma vez propagado o estímulo doloroso para os centros superiores do SNC, incluindo regiões corticais como a ínsula, córtices pré-frontal e cingulado, bem como o córtex somatossensorial, e regiões não corticais como amígdala, hipotálamo e hipocampo, estruturas responsáveis pelo processamento da mensagem nociceptiva ascendente, projeções neuronais são feitas a partir dessas regiões em direção ao tronco encefálico, especialmente para a substância cinzenta

periaquedutal (PAG) e medula ventromedial rostral (RVM) e locus coeruleus (LC) do mesencéfalo. Neurônios presentes no PAG projetam suas fibras na RVM e LC. LC projetam suas fibras para RVM e vise versa, e ambos, LC e RVM, projetam suas fibras para a medula espinhal, promovendo modulação da resposta nociceptiva (Heinricher *et al.,* 2009). Projeções que partem do núcleo reticular dorsal lateral e caudal (DRt) e medula ventrolateral (VLM) do bulbo também contribuem para modulação da resposta nociceptiva (Heinricher *et al.,* 2009). Projeções neuronais a partir de estruturas presentes no tronco encefálico podem ser tanto inibitórias quanto excitatórias, e participam de várias vias no controle descendente da dor (Bannister; Dickenson, 2017). Neurotransmissores pertencentes à família das monoaminas, incluindo noradrenalina (NA) e serotonina (5-hidroxitriptamina ou 5-HT), são a principal classe de neurotransmissores relacionados a modulação descendente da dor (Bannister; Dickenson, 2017). GABA e opióides endógenos, incluindo peptídeos da família das β- endorfina, encefalinas, dinorfinas e nociceptina/orfanina FQ, também têm demonstrado exercer controle importante (Corder *et al.,* 2018).

Neurônios noradrenérgicos projetam suas fibras no corno dorsal da medula espinhal e tem como principal origem o LC localizado no assoalho lateral do quarto ventrículo (Bannister; Dickenson, 2017). Projeções de neurônios noradrenérgicos atuando sobre neurônios nociceptivos periféricos que expressam adrenoceptores do tipo ƛ-2 são as principais responsáveis pelo mecanismo de analgesia descendente promovido pela NA, promovendo redução da liberação de glutamato por esses nociceptores (Ossipov *et al.,* 2010). A ativação de adrenoceptores ƛ-1 em interneurônios GABAérgicos e inibição em interneurônios excitatórios na lâmina II do corno da raiz dorsal da medula espinhal também pode contribuir para os mecanismos antinociceptivos exercidos pelos

neurônios noradrenérgicos (Gassner *et al.,* 2009).

Neurônios serotoninérgicos projetam suas fibras para no corno dorsal da medula espinhal e tem sua origem na RVM e ponte caudal (Bannister; Dickenson, 2017; Bardoni, 2019). Em contraste, projeções de neurônios serotoninérgicos podem aumentar a propagação de estímulos nociceptivos ao interagir com receptores 5-HT2, 5-HT3 e 5-HT7 presentes em DRGs, promovendo a despolarização destes neurônios (Bannister; Dickenson, 2017; Bardoni, 2019). Além disso, receptores 5-HT1 expressos em DRGs podem promover inibição da propagação de estímulos nociceptivos ao promover a abertura de canais de potássio causando hiperpolarização destes neurônios (Bardoni, 2019). No corno da raiz dorsal, em neurônios pós-sinápticos, receptores 5-HT1A podem promover inibição da propagação de estímulos nociceptivos em neurônios excitatórios da medula espinhal, causando sua hiperpolarização (Bardoni, 2019). Em controvérsia, receptores 5-HT3 podem promover a despolarização de interneurônios inibitórios promovendo a liberação de GABA e glicina, ocasionando na inibição da propagação do estímulo nociceptivo (Bardoni, 2019). Portanto, o papel da serotonina como neurotransmissor excitatório e inibitório continua enigmático e contraditório. É possível que diferenças na expressão de receptores de serotonina em diferentes estruturas e subtipos celulares possa determinar seu papel na facilitação ou inibição da propagação de estímulos nociceptivos, no entanto, isso ainda precisa ser estabelecido.

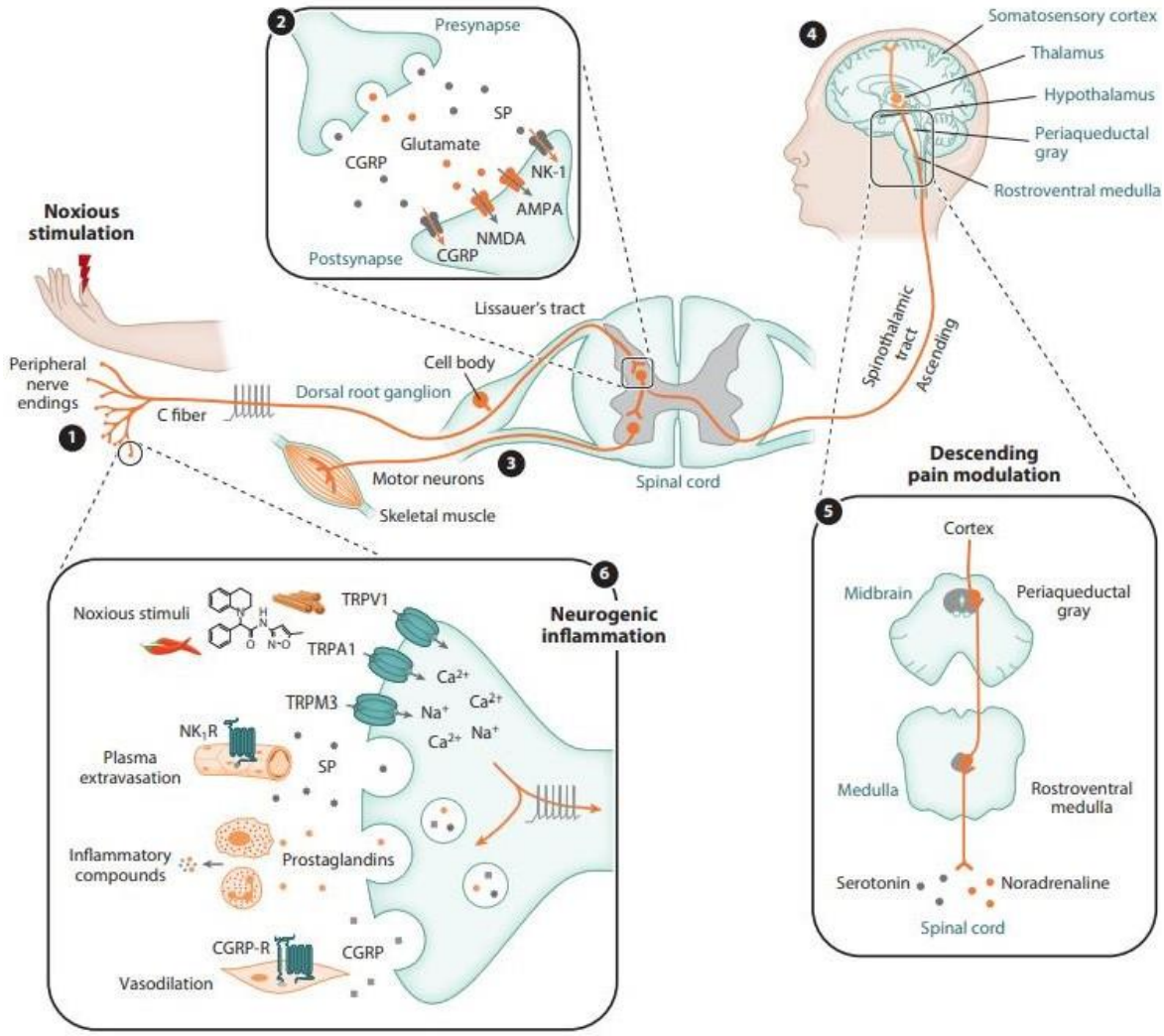
Há duas populações de neurônios GABAérgicos do RVM e que projetam suas fibras na medula espinhal e promovem a modulação da resposta nociceptiva; neurônios GABAérgicos que co-expressam pré proencefalina (Penk) e que projetam suas fibras diretamente nas regiões terminais de neurônios nociceptivos no corno dorsal da medula espinhal e promovem efeito analgésico, correspondendo as células off, e

neurônios GABAérgicos que co-expressam receptores opióide mu (MORs) e projetam suas fibras em interneurônios GABAérgicos e encefalinérgicos no corno dorsal da medula espinhal, correspondendo as células on (François et al., 2017; Corder et al., 2018). A inibição dos interneurônios GABAérgicos e encefalinérgicos, neurônios inibitórios da lâmina IIi e III, no corno dorsal da medula espinhal promovem a desinibição de neurônios nociceptivos facilitando a hiperalgesia mecânica (François et al., 2017; Corder et al., 2018).

Fibras contendo opióides endógenos, como encefalinas e β- endorfinas, são encontradas em várias estruturas do SNC, incluindo o núcleo arqueado do hipotálamo, amígdala, e núcleo do trato solitário do bulbo, e são projetadas para PAG e RVM (Corder et al., 2018; Bagley; Ingram, 2020). Além de que, opióides endógenos podem ser produzidos por células imunes, tendo um efeito difuso ao interagir com com seus respectivos receptores em neurônios nociceptivos periféricos promovendo sua hiperpolarização (Corder et al., 2018). Agonistas dos receptores opióide delta (DORs) e MORs em DRGs promovem redução da nocicepção, e agonistas de MORs podem reduzir a facilitação da dor promovida por células on enquanto que agonistas de MOR, DOR, e receptores opióide kappa (KOR) podem ativar células off do RVM promovendo analgesia (Vanderah, 2010; François et al., 2017).

Portanto, a modulação da resposta nociceptiva depende de diversos fatores que incluem a modulação da resposta no SNP e SNC.

Figura 2 – Modulação periférica, central e mecanismos descendentes de controle danocicepção



Fonte: Imagem de Bamps *et al.,* 2021

1.2 CARRAGENINA

A carragenina é um polissacarídeo sulfatado derivado de algas marinhas vermelhas, principalmente as do gênero Chondrus, Eucheuma, Gigartina e Iridaea, que apresenta três isoformas principais: iota (ι), kappa (κ) e lambda (λ), sendo lambda a isoforma mais sulfatada (Mendis *et al.,* 2022; Chavda *et al.,* 2024). Cada isoforma deste polissacarídeo apresenta suas propriedades físico-químicas e fisiopatológicas próprias (Abad *et al.,* 2013). A carragenina,

isoforma do tipo lambda, é capaz de induzir a produção de diversos mediadores pró-inflamatórios e promover migração de leucócitos, principalmente neutrófilos, gerando uma resposta inflamatória aguda característica (Zarpelon *et al.,* 2013; Zucoloto *et al.,* 2017; Fattori *et al.,* 2019). Mediadores pró-inflamatórios produzidos e liberados em resposta ao estímulo de carragenina podem resultar na ativação direta e indireta dos nociceptores.

Em sua forma íntegra, i-carragenina, > 100 kDa, e degradada, d- carragenina, 10-40 kDa, metabólito mais potente que a i-carragenina, promovem a produção de diversas citocinas via TLR4/fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88)/linfoma de células B/ leucemia 10 (Bcl10)/NF-kB e TLR4/ERK/proteína ativadora 1 (AP-1) (Tobacman, 2001; Tsuji *et al.,* 2003; Bhattacharyya *et al.,* 2008; Chen *et al.,* 2014). i-carragenina e d-carragenina via TLR4 e CD14 expressos em macrófagos induzem a translocação de NF-κB do citoplasma para o núcleo mediante a fosforilação de I kappa B alfa (IκBα) e a translocação de AP-1 do citoplasma para o núcleo via ERK (Tobacman, 2001; Chen *et al.,* 2014). i-carragenina e d-carragenina também promovem aumento da expressão de Bcl10, um ativador do NF-κB, por meio da ligação do NF-kB a região promotora de Bcl10, promovendo um loop envolvendo NF-κB e Bcl10 (Bhattacharyya *et al.,* 2008; Borthakur *et al.,* 2012; Chen *et al.,* 2014). Também foi observado aumento de expressão de TLR4 em resposta a i-carragenina e d-carragenina (Chen *et al.,* 2014; Bhattacharyya *et al.,* 2008). A ativação de ambas as vias, TLR4/MyD88/Bcl10/NF-κB e TLR/ERK/AP-1, induzem a produção de TNF-α, citocina chave na promoção da nocicepção induzida pela carragenina (Tsuji *et al.,* 2003; Bhattacharyya *et al.,* 2008; Chen *et al.,* 2014).

A interleucina 33 (IL-33), citocina pertencente à família IL-1, promove a produção de diversas citocinas por meio do complexo receptor do supressor solúvel de tumorigenicidade

2 (ST2)/IL-1 RAcP em resposta ao estímulo de carragenina (Zarpelon *et al.,* 2013). Zarpelon *et al.* (2013) demonstraram haver uma promoção da produção de TNF-ὰ, citocina derivada de queratinócitos (KC)/CXCL1, análoga da interleucina 8 (IL-8) humana, e IL-1β em resposta ao estímulo de carragenina, no entanto, houve uma redução significativa da produção dessas citocinas em camundongos knockout para o receptor ST2 (ST2 -/-), indicando uma possível contribuição da IL-33 na produção/liberação dessas citocinas em resposta ao estímulo de carragenina. Além disso, a administração de IL-33 no tecido sub plantar de camundongos Balb foi capaz de induzir hiperalgesia mecânica de forma semelhante a carragenina, com o mesmo não podendo ser observado em camundongos Balb ST2 -/- (Zarpelon *et al.,* 2013). Também foi observado redução significativa da hiperalgesia mecânica em camundongos Balb previamente tratados, separadamente, com IL-1ra, antagonista do receptor IL-1, indometacina, um inibidor da ciclooxigenase, anticorpos anti-TNF-ὰ e anti- KC/CXCL1 após a administração de IL-33 no tecido subplantar (Zarpelon *et al.,* 2013). Aliás, receptores ST2 são expressos em neurônios do DRG de médio e pequeno diâmetro, incluindo neurônios do DRG que inervam a pele de camundongos, e que também expressavam TRPV1 (Liu *et al.,* 2016). Em concordância, a IL-33 foi capaz de promover aumento do influxo de Ca2+ em neurônios do DRG que também são responsivos a capsaicina e óleo de mostarda, agonistas dos receptores TRPV1 e TRPA1, respectivamente (Liu *et al.,* 2016). AMG9810 e HC-030031, antagonistas dos receptores TRPV1 e TRPA1, respectivamente, também promoveram redução significativa do influxo de Ca2+ em resposta a IL-33 (Liu *et al.,* 2016).

A endotelina-1 (ET-1) também é capaz de induzir hiperalgesia mecânica após interação com seus receptores, endotelina do tipo A (ETA) e do tipo B (ETB) em

resposta ao estímulo de carragenina (Baamonde *et al.,* 2004). Em concordância, a administração de clazosentan e BQ 788, antagonistas dos receptores ETA e ETB, respectivamente, foram capazes de reduzir significativamente a hiperalgesia mecânica em camundongos Balb após a administração de IL-33 no tecido subplantar (Zarpelon *et al.,* 2013). Esses resultados indicam uma possível contribuição da IL-33 na promoção da nocicepção mediada pela ET-1. De fato, a carragenina foi capaz de promover o aumento da expressão da pré-forma de ET-1, no entanto, o mesmo não pode ser observado em camundongos Balb ST2 -/- (Zarpelon *et al.,* 2013). Também foi observado aumento das concentrações de ET-1 em ratos que receberam estímulo subplantar de carragenina (Bertelli *et al.,* 1992). Além de que, a ET-1 é capaz de ativar diretamente células de cultura semelhante a neurônios e nociceptores pertencentes a ratos (Gokin *et al.,* 2001; Zhou *et al.,* 2001). Piovezan *et al.* (1998) também demonstraram que a ET-1 é capaz de potencializar o efeito nociceptivo induzido por capsaicina em camundongos. Portanto, a ET-1 auxilia na promoção da nocicepção por meio da sensibilização de canais de cálcio, como o TRPV1, e a IL-33 produzida em resposta ao estímulo de carragenina está envolvida na nocicepção induzida por ET-1, TNF-α e KC/CXCL1.

Em concordância, Cunha *et al.* (2005) demonstraram redução parcial da dor induzida pela carragenina em camundongos C57BL/6 knockout para o receptor de TNF-α (TNF-R1 -/-). Foi observado que em camundongos C57BL/6 previamente tratados com anticorpos anti- KC/CXCL1, IL-1ra, indometacina, e guanetidina, um agente neuro-bloqueador simpaticomimético, houve redução parcial da dor quando administrados individualmente, no entanto, a indometacina e guanetidina, quando previamente administradas em concomitância, promoveram uma redução total da dor induzida

pela carragenina (Cunha *et al.,* 2005). Esses dados podem indicar que a carragenina promove a nocicepção por meio da produção de prostanóides e aminas simpáticas.

A KC/CXCL1, quimiocina pertencente à família CXC, é capaz de se ligar aos receptores CXC do tipo 1 (CXCR1) e tipo 2 (CXCR2), possuindo maior afinidade por CXCR2 (Zlotnik; Yoshie, 2000). DF2755A e DF 2162, inibidores alostéricos dos receptores do subtipo CXC (CXCR1 e CXCR2), foi capaz de reduzir a dor promovida pelo estímulo subplantar de carragenina em camundongos C57BL/6 (Cunha *et al.,* 2008; Lopes *et al.,* 2016). Também foi demonstrado que esses inibidores foram capazes de reduzir a hiperalgesia mecânica após estímulo subplantar de KC/CXCL1 em camundongos (Cunha *et al.,* 2008; Lopes *et al.,* 2016). Ademais, o inibidor DF2755A promoveu redução significativa da IL-β em camundongos C57BL/6 em resposta ao estímulo subplantar de carragenina enquanto os níveis de KC/CXCL1, TNF-ᵰ e IL-6 permaneceram inalterados (Lopes *et al.,* 2016). KC/CXCL1 também é capaz de induzir aumento do Ca2+ e Na2+ intracelular em neurônios do DRG derivados de ratos Sprague Dawley com subsequente liberação de CGRP *in vitro*, possivelmente pelas vias PKA e fosfolipase C (PLC)/PKC, com ativação de canais TRPV1 e Nav (Qin *et al.,* 2005; Dong *et al.,* 2012). KC/CXCL1 produzida por astrócitos presentes na medula espinhal também atua em neurônios da lâmina II levando a potencialização da transmissão excitatória por meio do aumento da atividade de receptores NMDA via CXCR2 (Cao *et al.,* 2014). Também foi observado que a administração intratecal de CXCL1/KC induz a produção da COX-2 via CXCR2/ERK no corno dorsal da medula espinal (Cao *et al.,* 2014). Esses resultados podem indicar participação da KC/CXCL1 na sensibilização periférica e central visto que foi demonstrado aumento da expressão de CXCR2 na medula espinal após estímulo inflamatório periférico (Cao *et al.,* 2014).

Interessantemente, foi observada promoção da produção/liberação de KC/CXCL1 e IL-1β após a administração de TNF-ὰ no tecido sub plantar de camundongos C57BL/6, no entanto, camundongos TNF-R1 -/- sofreram uma redução significativa na produção de IL-1β em resposta ao estímulo de carragenina enquanto a produção de KC/CXCL1 não foi afetada (Cunha *et al.,* 2005). Esses resultados podem sugerir que a TNF-ὰ produzida em resposta ao estímulo de carragenina promove a produção de KC/CXCL1 de forma independente e IL-1β de forma dependente do receptor de TNF-ὰ. Em concordância com esses resultados, a administração de TNF-ὰ no tecido sub plantar de camundongos TNF-R1 -/- promoveu redução significativa na dor induzida nesses animais, no entanto, houve redução significativa na dor promovida pelo TNF-ὰ em camundongos C57BL/6 que foram previamente tratados com IL-1ra e indometacina (Cunha *et al.,* 2005). Portanto, TNF-ὰ atua por meio da ativação do seu receptor, TNF-R1, para promover a produção/liberação de IL-1β que, por sua vez, leva a produção de prostanóides.

A IL-1β, citocina pertencente à família IL-1, é capaz de promover a nocicepção induzida pela carragenina por meio de mecanismos distintos. Um dos mecanismos pelo qual a IL-1β induz a sensibilização de nociceptores é por meio da interação direta da citocina com seu receptor, IL 1 (IL 1R), presente na membrana plasmática desses neurônios, e por meio da produção de prostanóides pelas demais células presentes no foco inflamatório (Cunha *et al.,* 2005; Malik *et al.,* 2021). Foi demonstrada uma redução significativa na dor promovida pela administração de IL-1β no tecido sub plantar de camundongos C57BL/6 previamente tratados com indometacina. Também foi observada redução significativa na dor promovida pelo KC quando estes foram previamente tratados com IL-1ra, indometacina e guanetidina (Cunha *et al.,* 2005).

Portanto, KC/CXCL1 está envolvida na produção/liberação de IL-1β, prostanóides e aminas simpáticas. Além disso, a estimulação periférica induzida pelo estímulo subplantar de carragenina promove aumento de produção de IL-1β na medula espinal de camundongos Balb-c (Fattori *et al.,* 2019; Malik *et al.,* 2021). Esses resultados indicam que o estímulo periférico de carragenina também pode promover nocicepção por meio da modulação do SNC, seja por meio da interação com seu receptor, IL 1R, em nociceptores e subsequente liberação de neuropeptídeos ou modulação de células não neuronais como células da glia, leucócitos infiltrados e células endoteliais (Liu *et al.,* 2015; Sung *et al.,* 2017).

Vale ressaltar que para a produção/liberação da IL-1β são necessárias duas etapas: pela promoção da expressão de sua pré-forma, pró-IL-1β, e pela maturação dessa citocina em sua forma ativa, IL-1β. Lopes *et al.* (2015) demonstraram que a maturação de IL-1β em resposta ao estímulo subplantar de carragenina ocorre por meio da via canônica, via caspase-1, pela formação do complexo inflamassoma NLRC4 em camundongos. Houve redução significativa na hiperalgesia mecânica em camundongos C57/BL6 Casp1/11 -/- que tiveram sua caspase-11 introduzida transgenicamente para se tornar animais knockout para caspase-1 (Casp1 -/-/Tg Casp11) em resposta ao estímulo subplantar de carragenina, no entanto, não houve alteração da hiperalgesia mecânica em camundongos knockout para caspase-11 (Casp11 -/-) (Lopes *et al.,* 2015). Também não houve alteração da hiperalgesia mecânica e térmica em camundongos C57/BL6 knockout para NLRP3 (NLRP3 -/-) em resposta ao estímulo subplantar de carragenina enquanto houve redução significativa em camundongos C57/BL6 knockout para NLRC4 (NLRC4 -/-) (Lopes *et al.,* 2015).

A IL-6 também tem papel na nocicepção promovida pela carragenina. Em camundongos C57BL/6

knockout para IL-6 (IL-6 -/-), houve aumento da hiperalgesia mecânica e térmica em resposta ao estímulo subplantar de carragenina (Xu *et al.,* 1997). Esse efeito hiperalgésico pode ser explicado pela produção compensatória de citocinas, como a TNF-α, visto que a administração de IL-6 no tecido subplantar de ratos e camundongos promove efeito nociceptivo (Cunha *et al.,* 1992; Cunha et al., 2005). De fato, foi demonstrado produção três vezes maior de TNF-α em modelo de peritonite induzido por lipopolissacarídeo (LPS) em camundongos IL-6 -/- (Fattori *et al.,* 1994). Se o mesmo ocorre em modelos de dor e inflamação induzidos por carragenina, ainda precisa ser determinado. Em concordância, Cunha et al. (1992) demonstraram que a administração de TNF-α no tecido subplantar de ratos Wistar induz a produção/liberação de IL-1β, IL-6 e IL-8. Também foi observada redução na dor de ratos tratados individualmente com soro anti-IL-6, anti-TNF-α, anti-IL-1β e anti-IL-8 em resposta ao estímulo de carragenina (Cunha et al., 1992). Em concordância, foi demonstrada redução na dor promovida pela administração de IL-6 no tecido sub plantar em camundongos C57BL/6 previamente tratados com indometacina (Cunha et al., 2005). Portanto, a TNF-α induz a produção de IL-6 que, por sua vez, induz a produção de prostanóides.

Os receptores B2 são constitutivamente expressos em condições de repouso, enquanto os receptores B1 são praticamente inexistentes nessas condições (Siebeck *et al.,* 1998; Couture *et al.,* 2001; Prado *et al.,* 2002). No entanto, em decorrência do processo inflamatório, há ativação de receptores B2, principalmente pela bradicinina, com subsequente dessensibilização e internalização desse receptor enquanto os receptores B1 se tornam altamente expressos (Regoli *et al.,* 1993; Moreau *et al.,* 2005). Em concordância, Cunha *et al.* (2007) demonstraram haver aumento da hiperalgesia mecânica mediada por receptores B1 com declínio

de receptores B2 em tempos mais tardios, 7 horas, após o estímulo de carragenina em camundongos C57BL/6. Foi observado que a administração de bradicinina promove a liberação direta de prostanóides e aminas simpáticas em camundongos C57BL/6 (Cunha *et al.*, 2005; Cunha *et al.,* 2007). A administração prévia de IL-1ra e anticorpos anti-KC/CXCL1 não foram capazes de reduzir a dor promovida pela administração subplantar de bradicinina em camundongos C57BL/6 (Cunha *et al.,* 2007). Também não houve diferença da nocicepção em camundongos C57BL/6 TNFR1 -/- após estímulo subplantar de bradicinina (Cunha *et al.,* 2007).

Em concordância, a administração de D-Arg-Hyp e D-Phe-bradicinina, antagonistas do receptor B2, foram capazes de reduzir a dor promovida pelo estímulo subplantar de carragenina em camundongos C57BL/6, no entanto, não houve interferência na liberação de TNF-ά, IL-1β e KC/CXCL1 nesses camundongos (Cunha et al., 2007). A administração subplantar de bradicinina também foi incapaz de induzir a produção dessas citocinas em camundongos C57BL/6 (Cunha et al., 2007). Portanto, a nocicepção induzida pela bradicinina, com ativação dos receptores B2, é independente da produção de TNF-ά, IL-1β e KC/CXCL1 em camundongos. Interessantemente, após indução da expressão de receptores B1, a administração prévia de DALBK, um antagonista do receptor B1, foi capaz de reduzir a dor promovida pela carragenina e bradicinina (Cunha et al., 2007). Também foi observada redução da produção de TNF-ά e IL-1β em camundongos C57BL/6 que sofreram indução da expressão de receptores B1 e que foram previamente tratados com DALBK após o estímulo subplantar de carragenina (Cunha et al., 2007). Portanto, a nocicepção induzida pela bradicinina, com ativação dos receptores B1, é dependente da produção de TNF-ά e IL-1β em camundongos. Portanto, a nocicepção induzida pela carragenina está ligada a produção de bradicinina

com subsequente ativação do seu receptor B2 e posterior ativação do seu receptor B1.

Corroborando com esses resultados, em ratos Wistar previamente tratados com Hoe 140, um antagonista do receptor B2, e DALBK, houve redução da dor promovida pela administração subplantar de carragenina (Ferreira et al., 1993; Poole et al., 1999). Em concordância, também foi demonstrado redução da nocicepção após administração subplantar da bradicinina em ratos Wistar previamente tratados com Hoe 140 e DALBK (Ferreira et al., 1993; Poole et al., 1999). Também foi demonstrado que a administração concomitante de DALBK e HOE 140 promovem redução total da hiperalgesia mecânica promovida pelo estímulo subplantar de bradicinina em um curto período de tempo, 3 horas, tendo efeito analgésico aditivo (Poole et al., 1999). Portanto, ambos receptores, B1 e B2, são responsáveis pela dor promovida pela bradicinina em ratos. Além do mais, tanto Hoe 140 quanto DALBK não promoveram alteração da nocicepção promovida pela administração subplantar de TNF-α, IL-6, PGE2 e IL-8 (Ferreira et al., 1993; Poole et al., 1999). Também foi observada redução completa na dor promovida pela bradicinina em animais previamente tratados com soro anti-TNF-α (Ferreira et al., 1993; Poole et al., 1999). Houve também redução parcial da dor em ratos previamente tratados com soro anti-IL-1β, IL-6 e IL-8, sendo que, em combinação, anti-IL-1β e IL-8 e IL-6 e IL-8 tiveram efeito analgésico aditivo (Ferreira et al., 1993). Portanto, o efeito nociceptivo promovido pela bradicinina é possivelmente TNF-α dependente em rato.

É importante ressaltar que a bradicinina tem maior afinidade por receptores B2 do que por receptores B1. Sendo assim, a ativação de receptores B2 pela bradicinina em um contexto inflamatório pode ter um papel fisiopatológico mais relevante, principalmente quando levado em consideração

estágios iniciais do processo inflamatório e baixas concentrações do estímulo indutor desse processo. Também foi demonstrado que os receptores B2 são expressos em neurônios derivados de ratos Sprague-Dawley de médio e pequeno diâmetro (Nagy et al., 1993; Shin et al., 2002). A bradicinina foi capaz de induzir influxo de cálcio em neurônios do DRG que também foram responsivos a capsaicina in vitro (Nagy et al., 1993). Em concordância, pré-incubação com Hoe 140 promoveu redução significativa do influxo de cátions para os neurônios do DRG enquanto a pré-incubação com des-Arg9-bradicinina, um agonista seletivo de B1, não promoveu alteração no influxo de cátions nessas células (Nagy et al., 1993). Portanto, a bradicinina, além de induzir a produção de prostanóides e aminas simpáticas promovendo a sensibilização de neurônios nociceptivos, também possui ação direta sobre essas células.

De fato, em ratos Sprague-Dawley, a bradicinina é capaz de promover a produção de PGE2 por meio da ativação da fosfolipase A2 (PLA2) (Taiwo *et al*., 1990). Além do que, foi demonstrado que a bradicinina promove a sensibilização e ativação de neurônios nociceptivos por meio da produção de 12-HPETE, um agonista endógeno semelhante à capsaicina, via 12-lipoxigenase por essas mesmas células, ativando canais TRPV1 (Shin *et al*., 2002). A bradicinina também promove a sensibilização de canais TRPV1 pela via PLC/PKC (Burgess *et al*., 1989; Gammon *et al.,* 1989; Chuang *et al.,* 2001). Portanto, a carragenina promove a sensibilização de nociceptores por meio da ativação direta induzida por algumas citocinas e também pela indução da produção/liberação de prostanóides e aminas simpáticas por células imunes e demais células presentes no foco inflamatório, que vão, em última instância, sinergicamente, promover a sensibilização dos nociceptores quando estes mediadores atuarem em seus respectivos receptores (Cunha *et al*., 2005; Zarpelon *etal.,* 2013).

Na periferia, a carragenina promove o recrutamento de leucócitos e liberação de moléculas nociceptivas por diversas células, incluindo mastócitos, macrófagos e neutrófilos. Mastócitos, macrófagos e neutrófilos ativados expressam o complexo receptor ST2/IL-1 RAcP (Xu *et al.,* 2008; Verri *et al.,* 2010). Uma vez liberada, IL-33 induz a migração de neutrófilos ao ativar mastócitos e macrófagos a produzir quimiocinas e citocinas que irão, em última instância, promover a ativação de neutrófilos, amplificando o processo inflamatório (Verri *et al*., 2010). Em mastócitos derivados da medula óssea de camundongos DBA/1, Xu *et al.* (2008) demonstraram uma maior produção de IL-6, IL-1β e IL-13 por essas células in vitro, no entanto, o mesmo não pode ser observado em mastócitos derivados de camundongos DBA/1 ST2 -/-. Em concordância, foi observado que a administração de IL-33 no tecido sub plantar de camundongos Balb é capaz de induzir formação de edema e aumento da atividade da mieloperoxidase de forma semelhante a carragenina (Zarpelon *et al.,* 2013). Além do mais, em camundongos Balb previamente tratados com fucoidina, um agente capaz de se ligar a selectina L e P impedindo o rolamento de leucócitos, houve redução da atividade da mieloperoxidase após a administração de IL-33 no tecido subplantar desses camundongos (Zarpelon *et al.,* 2013). Esses resultados demonstram a importância da IL-33 para expressão de fatores de adesão e migração de leucócitos, principalmente neutrófilos, acarretando em subsequente acúmulo de exsudato no foco inflamatório.

Interessantemente, os neutrófilos não são as principais células responsáveis pela produção de citocinas e quimiocinas liberadas em resposta ao estímulo de carragenina, no entanto, possuem papel essencial na nocicepção promovida por esse estímulo (Cunha *et al.*, 2008). Foi observado redução significativa na dor promovida pelo estímulo de carragenina em ratos Wistar que tiveram seus neutrófilos depletados (Ting *et al.,*

2008). Também foi demonstrado não haver alteração nos níveis de TNF-α, IL-1β e CXCL1 em ratos Wistar previamente tratados com fucoidina após estímulo de carragenina (Cunha *et al.,* 2008). Em contrapartida, essas células se mostraram relevantes na nocicepção induzida pela produção de prostanóides, como a PGE2, após estímulo subplantar com IL-1β (Cunha *et al.,* 2008). De fato, a administração de PGE2 no tecido subplantar de ratos Sprague-Dawley foi capaz de induzir nocicepção em animais que tiveram seus neutrófilos depletados, no entanto, o mesmo não pode ser observado para outros mediadores, como a bradicinina (Levine *et al.,* 1984). Portanto, a produção de prostanóides, como PGE2, é neutrófilo dependente, enquanto a produção de TNF-α, IL-1β e CXCL1 é proveniente de células residentes teciduais (Cunha *et al.*, 2008; Ting *et al.,* 2008).

C5a, anafilotoxina resultante da quebra de C5 do sistema complemento, se liga ao receptor C5aR1, e tem papel importante na nocicepção induzida pelo estímulo de carragenina, principalmente por neutrófilos (Ting *et al.,* 2008). PMX 53, antagonista seletivo de C5aR, foi capaz de reduzir a hiperalgesia mecânica promovida pelo estímulo subplantar de carragenina em ratos Wistar (Ting *et al.,* 2008). Também foi capaz de reduzir a hiperalgesia mecânica após estímulo subplantar com C5a (Ting *et al.,* 2008). Interessantemente, não houve alteração dos níveis de produção de TNF-α e IL-1β após o estímulo subplantar de carragenina em ratos tratados com PMX 53 (Ting *et al.,* 2008). A PMX 53 também foi incapaz de reduzir o recrutamento de neutrófilos em resposta ao estímulo subplantar de carragenina (Ting *et al.,* 2008). Portanto, os efeitos inibitórios da PMX 53 não estão relacionados com a inibição da produção de citocinas envolvidas na cascata de sinalização para produção de prostanóides e nem na interferência do recrutamento de neutrófilos em resposta ao estímulo de carragenina. No entanto, foi observada redução da

hiperalgesia mecânica em resposta ao estímulo subplantar de carragenina e C5a, respectivamente, em ratos Wistar que tiveram seus neutrófilos depletados (Ting *et al.,* 2008). Esses resultados indicam que o efeito nociceptivo promovido pela C5a é neutrófilo dependente. De fato, a PMX 53 foi capaz de inibir a liberação de MPO quando incubada na presença de C5a em neutrófilos humanos in vitro (MARCH *et al.,* 2004). Um dos mecanismos pelo qual neutrófilos promovem a eliminação de patógenos é por meio da formação de NETs, estrutura formada pelo material genético e grânulos citoplasmáticos dos neutrófilos (Barth *et al*., 2016; Wang *et al.,* 2024). Enzimas liberadas por grânulos citoplasmáticos, como MPO, são capazes de produzir ERO e, dessa forma, desestabilizar estruturas biológicas e ativar nociceptores (Salvemini *et al.,* 2011; Barth *et al.*, 2016). Portanto, pode ser que a C5a contribua para o estresse oxidativo promovido por neutrófilos em resposta ao estímulo de carragenina, promovendo nocicepção.

A carragenina promove peroxidação lipídica, como pode ser observado pelo ensaio de TBARS, produção de O2- e NO, depleção dos níveis de glutationa reduzida (GSH), e diminuição da capacidade antioxidante, como pode ser observado pelo ensaio com o radical livre de captura ácido 2,2'-Azinobis-3- etilbenzotiazolina 6-sulfônico (ABTS), 2,2-Difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), e da capacidade antioxidante redutora de ferro (FRAP) (Mizokami et al., 2016; Martinez et al., 2020; Malik et al., 2021). Em concordância com esses resultados, também foi observado diminuição dos níveis do Nrf2, fator de transcrição conhecido pela expressão de moléculas antioxidantes, e hemoxigenase-1 (HO-1) (Martinez et al., 2020). Ademais, houve aumento significativo da capacidade antioxidante e redução da peroxidação lipídica em camundongos Swiss previamente tratados com indometacina. Portanto, citocinas produzidas no processo inflamatório podem contribuir para a promoção do estresse oxidativo (Martinez et al., 2020).

Há o recrutamento de leucócitos, principalmente de neutrófilos, em um modelo de pleurite induzido pelo estímulo de carragenina em ratos Wistar (Allegra et al., 2014). Houve aumento da expressão das enzimas iNOS e Cox-2 assim como aumento da produção/liberação das mesmas em um modelo de pleurite induzido pelo estímulo de carragenina (Allegra et al., 2014). Também foi observado aumento da produção de nitrito, TNF-ȣ, IL-1β, PGE2 e houve aumento da atividade do NF-κB após pleurite induzida pelo estímulo de carragenina (Allegra et al., 2014).

A carragenina promove aumento da capacidade oxidante, como pode ser observado pelo depósito de malondialdeído (MDA), metabólito formado pela peroxidação lipídica, e diminuição da capacidade antioxidante pela diminuição das enzimas SOD, glutationa peroxidase (GPX) e catalase (CAT), importantes para o controle do estresse oxidativo (Mert *et al*., 2014). A MDA é formada e se acumula em decorrência do ataque de radicais livres à membrana plasmática de células presentes no foco inflamatório. A SOD promove a neutralização de radicais de superóxido ao convertê-los em peróxidos menos reativos que podem ser degradados pela reação da CAT (Mert *et al.,* 2014). Além disso, GPX ajuda na redução de peróxido de hidrogênio e outros hidroperóxidos orgânicos (Mert *et al.,* 2014). A carragenina também é capaz de promover a liberação de NETs, complexo formado pelo DNA, histonas e enzimas proteolíticas, como elastases e MPO, por neutrófilos viáveis (Barth *et al.,* 2016). Portanto, para o estudo dos efeitos analgésico, anti-inflamatório e antioxidante de drogas em potencial, a carragenina se mostra um modelo adequado por diversas vias de administração.

1.2.1 DIMORFISMO SEXUAL EM MODELO DE CARRAGENINA

Diferenças hormonais e nos sistemas neuromoduladores descendentes são os principais responsáveis por diferenças sexuais no processamento da dor (Ossipov *et al.,* 2010). De forma geral, as fêmeas são mais sensíveis à dor e possuem mecanismos analgésicos descendentes menos eficientes que machos tanto em estados de saúde quanto de doença (Staud *et al.,* 2003; Van Wijk *et al.,* 2010; Goodin *et al.,* 2015). Essa condição está estritamente relacionada a condições hormonais e expressão de receptores, tais como receptores responsivos a neurotransmissores excitatórios e inibitórios presentes em neurônios nociceptivos periféricos e neurônios nociceptivos na medula espinhal (Esposito et al., 2005; Vegeto *et al.,* 2010; Li *et al.,* 2010b; Chow *et al.,* 2016; Pace *et al.,* 2017). São três os principais sistemas neuromoduladores descendentes que participam da modulação e processamento de estímulos nociceptivos, que incluem os sistemas noradrenérgicos, serotoninérgicos e dopaminérgicos, que exercem suas ações por meio da projeção das suas fibras na medula espinal (Ossipov *et al.*, 2010).

Neste tópico será descrito como questões hormonais e neuromoduladoras são responsáveis por diferenças na percepção da dor no modelo de carragenina.

1.2.1.1 SISTEMA NORADRENÉRGICO

Noradrenalina é produzida principalmente pelo LC no SNC (Bannister; Dickenson, 2017). O sistema noradrenérgico tem papel importante na percepção de estímulos dolorosos, e a noradrenalina atua promovendo efeito analgésico ao interagir com receptores adrenérgicos em DRGs e neurônios do corno da raiz dorsal na medula espinhal (Ossipov *et al.,* 2010; Gassner *et al.,* 2009). Receptores adrenérgicos podem ser divididos em adrenoceptores do tipo alfa (ᾳ) e do tipo beta (β)

(Llorca-Torralba *et al.,* 2016).

A administração de clonidina, agonista de adrenoceptores α2, reduz o comportamento nociceptivo, coceira, em ratos machos, fêmeas que sofreram ovariectomia, e fêmeas na fase diestro estimulados por N-metil-d-aspartato (NMDA) e estímulo térmico na região trigeminal e medula espinhal, no entanto, não promove alteração em ratos fêmeas que sofreram ovariectomia e foram tratadas com benzoato de estradiol, e em ratos fêmeas durante a fase proestro (Nag; Mokha, 2006; Thompson *et al.,* 2008). Ioimbina, antagonista de adrenoceptores α2, quando previamente administrada a clonidina, foi capaz de eliminar o efeito antinociceptivo em ratos machos, fêmeas que sofreram ovariectomia e fêmeas durante a fase diestro (Nag; Mokha, 2006; Thompson *et al.,* 2008).

O efeito antinociceptivo da clonidina, no entanto, foi ausente em ratos machos que sofreram gonadectomia (Thompson *et al.,* 2008). Em concordância, a clonidina reduz a hiperalgesia térmica em ratos machos que sofreram gonadectomia e foram tratados com testosterona (Thompson *et al.,* 2008). Além do mais, não houve alteração da hiperalgesia térmica em ratos machos que sofreram gonadectomia e foram tratados com benzoato de estradiol (Thompson *et al.,* 2008). Portanto, a testosterona é necessária para o efeito antinociceptivo dos adrenoceptores α2A em machos e os estrógenos promovem a supressão dos efeitos antinociceptivos dos adrenoceptores α2A em fêmeas.

1.2.1.2 SISTEMA DOPAMINÉRGICO

A dopamina, neurotransmissor precursor da noradrenalina, é produzida majoritariamente por neurônios dopaminérgicos na área tegmental ventral (VTA) do mesencéfalo e atua por meio de dois subtipos de receptores;

receptores semelhantes a D1, que inclui receptores de dopamina D1 (D1R) e D5 (D5R), e receptores semelhantes a D2, que inclui receptores de dopamina D2 (D2R), D3 (D3R) e D4 (D4R) (Llorca-Torralba *et al.,* 2016; Puopolo *et al.,* 2019; Bagley; Ingram, 2020; Wang *et al.,* 2023). A ativação de receptores semelhantes a D1 desencadeia a propagação de estímulos excitatórios enquanto a ativação de receptores semelhantes a D2 leva a impulsos inibitórios em neurônios sensoriais periféricos e no SNC (Wang *et al.,* 2023).

Os D1Rs e D5Rs são expressos, principalmente, mas não exclusivamente, em neurônios IB4+ de pequeno diâmetro de DRGs derivados de camundongos C57BL6 machos e fêmeas. A expressão de D5R é mais acentuada em camundongos machos que em fêmeas, sendo que a expressão de D5R é ainda mais reduzida em neurônios IB4- de pequeno diâmetro, neurônios estes que são principalmente peptidérgicos. Já a expressão de D1R é semelhante em ambos os sexos. No corno da raiz dorsal, aproximadamente metade dos neurônios, interneurônios e neurônios de projeção, são inervados por neurônios TRPV1+, sendo muitos destes neurônios GABAérgicos presentes na lâmina I-III (Megat *et al.,* 2018). D5R e D1R são altamente expressos em neurônios de lâmina III do corno dorsal da medula espinhal, especialmente em machos (Megat *et al.,* 2018).

Megat et al. (2018) observaram que camundongos machos, por meio de D5R, e fêmeas, por meio de D1R, promovem modulação da dor na medula espinal por meio da interação com receptores D1R e D5R em DRGs e neurônios GABAérgicos no corno da raiz dorsal da medula espinhal. Foi demonstrado redução significativa da alodinia mecânica, hiperalgesia térmica e edema após administração subplantar de carragenina seguida do estímulo subplantar de PGE2 em camundongos machos D5R -/- (Megat et al., 2018). Nenhuma diferença significativa foi encontrada em camundongos C57BL6

fêmeas DRD5 -/- após administração subplantar de carragenina seguida do estímulo subplantar de PGE2 nesses mesmos parâmetros (Megat et al., 2018). Também foi observada redução significativa da alodinia mecânica em camundongos C57BL6 machos D5R -/- que receberam injeção intratecal de SKF 82958, um agonista do D1R, em camundongos previamente estimulados com IL-6, citocina produzida em decorrência do estímulo de carragenina (Megat et al., 2018). Tendo em vista redução dos parâmetros de dor em camundongos C57BL6 machos D5R -/- em relação a C57BL6 fêmeas D5R -/-, esses resultados indicam que camundongos machos têm preferência por D5R em relação a D1R em resposta ao estímulo de carragenina. Interessantemente, houve redução significativa da alodinia mecânica em camundongos C57BL6 fêmeas D5R -/- após administração subplantar de carragenina e que receberam injeção intratecal de SCH23390, um antagonista de D1R (Megat et al., 2018). Portanto, em camundongos C57BL6 fêmeas, há uma preferência pelo receptor D1R sobre o D5R em resposta ao estímulo de carragenina.

Usando o fator de transcrição c-fos como marcador de ativação neuronal, Megat *et al.* (2018) demonstraram que uma subpopulação de neurônios GABAérgicos em lâmina III inervados principalmente por neurônios TRPV1+ sofrem modulação em decorrência da interação da dopamina e de seus receptores, D1R e D5R, em DRGs e no corno da raiz dorsal da medula espinhal. A Injeção intratecal de gabazina, um antagonista dos receptores GABA-A (GABA-AR), promoveu redução significativa da alodinia mecânica após administração de SKF82958 em animais pré-estimulados, demonstrando uma relação entre a produção de dopamina e o sistema GABAérgico (Megat *et al.,* 2018). Esse efeito contra intuitivo, visto que GABA é clássico neurotransmissor inibitório amplamente conhecido e produzido por interneurônios GABAérgicos, pode ser explicado pela

expressão de neuroligina-2, um peptídeo inibitório que favorece sinapses GABAérgicas não convencionais, em camundongos pré-estimulados (Kim *et al.,* 2016; Megat *et al.,* 2018). De fato, foi demonstrado que a ativação de D1R induz a ativação e sensibilização de canais TRPV1 em DRGs de camundongos (Lee *et al.,* 2015; Chakraborty *et al.,* 2016).

Portanto, D5R em machos e D1R em fêmeas promovem dor por meio da ativação desses receptores em nociceptores e por meio da ativação de interneurônios GABAérgicos no corno da raiz dorsal que favorecem sinapses não convencionais em animais pré-estimulados com carragenina.

1.2.1.3 SISTEMA OCITOCINÉRGICO

A ocitocina (OT) é produzida no núcleo paraventricular (PVN), núcleo supra óptico (SON), e núcleo acessório (AN) do hipotálamo e é depositada na hipófise. Esses neurônios ocitocinérgicos também podem projetar suas fibras para amígdala, hipocampo, e várias regiões do córtex cerebral, incluindo córtices orbitofrontal, cingulado, insular e pré-frontal medial (mPFC), regiões do mesencéfalo, incluindo PAG, RVM e área tegmental ventral (VTA), e lâminas I e II do corno dorsal da medula espinhal (Boll *et al.,* 2018). Desta forma, a ocitocina pode agir sistemicamente pela sua liberação da hipófise e por ação de fibras ocitoninérgicas no SNC (Boll *et al.,* 2018).

A administração intratecal de ocitocina é capaz de promover redução da hiperalgesia térmica em ratos machos, enquanto que o mesmo não pode ser observado em ratos fêmeas com mesma concentração da droga, a.125 nmol (Chow *et al.,* 2016). Em concordância, a atosiban, antagonista dos receptores de ocitocina (OTRs), não foi capaz de reduzir a hiperalgesia térmica em ratos fêmeas (Chow *et al.,* 2016). Em

DRGs, OTRs são expressos predominantemente em fibras do tipo C não- peptidérgicas e em neurônios de lâmina II do corno dorsal da medula espinhal, em que possuem ação inibitória (Boll *et al.,* 2018). O mecanismo preciso pela qual a ocitocina promove analgesia ainda é desconhecido mas foi proposto que ocitocina promove seu efeito analgésico ao promover a redução da propagação de estímulos de neurônios glutamatérgicos e aumento da propagação de estímulos de neurônios GABAérgicos (Breton *et al.,* 2009).

De acordo com Chow et al. (2016), a estimulação elétrica de neurônios ocitocinérgicos do PVN do hipocampo também é capaz de reduzir, por um curto período de tempo, a hiperalgesia térmica em ratos machos e fêmeas após estímulo subplantar de carragenina (Chow et al., 2016). Além de que, há expressão aproximadamente duas vezes maior de OTRs no corno dorsal da medula espinhal de ratos machos que de fêmeas do período pós natal até a idade adulta (Uhl-Bronner et al., 2005). Também foi observado que ratos fêmeas apresentam aproximadamente três vezes mais expressão de IRAP, enzima responsável pela degradação de ocitocina, na medula espinal nos segmentos L1 a L6 (Chow et al., 2016).

Portanto, pode ser que a falha do efeito analgésico em fêmeas em resposta ao estímulo subplantar de carragenina se deve a baixa de expressão de OTRs na medula espinha de fêmeas e é agravado pelo aumento de expressão de IRAP na medula espinhal das mesmas.

1.2.1.4 SISTEMA ADENOSINÉRGICO

A adenosina é um neuromodulador produzido em resposta a mudanças no metabolismo celular e lesão tecidual, e atua como neurotransmissor por meio da interação com quatro subtipos de receptores, adenosina A1, A2A, A2B e

A3 (A1R, A2AR, A2BR, A3R) (Dunwiddie; Masino, 2001; Bacon et al., 2007). A administração prévia de ZM-241,385, antagonista de A2AR, no tecido subplantar de animais ao estímulo de carragenina foi capaz de reduzir a hiperalgesia mecânica em camundongos fêmeas, mas não em machos (Li et al., 2010b). Em concordância, a administração subplantar de CGS 21680, agonista seletivo de A2AR, foi menos efetiva na hiperalgesia mecânica de camundongos C57BL/6 deficientes para A2AR (A2AR -/-) em ambos os sexos (Li et al., 2010b). Além do mais, a administração subplantar de CGS 21680 em camundongos C57BL/6 fêmeas promoveu hiperalgesia mecânica de maior duração que em camundongos machos (Li et al., 2010b). Portanto, camundongos machos possuem um fator protetor em relação às fêmeas em resposta ao estímulo de carragenina, e que está relacionado à ativação de A2AR em fêmeas.

1.2.1.5 OPIÓIDES ENDÓGENOS

Opióides endógenos são peptídeos produzidos por várias estruturas do SNC e leucócitos (Corder et al., 2018). Essa classe de moléculas atua por meio da interação com seus receptores, incluindo MOR, DOR, KOR e receptores de nociceptina (NOR) (Bagley; Ingram, 2020). Todos os receptores, MOR, DOR, KOR, e NOR são expressos em DRGs e em várias estruturas do SNC, incluindo interneurônios excitatórios e neurônios de projeção da lâmina I do corno dorsal da medula espinhal, PAG e RVM (Corder et al., 2018). A ativação desses receptores opióides resulta em efeito analgésico, seja por ação direta em neurônios nociceptivos, promovendo diminuição da liberação de glutamato, assim como por modulação de mecanismos descendentes de controle da dor (Corder et al., 2018).

As pró dinorfinas são clivadas em vários ligantes seletivos de KOR da família das dinorfinas, incluindo dinorfina-A, dinorfina-B e α-neoendorfina, e camundongos deficientes na produção de pré pró dinorfinas são mais sensíveis a estímulos térmicos nocivos (Corder et al., 2018; Kivell et al., 2010). Ademais, camundongos Knockout para KOR apresentam aumento de comportamento de dor manifesta após estímulo inflamatório periférico (Simonin et al., 1998; Kivell et al., 2010).

A administração de U50,488H, agonista seletivo do KOR, promoveu redução da hiperalgesia térmica em ratos fêmeas que sofreram ovariectomia e foram tratadas com benzoato de estradiol em resposta ao estímulo de carragenina (Lawson et al., 2010). No entanto, não houve alteração da hiperalgesia térmica em ratos fêmeas que sofreram ovariectomia e ratos machos que sofreram gonadectomia, e ratos machos que sofreram gonadectomia e foram tratados com benzoato de estradiol (Lawson et al., 2010).

A administração intratecal de U50,488H promoveu redução da hiperalgesia em resposta ao estímulo térmico com movimento reflexo evocado da cauda em ratos fêmeas durante a fase proestro, que possui alta concentração de estrógenos, no entanto, não foi capaz de promover alteração da hiperalgesia térmica na fase diestro, que possui baixa concentração de estrógenos, em ratos fêmeas (Lawson et al., 2010). U50,488H também não foi capaz de promover alteração da hiperalgesia térmica em ratos machos (Lawson et al., 2010). U50,488H também não foi capaz de promover alteração da hiperalgesia térmica em ratos machos e ratos fêmeas que sofreram ovariectomia mas foi capaz de promover redução da hiperalgesia térmica em ratos fêmeas que sofreram ovariectomia e foram tratadas com benzoato de estradiol (Lawson et al., 2010).

A norbinaltorfimina (nor-BNI), antagonista seletivo de KOR, quando previamente administrada a

U50,488H, foi capaz de eliminar o efeito analgésico promovido por U50,488H. Além do mais, a expressão de KOR é significativamente maior na medula espinhal de ratos fêmeas na fase proestro e ratos fêmeas que sofreram ovariectomia e foram tratadas com benzoato de estradiol (Lawson et al., 2010). No entanto, a expressão de KOR em neurônios nociceptivos ainda precisa ser determinada. Portanto, estrógenos promovem efeito protetor em fêmeas por meio da interação com receptores KOR, sendo que o efeito antinociceptivo de KOR não é influenciado por altos níveis de testosterona ou baixos níveis de estrógenos em ratos machos.

Esses resultados são instigantes visto que machos possuem maior efeito analgésico em resposta a morfina, agonista opióide de MOR comumente utilizado para o tratamento de dores crônicas e de alta intensidade (Loyd; Murphy, 2009). De fato, as fêmeas necessitam de doses aproximadamente 30% maiores de morfina que machos para obter o mesmo efeito analgésico (Loyd; Murphy, 2009). A contribuição de KOR e sua relação com opióides endógenos no controle descendente da dor em fêmeas ainda precisa ser melhor esclarecida.

1.2.1.6 ESTRÓGENOS

Os estrógenos atuam por meio de sua ligação com seus receptores, receptor de estrógeno alfa (ER-ὰ) e beta (ER-β), e são produzidos principalmente pelas gônadas sexuais femininas, ovários (Vegeto *et al.,* 2010). Vegeto *et al.* (2010) demonstraram haver aumento de infiltrado leucocitário em camundongos que sofreram ovariectomia após o estímulo de carragenina na cavidade pleural. A administração de estradiol E2 (E2) foi capaz de diminuir a quantidade de leucócitos em camundongos que sofreram ovariectomia em resposta ao

estímulo de carragenina na cavidade pleural (Vegeto *et al.,* 2010). Ademais, não houve alteração no recrutamento de leucócitos após administração de E2 em camundongos C57/BL6 knockout para ER-ὰ (ER-ὰ -/-), no entanto, houve redução significativa no recrutamento de leucócitos em camundongos ER-β -/- (Vegeto *et al.,* 2010). Portanto, o efeito protetor de E2 é mediado pela interação desse estrógeno com ER-ὰ em modelo de pleurite induzido por carragenina em camundongos, principalmente por células endoteliais e leucócitos infiltrados que expressam este receptor (Vegeto *et al.,*2010).

Além de que, camundongos ER-ὰ -/- possuem maior expressão de ICAM-1 (Vegeto et al., 2010). A administração de E2 foi capaz de reduzir a expressão de ICAM-1 e P-selectina em camundongos ER-β -/-,, no entanto, não promoveu alteração da expressão em camundongos ER-ὰ -/- (Vegeto et al., 2010). Portanto, as células endoteliais presentes em vasos sanguíneos do pulmão oferecem efeito protetor a camundongos fêmeas por meio dos receptores ER-ὰ. Também houve produção de TNF-ὰ por células endoteliais e leucócitos infiltrados na cavidade pleural em resposta ao estímulo de carragenina (Vegeto et al., 2010). Em camundongos ER- ὰ -/-, houve maior produção de TNF-ὰ, indicando o papel importante de ER-ὰ no processo inflamatório (Vegeto et al., 2010).

1.2.1.7 DEMAIS SISTEMAS NÃO NEURONAIS

Em ratos fêmeas que sofreram ovariectomia, há maior desenvolvimento de edema em resposta ao estímulo subplantar de carragenina (Esposito *et al.,* 2005). A administração de 17β-estradiol (E2) em ratos fêmeas que sofreram ovariectomia e ratos machos promove redução de edema de forma significativa (Esposito *et al.,* 2005). Há também

aumento significativo da expressão de COX-2 e iNOS em ratos fêmeas que sofreram ovariectomia, e a administração de E2 reduz a expressão de COX-2 e iNOS em fêmeas ovariectomizadas. De acordo, foi demonstrado aumento de leucócitos, principalmente polimorfonucleares, em ratos fêmeas que sofreram ovariectomia em um modelo de pleurite induzido por carragenina e a administração de E2 em ratos fêmeas que sofreram ovariectomia reduz significativamente a formação de exsudato, incluindo leucócitos polimorfonucleares, na cavidade pleural após estímulo de carragenina (Esposito *et al.,* 2005).

Também foi relatado maior produção de LTB4 em fêmeas que machos em modelo de pleurite induzido por carragenina em ratos Wistar enquanto machos possuem maior produção de PGE2 que fêmeas (Pace et al., 2017). Em concordância, machos também possuem maior produção de COX-2 que fêmeas (Pace et al., 2017). Machos possuem maior ativação do NF-kB, como pode ser observado pelos níveis de p.NF-kB em células do exsudato torácico em modelo de pleurite induzido por carragenina, e tratamento com MK886, inibidor de 5- lipoxigenase (LOX), enzima necessária para a formação dos leucotrienos, foi capaz de igualar os níveis de produção de PGE2 em ratos machos e fêmeas estimulados com A23187, agente que promove mobilização de Ca2+ intracelular de forma independente de receptores (Pace et al., 2017). De acordo com o que foi observado em modelos murinos, também há maior produção de COX-2 em neutrófilos humanos de machos que de fêmeas, e há maior produção de LTB4 em neutrófilos humanos de fêmeas que em machos (Pace et al., 2017). O tratamento com MK886 também foi capaz de igualar os níveis de produção de PGE2 em neutrófilos humanos estimulados com A23187 (Pace et al., 2017).

Em concordância, houve maior edema, recrutamento de neutrófilos e níveis de CXCL5 em ratos machos

que em fêmeas em modelo de pleurite induzido por carragenina (Madalli *et al.,* 2015). A CXCL5 induz a produção de fator estimulador de colônias granulocitárias (GCSF) e expressão da integrina β2 na superfície de neutrófilos em células derivadas da medula óssea de ratos machos e fêmeas in vitro, sendo que a expressão de integrina β2 é muito mais acentuada em machos (Madalli *et al.,* 2015). Além do mais, a administração de CXCL5 na cavidade pleural induziu aumento de neutrófilos circulantes e da integrina β2 em neutrófilos em ratos machos (Madalli *et al.,* 2015). CXCL5 também é capaz de promover aumento da expressão de CXCR2 em ratos machos e fêmeas (Madalli *et al.,* 2015). Ademais, neutrófilos derivados de ratos machos possuem maior capacidade de adesão que ratos fêmeas, e a CXCL5 possui mais afinidade pela CXCR2 que a CXCL1 (Madalli *et al.,* 2015).

Esses resultados apontam majoritariamente para uma maior nocicepção em fêmeas devido a modulação de neuromoduladores descendentes e menor recrutamento de leucócitos e subsequente resposta inflamatória devido aos efeitos protetores dos estrógenos em quadros de inflamação e efeito nociceptivo em nociceptores.

1.3 MEDIADORES LIPÍDICOS PRÓ-RESOLUÇÃO

Os MLPR são uma classe de mediadores lipídicos produzidos temporariamente durante a resolução da inflamação e são responsáveis por promover a restauração da homeostase e regeneração de tecidos após injúria tecidual (Serhan, 2014; Fattori et al., 2020). Dentre a superfamília dos MLPR estão as Lipoxinas (LX), biossintetizada a partir do ácido araquidônico, resolvinas da série E, biossintetizadas a partir do ácido eicosapentaenóico (EPA), resolvinas da série D,

protectinas e maresinas, biossintetizadas a partir do ácido docosahexaenóico (DHA) (Serhan, 2014). Ácido docosapentaenóico n-3 é um produto intermediário entre EPA e DHA (Dalli et al., 2013). Esses MLPR podem ser biossintetizados via COXs, LOXs e citocromo P450 (Fattori et al., 2020), e seus efeitos biológicos estão relacionados a sua interação com uma classe de GPCRs expressos em uma variedade de tecidos, principalmente células imunes e nervosas, podendo atuar como agonistas, inibidores e agonistas alostéricos (Dalli; Serhan, 2019; Fattori et al., 2020; Li et al., 2020; Han et al., 2021).

Inúmeras evidências apontam para os efeitos analgésicos, anti- inflamatórios e antioxidantes dos MLPR (Fattori *et al.,* 2020; Fattori *et al.,* 2021). O uso de analgésicos e anti-inflamatórios convencionais, como anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), opióides e agentes imunobiológicos apresentam sérios efeitos colaterais (Ex. AINEs), dependência e sensibilização de nociceptores (Ex. Opióides), e resistência por parte do hospedeiro (Ex. Agentes imunobiológicos). Além do mais, muitas dessas drogas promovem seus efeitos por imunossupressão (Rees *et al.,* 2014; So; Martinon, 2017; Yi *et al.,* 2020). Os MLPR não apresentam nenhum dos efeitos colaterais apontados e não possuem efeito imunossupressor (Fattori *et al.,* 2020). Vale ressaltar que MLPR atuam na faixa de pico-nano gramas (pg-ng), faixa de concentração muito menor que agentes analgésicos e anti-inflamatórios convencionais que atuam na faixa de miligramas (mg) (Fattori *et al.,* 2020; Fattori *et al.,* 2021). Portanto, o desenvolvimento de drogas com base no uso de MLPR é uma estratégia promissora.

1.3.1 RESOLVINA D5

7S, 17S-di-hidroxi-4Z, 8E, 10Z, 13Z, 15E, 19Z -

ácido docosahexaenóico ((7(S), 17 (S)-diHDHA), Resolvina D5 [RvD5]), MLPR da série D das resolvinas, é endogenamente biossintetizado por uma série de oxidações do DHA, um metabólito do ômega-3, pelas LOXs (Perry et al., 2020). De fato, em ensaios enzimáticos, Perry et al. (2020) demonstraram que quatro enzimas, 5-LOX, 12-LOX, 15-LOX-1 e 15-LOX-2, estão envolvidas na síntese de RvD5. A oxigenação em C7 pela enzima 5-LOX seguida da oxigenação em C17 pela enzima 15-LOX-2 foi a rota mais produtiva para produção de RvD5 in vitro enquanto as enzimas 12-LOX e 15- LOX-1 foram capazes de produzir RvD5 em menor proporção (Perry et al., 2020). Portanto, as enzimas 5-LOX e 15-LOX-2 são as enzimas mais prováveis para produção de RvD5 in vivo, principalmente por macrófagos de perfil M2 (Werz et al., 2018; Perry et al., 2020). Desde sua descoberta por Charles Serhan e equipe em 2002 (Serhan et al., 2002), a RvD5 tem sido amplamente estudada devido aos efeitos analgésico, anti inflamatório e antioxidante desse MLPR em diversos modelos.

Werz *et al.* (2018) demonstraram que a RvD5 é capaz de aumentar a capacidade fagocítica de macrófagos humanos de perfil M1 in vitro (Werz *et al.* 2018). Além de que, receptores de resolvina D1 (DRV1/GPR32), pelo qual a RvD5 possui alta afinidade, são aproximadamente duas vezes mais expressos em macrófagos humanos de perfil M1 que M2 (Werz *et al.* 2018). Em concordância, Chiang *et al.* (2012) demonstraram que a RvD5, via intraperitoneal, i.p., é capaz de aumentar a capacidade fagocítica em camundongos. In vitro, a RvD5 foi capaz de ativar diretamente DRV1/GPR32 e promover aumento de fagocitose por macrófagos de maneira DRV1/GPR32-dependente (Chiang *et al.,* 2012). Esses resultados são animadores visto que a ciprofloxacino e vancomicina, antibióticos comumente usados no tratamento de infecções bacterianas de alta resistência, e a RvD5 em conjunto com outros MLPR, tiveram efeito aditivo na promoção da

fagocitose de E. coli e S. aureus (Chiang *et al.,* 2012). Portanto, a RvD5 pode ser uma alternativa para a diminuição do uso de antibióticos. Ademais, RvD5 em conjunto da ciprofloxacino foi capaz de aumentar a sobrevivência de animais infectados com E. coli de forma muito mais eficiente que o antibiótico aplicado individualmente (Chiang *et al.,* 2012). Curiosamente, Trypanosoma cruzi, agente causador da doença de chagas, por si próprio, é capaz de produzir RvD5, assim como outros mediadores da família das resolvinas, e modular o microambiente em que se encontra a seu favor, garantindo a sua sobrevivência e a sobrevivência do próprio hospedeiro, perpetuando a infecção (Colas *et al.,* 2018).

A pré-incubação com a RvD5 promove redução da produção de IL-6 e CCL5 via ERK/NF-κB em células THP-1, células de leucemia monocítica humana que são amplamente utilizadas para avaliação da atividade de monócitos e macrófagos, em resposta ao estímulo de LPS in vitro (Chun et al., 2020). RvD5 também foi capaz de reduzir o recrutamento de neutrófilos e macrófagos para os rins em um modelo de endotoxemia induzido por LPS e de reduzir a produção das citocinas pró-inflamatórias IL-1β, TNF-ὰ e IL-6 nos rins sem alteração da produção da citocina anti-inflamatória IL-10 em um modelo de endotoxemia induzido por LPS (Cardoso et al., 2022). A diminuição da atividade do NF-κB pela RvD5 foi associada a diminuição dessas citocinas (Cardoso et al., 2022). Além do mais, a RvD5 é capaz de restabelecer a capacidade antioxidante e reduzir o estresse oxidativo nos rins em um modelo de endotoxemia induzido por LPS via Nrf2 (Cardoso et al., 2022).

A incubação com RvD5 também foi capaz de suprimir a diferenciação de linfócitos T CD4 em linfócitos Th17 e facilitar sua diferenciação em linfócitos T regulatórios (Treg) em condições indutoras do perfil Th17 in vitro (Yamada *et al.,* 2021).

Também foi demonstrado que a RvD5 inibe a proliferação de linfócitos TCD4 sem afetar sua viabilidade (Yamada *et al.,* 2021). Além de que, a RvD5 diminui a diferenciação de osteoclastos em condições indutoras de osteoclastos in vitro (Yamada *et al.,* 2021). A RvD5 também foi capaz de reduzir a ativação de genes relacionados a osteoclastogênese, como o fator nuclear de células T ativadas c1a (NFATc1a), fator de transcrição envolvido na diferenciação de osteoclastos in vitro (Yamada *et al.,* 2021). Considerando que desequilíbrio entre linfócitos Th17 e Treg está associado com a patogênese da artrite reumatóide, esses resultados podem ser de grande relevância (Samson *et al.,* 2012).

7S, 17S-dihidroxi-8E, 10Z, 13Z, 15E, 19Z - ácido docosapentaenóico (n-3 resolvina D5 DPA-derivada [RvD5 n-3 DPA]) é um MLPR análogo a RvD5 DHA- derivada, diferindo somente pela ausência de uma dupla ligação entre os carbonos 4 e 5 (Flak *et al.,* 2020). A RvD5 n-3 DPA é capaz de ativar diretamente os receptores de proteína G 101 (GPR101) e promover aumento de fagocitose por macrófagos e neutrófilos humanos de maneira GPR101-dependente in vitro (Flak *et al.,* 2020). Também foi observado aumento da eferocitose por macrófagos e diminuição da quimiotaxia e transmigração de neutrófilos que foram incubados com RvD5 n-3 DPA (Flak *et al.,* 2020). In vivo, o tratamento de RvD5 n-3 DPA em camundongos foi capaz de reduzir diversos parâmetros inflamatórios em modelo de artrite induzido pela administração do soro aterogênico de camundongos K/BxN, animais que possuem predisposição a artrite (Flak *et al.,* 2020). De fato, Marques *et al.* (2021) observaram que a RvD5n-3 DPA tem papel importante na diferenciação de linfócitos TCD4 em linfócitos Treg ao promover aumento da expressão de FOXP3.

A RvD5n-3 DPA também foi capaz de reduzir o recrutamento de leucócitos em modelo de peritonite induzido por

zimosan e em modelo de isquemia- reperfusão induzido pela oclusão da artéria mesentérica em camundongos (Gobbetti et al., 2017). Por meio de microscopia intravital, foi demonstrado que a RvD5n-3 DPA diminui a adesão e migração de leucócitos. Também foi observado redução da adesão de leucócitos em monocamadas endoteliais humana ativadas por TNF-ὰ e redução da expressão de CD11b em neutrófilos in vitro (Gobbetti et al., 2017). Além do mais, a RvD5n-3 DPA reduz o recrutamento de neutrófilos em um modelo de colite induzido por sulfato de dextrano sódico (DSS). Também promoveu redução parcial da produção da citocina pró-inflamatória IL-1β (Gobbetti et al., 2017). A RvD5-DHA também é capaz de promover a ativação de GPR101 de forma semelhante a RvD5 n- 3 DPA mas os efeitos biológicos resultantes de sua ativação não foram estabelecidos para esse MLPR até o presente momento (Flak et al., 2020).

Embora o efeito anti-inflamatório da RvD5 seja bem caracterizada, seu efeito analgésico é pouco compreendido. Zhang *et al.* (2018) observaram que a RvD5, i.t., é capaz de reduzir a alodinia mecânica e térmica, alodinia ao frio, e em um modelo de dor pós-operatória induzido pela fratura do osso tibial (fPOP) em camundongos machos. Esses resultados indicam que a RvD5 tem potencial como droga para o tratamento de dores crônicas pós-operatórias. Também foi demonstrado que a RvD5, i.t, é capaz de reduzir a dor em modelo de dor inflamatória em induzido pelo estímulo de formalina e em modelo de dor neuropática periférica induzido por quimioterapia de maneira sexo-dependente, promovendo analgesia somente em machos (Luo *et al.,* 2019). Em concordância, a administração de RvD5 na região medular subaracnóidea reduziu a hiperalgesia mecânica e térmica após injúria de constrição crônica do nervo infraorbital (CCI-ION), um modelo de dor neuropática trigeminal, em ratos machos e fêmeas, especialmente em machos (Baggio *et al.,* 2023). RvD5

também foi capaz de reduzir o comportamento de dor manifesta após injeção de formalina no lábio superior direito de ratos machos (Baggio *et al.,* 2023). O mecanismo responsável por esse dimorfismo sexual ainda não foi esclarecido.

Figura 3 – Estrutura da Resolvina D5



Fonte: Imagem adaptada de Perry *et al.,* 2020

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos analgésico e anti-inflamatório da Resolvina D5 (RvD5) no modelo de dor e inflamação induzido por carragenina em camundongos machos efêmeas

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Avaliar se o pré-tratamento com RvD5 reduz a hiperalgesia mecânica e térmica em modelo agudo de inflamação induzido pelo estímulo subplantar de carragenina;
- Avaliar se o pré-tratamento com RvD5 reduz o edema formado em modelo agudo de inflamação induzido pelo estímulo subplantar de carragenina;
- Avaliar se o pré-tratamento com RvD5 reduz o recrutamento leucocitário para o tecido subplantar em modelo agudo de inflamação induzido pelo estímulo subplantar de carragenina;
- Avaliar se o pré-tratamento com RvD5 reduz o recrutamento leucocitário para a cavidade peritoneal em modelo agudo de peritonite induzido pelo estímulo intraperitoneal de carragenina;
- Avaliar se o pré-tratamento com RvD5 reduz os níveis das citocinas pró- inflamatórias TNF-α, IL-1β e IL-6 em modelo agudo de peritonite induzido pelo estímulo intraperitoneal de carragenina;
- Comparar a atividade da RvD5 em camundongos machos e fêmeas;

REFERÊNCIAS

ABAD, L. V. et al. Antioxidant activity potential of gamma irradiated carrageenan. **Applied Radiation and Isotopes**, v. 79, n. 1, p. 73–79, 2013.

ALLEGRA, M. et al. Indicaxanthin from cactus pear fruit exerts anti-inflammatory effects in carrageenin-induced rat pleurisy**. Journal of Nutrition**, v. 144, n. 2, p. 185–192, 2014.

ARAUJO, D. et al. TRPA1 as a therapeutic target for nociceptive pain. **Expert Opinionon Therapeutic Targets**, v. 24, n. 10, p. 997-1008, 2020

BAAMONDE, A. et al. Involvement of endogenous endothelins in thermal and mechanical inflammatory hyperalgesia in mice. **Naunyn-Schmiedeberg's Archivesof Pharmacology**, v. 369, n. 2, p. 245–251, 2004.

BACCEI, M. L.; BARDONI, R.; FITZGERALD, M. Development of nociceptive synaptic inputs to the neonatal rat dorsal horn: Glutamate release by capsaicin andmenthol**. Journal of Physiology**, v. 549, n. 1, p. 231–242, 2003.

BACON, E. R.; CHATTERJEE, S.; WILLIAMS, M. Sleep. **Comprehensive MedicinalChemistry II**, p. 139–167, 2007.

BAGGIO, D. F. et al. Sex Dimorphism in Resolvin D5-induced Analgesia in RatModels of Trigeminal Pain. **Journal of Pain**, v. 24, n. 5, p. 717–729, 2023.

BAGLEY, E. E.; INGRAM, S. L. Endogenous opioid peptides in the descending painmodulatory circuit. **Neuropharmacology**, v. 173, n. 1, p. 108131, 2020.

BANNISTER, K.; DICKENSON, A. H. The plasticity of descending controls in pain:translational probing. **Journal of Physiology**, v. 595, n. 13, p. 4159–4166, 2017.

BARABAS, M. E.; KOSSYREVA, E. A.; STUCKY, C. L. TRPA1 Is Functionally Expressed Primarily by IB4-Binding, Non-Peptidergic Mouse and Rat SensoryNeurons. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, p. e47988, 2012.

BARBÉ, F.; DOUGLAS, T.; SALEH, M. Advances in Nod-like receptors (NLR) biology. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 25, n. 6, p. 681-697, 2014.

BARDONI, R. Serotonergic Modulation of Nociceptive Circuits in Spinal Cord Dorsal Horn. **Current Neuropharmacology**, v. 17, n. 12, p. 1133–1145, 2019.

BARTH, C. R. et al. Carrageenan-induced inflammation promotes ROS generation and neutrophil extracellular trap formation in a mouse model of peritonitis. **EuropeanJournal of Immunology**, v. 46, n. 4, p. 964–970, 2016.

BERTELLI, A. et al. Role of endothelin-1 in carrageenin-induced inflammation. **International journal of tissue reactions**, v. 14, n. 5, p. 225-230, 1992.

BHATTACHARYYA, S.; DUDEJA, P. K.; TOBACMAN, J. K. Carrageenan-induced NFκB activation depends on distinct pathways mediated by reactive oxygen speciesand Hsp27 or by Bcl10. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1780, n. 7–8, p. 973–982, 2008.

BINSHTOK, A. M. et al. Nociceptors are interleukin-1β sensors. **Journal ofNeuroscience**, v. 28, n. 52, p. 14062–14073, 2008.

BOLL, S. et al. Oxytocin and Pain Perception: From Animal Models to Human Research. **Neuroscience**, v. 387, n. 1, p. 149-161, 2018.

BORREGAARD, N. Neutrophils, from Marrow to Microbes. **Immunity**, v. 33, n. 5,p.657-670, 2010.

BORTHAKUR, A. et al. Prolongation of carrageenan-induced inflammation in humancolonic epithelial cells by activation of an NFκB-BCL10 loop. Biochimica et Biophysica Acta - **Molecular Basis of Disease**, v. 1822, n. 8, p. 1300–1307, 2012.

BRETON, J. D.; POISBEAU, P.; DARBON, P. Antinociceptive action of oxytocin involves inhibition of potassium channel currents in lamina II neurons of the rat spinal cord. **Molecular Pain**, v. 5, p. 63, 2009.

BUCKLEY, C. D.; GILROY, D. W.; SERHAN, C. N. Proresolving lipid mediators andmechanisms in the resolution of acute inflammation. **Immunity**, v. 40, n. 3, p. 315- 327, 2014.

BURGESS, G. M. et al. Second messengers involved in the mechanism of action ofbradykinin in sensory neurons in culture. **Journal of Neuroscience**, v. 9, n. 9, p. 3314–3325, 1989.

CAO, D. L. et al. Chemokine CXCL1 enhances inflammatory pain and increases NMDA receptor activity and COX-2 expression in spinal cord neurons via activationof CXCR2. **Experimental Neurology**, v. 261, n. 1, p. 328–336, 2014.

CARDOSO, R. D. R. et al. Resolvin D5 (RvD5) Reduces Renal Damage Caused byLPS Endotoxemia in Female Mice. **Molecules**, v. 28, n. 1, p.121, 2022.

CAVANAUGH, D. J. et al. Distinct subsets of unmyelinated primary sensory fibers mediate behavioral responses to noxious thermal and mechanical stimuli. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 22, p. 9075–9080, 2009.

CAVANAUGH, D. J. et al. Restriction of transient receptor potential vanilloid-1 to the peptidergic subset of primary afferent neurons follows its developmental downregulation in nonpeptidergic neurons. **Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 28, p.10119–10127, 2011.

CERRETTI, D. P. et al. Molecular cloning of the interleukin-1β converting enzyme. **Science**, v. 256, n. 5053, p. 97–100, 1992.

CHAKRABORTY, S. et al. Dopamine modulation of transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) receptor in dorsal root ganglia neurons. **Journal of Physiology**, v. 594, n. 6, p. 1627–1642, 2016.

CHAVDA, D. et al. Revealing the key structural features promoting the helicalconformation in algal polysaccharide carrageenan in solution. **Carbohydrate Polymers**, v. 331, n. 1, p. 121901, 2024.

CHEN, H. et al. Degraded λ-carrageenan activates NF-κB and AP-1 pathways in macrophages and enhances LPS-induced TNF-α secretion through AP-1. Biochimicaet Biophysica Acta - **General Subjects**, v. 1840, n. 7, p. 2162–2170, 2014.

CHIANG, N. et al. Infection regulates pro-resolving mediators that lower antibioticrequirements. **Nature**, v. 484, n. 7395, p. 524–528, 2012.

CHOW, L. H. et al. Sex difference in oxytocin-induced anti-hyperalgesia at the spinal level in rats with intraplantar carrageenan-induced inflammation. **PLoS ONE**, v. 11, n.9, p. e0162218, 2016.

CHUANG, H. H. et al. Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P2-mediated inhibition. **Nature**, v. 411, n. 6840, p. 957–962, 2001.

CHUN, H. W. et al. Resolvin D5, a Lipid Mediator, Inhibits Production of Interleukin-6and CCL5 Via the ERK-NF-κB Signaling Pathway in Lipopolysaccharide-Stimulated THP-1 Cells. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 1, p. 85–92, 2020.

COLAS, R. A. et al. Trypanosoma cruzi produces the specialized proresolving mediators resolvin D1, resolvin D5, and resolvin E2. **Infection and Immunity**, v. 86,n. 4, p. e00688-17, 2018.

CORDER, G. et al. Endogenous and exogenous opioids in pain. **Annual Review of Neuroscience**, v. 41, n. 1, p. 453-473, 2018.

COUTURE, R. et al. Kinin receptors in pain and inflammation. **European Journal ofPharmacology**, v. 429, n. 1-3, p. 161-176, 2001.

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

CUNHA, T. M. et al. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences ofthe United States of America**, v. 102, n. 5, p. 1755–1760, 2005.

CUNHA, T. M. et al. TNF-α and IL-1β mediate inflammatory hypernociception in micetriggered by B1 but not B2 kinin receptor. **European Journal of Pharmacology**, v. 573, n. 1–3, p. 221–229, 2007.

CUNHA, T. M. et al. Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 83, n. 4, p. 824–832, 2008.

DALLI, J.; COLAS, R. A.; SERHAN, C. N. Novel n-3 immunoresolvents: Structuresand actions. **Scientific Reports**, v. 3, n. 1, p.1940, 2013.

DALLI, J.; SERHAN, C. N. Identification and structure elucidation of the pro-resolvingmediators provides novel leads for resolution pharmacology, **British Journal of Pharmacology**, v. 176, n.8, p. 1024-1037, 2019.

DONG, F. et al. Increased function of the TRPV1 channel in small sensory neuronsafter local inflammation or in vitro exposure to the pro-inflammatory cytokine GRO/KC. **Neuroscience Bulletin**, v. 28, n. 2, p. 155–164, 2012.

DUNWIDDIE, T. V.; MASINO, S. A. The role and regulation of adenosine in the central nervous system. **Annual Review of Neuroscience**, v. 24, n.1, p. 31-35, 2001.

ESPOSITO, E. et al. Raloxifene, a selective estrogen receptor modulator, reducescarrageenan-induced acute inflammation in normal and ovariectomized rats. **Endocrinology**, v. 146, n. 8, p. 3301–3308, 2005.

FANG, D. et al. Interleukin-6-mediated functional upregulation of TRPV1 receptors indorsal root ganglion neurons through the activation of JAK/PI3K signaling pathway: Roles in the development of bone cancer pain in a rat model. **Pain**, v. 156, n. 6, p. 1124–1144, 2015.

FATTORI, E. et al. Defective inflammatory response in interleukin 6-deficient mice. **Journal of Experimental Medicine**, v. 180, n. 4, p. 1243–1250, 1994.

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

FATTORI, V. et al. Specialized pro-resolving lipid mediators: A new class of non- immunosuppressive and non-opioid analgesic drugs. **Pharmacological Research**, v.151, n. 1, p.104549, 2020.

FATTORI, V. et al. Neuroimmune communication in infection and pain: Friends orfoes?. **Immunology Letters**, v. 229, n.1, p. 32-43, 2021.

FERNANDES, E. S.; SCHMIDHUBER, S. M.; BRAIN, S. D. Sensory-nerve-derived neuropeptides: **Possible therapeutic targets. Handbook of ExperimentalPharmacology**, v. 194, n.1, p. 393-416, 2009.

FERREIRA, S. H.; LORENZETTI, B. B.; POOLE, S. Bradykinin initiates cytokine- mediated inflammatory hyperalgesia. **British Journal of Pharmacology**, v. 110, n.3, p. 1227–1231, 1993.

FIGINI, M. et al. Substance P and bradykinin stimulate plasma extravasation in the mouse gastrointestinal tract and pancreas. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 272, n. 4 35-4, 1997.

FLAK, M. B. et al. GPR101 mediates the pro-resolving actions of RvD5n-3 DPA in arthritis and infections**. Journal of Clinical Investigation**, v. 130, n. 1, p. 359–373, 2020.

FOSTER, E. et al. Targeted ablation, silencing, and activation establish glycinergic dorsal horn neurons as key components of a spinal gate for pain and itch. **Neuron**, v.85, n. 6, p. 1289–1304, 2015.

FRANÇOIS, A. et al. A Brainstem-Spinal Cord Inhibitory Circuit for Mechanical PainModulation by GABA and Enkephalins. **Neuron**, v. 93, n. 4, p. 822- 839.e6, 2017.

GAMMON, C. M.; ALLEN, A. C.; MORELL, P. Bradykinin Stimulates Phosphoinositide Hydrolysis and Mobilization of Arachidonic Acid in Dorsal RootGanglion Neurons. **Journal of Neurochemistry**, v. 53, n. 1, p. 95–101, 1989.

GASSNER, M.; RUSCHEWEYH, R.; SANDKÜHLER, J. Direct excitation of spinalGABAergic interneurons by noradrenaline. **Pain**, v. 145, n. 1–2, p. 204–210, 2009.

GHOSH, S.; HAYDEN, M. S. New regulators of NF-κB in inflammation. **NatureReviews Immunology**, v. 8, n. 11, p. 837-848, 2008.

GOBBETTI, T. et al. Protectin D1n-3 DPA and resolvin D5n-3 DPA are effectors ofintestinal protection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 15, p. 3963–3968, 2017.

GOKIN, A. P. et al. Local injection of endothelin-1 produces pain-like behavior andexcitation of nociceptors in rats. **Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 14, p. 5358– 5366, 2001

GOODIN, B. et al. Sex differences in experimental measures of pain sensitivity andendogenous pain inhibition. **Journal of Pain Research**, v. 8, p. 311, jun. 2015.

GRADY, E. F. et al. Substance P mediates inflammatory oedema in acute pancreatitis via activation of the neurokinin-1 receptor in rats and mice. **BritishJournal of Pharmacology**, v. 130, n. 3, p. 505–512, 2000.

GRUBER-SCHOFFNEGGER, D. et al. Induction of thermal hyperalgesia and synaptic long-term potentiation in the spinal cord Lamina I by TNF-α and IL-1β is mediated by glial cells. **Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 15, p. 6540–6551, 2013.

HAN, Y. H. et al. Specialized proresolving mediators for therapeutic interventions targeting metabolic and inflammatory disorders. **Biomolecules and Therapeutics**, v.29, n. 5, p. 455-464, 2021.

HEINRICHER, M. M. et al. Descending control of nociception: Specificity, recruitmentand plasticity. **Brain Research Reviews**, v. 60, n. 1, p. 214-225, 2009.

HOFFMANN, T. et al. TRPA1 and TRPV1 are differentially involved in heat nociceptionof mice. **European Journal of Pain (United Kingdom)**, v. 17, n. 10, p. 1472–1482, 2013.

HWANG, S. J.; MIN OH, J.; VALTSCHANOFF, J. G. Expression of the vanilloid receptor TRPV1 in rat dorsal root ganglion neurons supports different roles of the receptor in visceral and cutaneous afferents. **Brain Research**, v. 1047, n. 2, p. 261– 266, 2005.

JI, R. R.; BERTA, T.; NEDERGAARD, M. Glia and pain: Is chronic pain a gliopathy?. **Pain,** v. 154, n. 1, p. S10, 2013.

JIN, X.; GEREAU IV, R. W. Acute p38-mediated modulation of tetrodotoxin-resistantsodium channels

in mouse sensory neurons by tumor necrosis factor-α. **Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 1, p. 246–255, 2006.

KAWASAKI, Y. et al. Cytokine mechanisms of central sensitization: Distinct and overlapping role of interleukin-1β, interleukin-6, and tumor necrosis factor-α in regulating synaptic and neuronal activity in the superficial spinal cord. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 20, p. 5189–5194, 2008.

KIM, Y. S. et al. Expression of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA 1) in the rat trigeminal sensory afferents and spinal dorsal horn. **Journal of Comparative Neurology**, v. 518, n. 5, p. 687–698, 2010.

KIM, J. Y. V. et al. Neuroligin 2 regulates spinal GABAergic plasticity in hyperalgesic priming, a model of the transition from acute to chronic pain. **Pain**, v. 157, n. 6, p. 1314–1324, 2016.

KIVELL, B.; PRISINZANO, T. E. Kappa opioids and the modulation of pain. **Psychopharmacology**, v. 210, n. 2, p. 109-119, 2010.

KOBAYASHI, K. et al. Distinct expression of TRPM8, TRPA1, and TRPV1 mRNAs in rat primary afferent neurons with Aδ/C-fibers and colocalization with Trk receptors. **Journal of Comparative Neurology**, v. 493, n. 4, p. 596–606, 2005.

KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health andinflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 3, p. 159-175, 2013.

LAWSON, K. P. et al. Sex-specificity and estrogen-dependence of kappa opioid receptor-mediated antinociception and antihyperalgesia. **Pain**, v. 151, n. 3, p. 806–815, 2010.

LEE, D. W. et al. Trans-activation of TRPV1 by D1R in mouse dorsal root ganglion neurons. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 465, n. 4, p.832–837, 2015.

LEVINE, J. D. et al. Leukotriene B4 produces hyperalgesia that is dependent onpolymorphonuclear leukocytes. **Science**, v. 225, n. 4663, p. 743–745, 1984.

LI, W. et al. Constitutive activation of nuclear factor-kappa B (NF-κB) signaling pathway in fibrolamellar hepatocellular carcinoma. **International Journal of Clinicaland Experimental Pathology**, v. 3, n. 3, p. 238–243, 2010a.

LI, L. et al. Peripheral adenosine A2A receptors are involved in carrageenan-inducedmechanical hyperalgesia in mice. **Neuroscience**, v. 170, n. 3, p. 923–928, 2010b.

LI, C. et al. Role of Resolvins in the Inflammatory Resolution of NeurologicalDiseases, **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, n.1, p. 612, 2020.

LIDDLE, R. A. The role of Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1) channels in pancreatitis. Biochimica et Biophysica Acta - **Molecular Basis of Disease**, v. 1772,n. 8, p. 869-878, 2007.

LIU, X. et al. Interleukin 1 type 1 receptor restore: A genetic mouse model for studyinginterleukin 1 receptor-mediated effects in specific cell types. **Journal of Neuroscience**, v. 35, n. 7, p. 2860–2870, 2015.

LIU, B. et al. IL-33/ST2 signaling excites sensory neurons and mediates itch response in a mouse model of Poison ivy contact allergy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 47,p. e7572–7579, 2016.

LLORCA-TORRALBA, M. et al. Noradrenergic Locus Coeruleus pathways in pain modulation. **Neuroscience**, v. 338, n. 1, p. 93-113, 2016.

LOPES, A. H. et al. Peripheral NLCR4 inflammasome participates in the genesis ofacute inflammatory pain. **Pain**, v. 156, n. 3, p. 451–459, 2015.

LOPES, A. H. et al. DF2755A, a novel non-competitive allosteric inhibitor of CXCR1/2, reduces inflammatory and post-operative pain. **Pharmacological Research**, v. 103, p. 69–79, 2016.

LOYD, D. R.; MURPHY, A. Z. The role of the periaqueductal gray in the modulation ofpain in males and females: Are the anatomy and physiology really that different?. **Neural Plasticity**, v. 2009, n. 1, p. 12, 2009.

LUO, X. et al. Resolvin D5 Inhibits Neuropathic and Inflammatory Pain in Male But Not Female Mice: Distinct Actions of D-Series Resolvins in Chemotherapy-InducedPeripheral Neuropathy. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, n. 1, p. 745, 2019.

MADALLI, S. et al. Sex-specific regulation of chemokine Cxcl5/6 controls neutrophilrecruitment and tissue injury in acute inflammatory states. **Biology of Sex Differences**, v. 6, n. 1, p.27, 2015.

MALIK, Z. et al. Thiazolidine derivatives attenuate carrageenan-induced inflammatorypain in mice. Drug Design, **Development and Therapy**, v. 15, p. 369–384, 4 fev. 2021.

MALSCH, P. et al. Deletion of interleukin-6 signal transducer gp130 in small sensoryneurons attenuates mechanonociception and down-regulates TRPA1 expression. **Journal of Neuroscience**, v. 34, n. 30, p. 9845–9856, 2014.

MARCH, D. R. et al. Potent Cyclic Antagonists of the Complement C5a Receptor onHuman Polymorphonuclear Leukocytes. Relationships between Structures and Activity. **Molecular Pharmacology**, v. 65, n. 4, p. 868–879, 2004.

MARIATHASAN, S. et al. Differential activation of the inflammasome by caspase-1adaptors ASC and Ipaf. **Nature**, v. 430, n. 6996, p. 213–218, 2004.

MARQUES, R. M. et al. Loss of 15-lipoxygenase disrupts Treg differentiation alteringtheir pro-resolving functions. **Cell Death and Differentiation**, v. 28, n. 11, p. 3140– 3160, 2021.

MARTINEZ, R. M. et al. Anti-inflammatory activity of betalain-rich dye of Beta vulgaris: Effect on edema, leukocyte recruitment, superoxide anion and cytokineproduction. **Archives of Pharmacal Research**, v. 38, n. 4, p. 494–504, 2015.

MARTINEZ, R. M. et al. Analgesic activity and mechanism of action of a Betavulgaris dye enriched in betalains in inflammatory models in mice. **Inflammopharmacology**, v. 28, n. 6, p. 1663–1675, 1 dez. 2020.

MARTINON, F. et al. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3inflammasome. **Nature**, v. 440, n. 7081, p. 237–241, 2006.

MARTINON, F.; MAYOR, A.; TSCHOPP, J. The inflammasomes: Guardians of the body. **Annual Review of Immunology**, v. 27, n. 1, p. 229-265, 2009.

MAXIMIANO, T. K. E. et al. TRPV1: Receptor structure, activation, modulation androle in neuro-immune interactions and pain. **Cell Calcium**, v. 119, n.1, p. 102870, 2024.

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

MEGAT, S. et al. A critical role for dopamine D5 receptors in pain chronicity in malemice. **Journal of Neuroscience**, v. 38, n. 2, p. 379–397, 2018.

MENDIS, P. M. et al. Ultra-high-performance liquid chromatography charge transferdissociation mass spectrometry (UHPLC-CTD-MS) as a tool for analyzing the structural heterogeneity in carrageenan oligosaccharides. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 414, n. 1, p. 303–318, 2022.

MERT, T. et al. Pain-relieving effects of pulsed magnetic fields in a rat model of carrageenan-induced

hindpaw inflammation. **International Journal of RadiationBiology**, v. 90, n. 1, p. 95–103, 2014.

MICKLE, A. D.; SHEPHERD, A. J.; MOHAPATRA, D. P. Sensory TRP channels: The key transducers of nociception and pain. **Progress in Molecular Biology andTranslational Science**, v. 131, n. 1, p. 73–118, 2015.

MIZOKAMI, S. S. et al. Pimaradienoic acid inhibits carrageenan-induced inflammatory leukocyte recruitment and edema in mice: Inhibition of oxidative stress,nitric oxide and cytokine production. **PLoS ONE**, v. 11, n. 2, p.e0149656, 2016.

MOREAU, M. E. et al. The kallikrein-kinin system: Current and future pharmacological targets. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 99, n. 1, p. 6-38,2005.

MURRAY, P. J.; WYNN, T. A. Protective and pathogenic functions of macrophagesubsets. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 11, p.723-737, 2011.

NAG, S.; MOKHA, S. S. Activation of α2-adrenoceptors in the trigeminal region produces sex-specific modulation of nociception in the rat. **Neuroscience**, v. 142, n.4, p. 1255–1262, 2006.

NAGY, I. et al. Cobalt uptake enables identification of capsaicin- and bradykinin- sensitive subpopulations of rat dorsal root ganglion cells in vitro. **Neuroscience**, v.56, n. 1, p. 241–246, 1993.

OSSIPOV, M. H.; DUSSOR, G. O.; PORRECA, F. Central modulation of pain. **Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 11, p. 3779-3787, 2010.

PACE, S. et al. Sex differences in prostaglandin biosynthesis in neutrophils duringacute inflammation. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 3759, 2017.

PERRY, S. C. et al. 15-Lipoxygenase-1 biosynthesis of 7S,14S-diHDHA implicates 15-Lipoxygenase-2 in biosynthesis of resolvin D5. **Journal of Lipid Research**, v. 61,n. 7, p. 1087–1103, 2020.

PHAM, T. H. et al. Fargesin exerts anti-inflammatory effects in THP-1 monocytes by suppressing PKC-dependent AP-1 and NF-κB signaling. **Phytomedicine**, v. 24, n. 1,p. 96–103, 2017.

PINHO-RIBEIRO, F. A.; VERRI, W. A.; CHIU, I. M. Nociceptor Sensory Neuron– Immune Interactions in Pain and Inflammation. **Trends in Immunology**, v. 38, n. 1,p.5-19, 2017.

PIOVEZAN, A. P. et al. Effects of endothelin-1 on capsaicin-induced nociception inmice. **European Journal of Pharmacology**, v. 351, n. 1, p. 15–22, 1998.

POOLE, S. et al. Bradykinin B1 and B2 receptors, tumour necrosis factor α and inflammatory hyperalgesia. **British Journal of Pharmacology**, v. 126, n. 3, p. 649–656, 1999.

PRADO, G. N. et al. Mechanisms regulating the expression, self-maintenance, andsignaling-function of the bradykinin B2 and B1 receptors. **Journal of Cellular Physiology**, v. 193, n. 3, p. 275-286, 2002.

PUOPOLO, M. The hypothalamic-spinal dopaminergic system: A target for pain modulation. **Neural Regeneration Research**, v. 14, n. 6, p. 925-930, 2019.

PURKISS, J. et al. Capsaicin-stimulated release of substance P from cultured dorsalroot ganglion neurons: Involvement of two distinct mechanisms. **Biochemical Pharmacology**, v. 59, n. 11, p. 1403–1406, 2000.

QIN, X.; WAN, Y.; WANG, X. CCL2 and CXCL1 trigger calcitonin gene-related peptide release by exciting primary neciceptive neurons. **Journal of NeuroscienceResearch**, v. 82, n. 1, p. 51–62, 2005.

QIU, F. et al. Potentiation of acid-sensing ion channel activity by the activation of 5- HT 2 receptors in rat dorsal root ganglion neurons. **Neuropharmacology**, v. 63, n. 3,p. 494–500, 2012.

RAJA, S. N. et al. The revised International Association for the Study of Pain definitionof pain: concepts, challenges, and compromises. **Pain,** v. 161, n. 9, p.1976-1982, 2020.

REES, F.; HUI, M.; DOHERTY, M. Optimizing current treatment of gout. **NatureReviews Rheumatology**, v. 10, n. 5, p. 271-283, 2014.

REGOLI, D. et al. Receptors for bradykinin and related kinins: A critical analysis. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 71, n. 8, p. 556-567, 1993.

ROGOZ, K. et al. Glutamate, substance p, and calcitonin gene-related peptide cooperate in inflammation-induced heat hyperalgesias. **Molecular Pharmacology**, v.85, n. 2, p. 322–334, 2014.

SALVEMINI, D. et al. Roles of reactive oxygen and nitrogen species in pain**. FreeRadical Biology and Medicine**, v. 51, n. 5, p. 951-966, 2011.

SAMSON, M. et al. Brief report: Inhibition of interleukin-6 function corrects Th17/Tregcell imbalance in patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 64, n. 8, p. 2499–2503, 2012.

SAHA, S. et al. An Overview of Nrf2 Signaling Pathway and Its Role in Inflammation. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 25, n. 22, p. 5474, 2020.

SEGAL, A. W. How neutrophils kill microbes. **Annual Review of Immunology**, v. 23,n. 1, p. 197-223, 2005.

SEIXAS, A. F. et al. Bacterial Response to Oxidative Stress and RNA Oxidation. **Frontiers in Genetics**, v. 12, n. 1, p. 821535, 2022.

SERHAN, C. N. et al. Resolvins: A family of bioactive products of omega-3 fatty acidtransformation circuits initiated by aspirin treatment that counter proinflammation signals. **Journal of Experimental Medicine**, v. 196, n. 8, p. 1025–1037, 2002.

SERHAN, C. N.; CHIANG, N.; VAN DYKE, T. E. Resolving inflammation: Dual anti- inflammatory and pro-resolution lipid mediators. **Nature Reviews Immunology**, v. 8,n. 5, p. 349-361, 2008.

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

SERHAN, C. N.; LEVY, B. D. Resolvins in inflammation: Emergence of the pro- resolving superfamily of mediators. **Journal of Clinical Investigation**, v. 128, n. 7,p.2657-2669, 2018.

SHIN, J. et al. Bradykinin-12-lipoxygenase-VR1 signaling pathway for inflammatoryhyperalgesia. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 15, p. 10150–10155, 2002.

SIEBECK, M. et al. B1 kinin receptor activity in pigs is associated with pre-existinginfection. **Immunopharmacology**, v. 40, n. 1, p. 49–55, 1998.

SIMONIN, F. et al. Disruption of the κ-opioid receptor gene in mice enhances sensitivityto chemical visceral pain, impairs pharmacological actions of the selective κ-agonist U-50,488H and attenuates morphine withdrawal. **EMBO Journal**, v. 17, n. 4, p. 886– 897, 1998.

SMITH, M. L. et al. Social transfer of pain in mice**. Science Advances**, v. 2, n. 10, p.e1600855, 2016.

SO, A. K.; MARTINON, F. Inflammation in gout: Mechanisms and therapeutic targets, **Nature Reviews Rheumatology**, v. 13, n. 11, p.639-674, 2017.

SORGE, R. E. et al. Different immune cells mediate mechanical pain hypersensitivityin male and female mice. **Nature Neuroscience**, v. 18, n. 8, p. 1081–1083, 2015.

SPITE, M.; CLÀRIA, J.; SERHAN, C. N. Resolvins, specialized proresolving lipid mediators, and their potential roles in metabolic diseases. **Cell Metabolism**, v. 19, n.1, p. 21-36, 2014.

STAUD, R. et al. Diffuse noxious inhibitory controls (DNIC) attenuate temporal summation of second pain in normal males but not in normal females or fibromyalgia patients. **Pain**, v. 101, n. 1–2, p. 167–174, 2003.

SUNG, C. S. et al. Potentiation of spinal glutamatergic response in the neuron-glia interactions underlies the intrathecal IL-1β-induced thermal hyperalgesia in rats. **CNS Neuroscience and Therapeutics**, v. 23, n. 7, p. 580–589, 2017.

TAIWO, Y. O.; HELLER, P. H.; LEVINE, J. D. Characterization of distinctphospholipases mediating bradykinin and noradrenaline hyperalgesia. **Neuroscience**, v. 39, n. 2, p. 523–531, 1990.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. **Cell**, v.140, n. 6, p. 805-820, 2010.

TAVES, S. et al. Spinal inhibition of p38 MAP kinase reduces inflammatory and neuropathic pain in male but not female mice: Sex-dependent microglial signaling inthe spinal cord. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 55, n. 1, p. 70–81, 2016.

THOMPSON, A. D. et al. Sex-specific modulation of spinal nociception by α2-adrenoceptors: Differential regulation by estrogen and testosterone. **Neuroscience**,v. 153, n. 4, p. 1268–1277, 2008.

TING, E. et al. Role of complement C5a in mechanical inflammatory hypernociception: Potential use of C5a receptor antagonists to control inflammatorypain. **British Journal of Pharmacology**, v. 153, n. 5, p. 1043–1053, 2008.

TOBACMAN, J. K. Review of harmful gastrointestinal effects of carrageenan in animal experiments. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, n. 10, p. 983-994, 2001.

TODD, A. J. Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. **NatureReviews Neuroscience**, v. 11, n. 12, p. 823–836, 2010.

TSUJI, R. F. et al. Suppression of allergic reaction by λ-carrageenan: Toll-like receptor 4/MyD88-dependent and -independent modulation of immunity. **Clinical andExperimental Allergy**, v. 33, n. 2, p. 249–258, 2003.

TUNGEN, J. E.; AURSNES, M.; HANSEN, T. V. Stereoselective synthesis of maresin1. **Tetrahedron Letters**, v. 56, n. 14, p. 1843–1846, 2015.

UHL-BRONNER, S. et al. Sexually dimorphic expression of oxytocin binding sites inforebrain and spinal cord of the rat. **Neuroscience**, v. 135, n. 1, p. 147–154, 2005.

VANDERAH, T. W. Delta and kappa opioid receptors as suitable drug targets for pain. **Clinical Journal of Pain**, v. 26, n. SUPPL.10, 2010.

VANDEWAUW, I. et al. A TRP channel trio mediates acute noxious heat sensing. **Nature**, v. 555, n. 7698, p. 662–666, 2018.

VAN WIJK, G.; VELDHUIJZEN, D. S. Perspective on Diffuse Noxious Inhibitory Controls as a Model of Endogenous Pain Modulation in Clinical Pain Syndromes. **Journal of Pain**, v. 11, n. 5, p. 408-419, 2010.

VARELA, M. L. et al. Acute Inflammation and Metabolism. **Inflammation**, v. 41, n. 4,p. 1115-1127, 2018.

VEGETO, E. et al. Estrogen receptor-α as a drug target candidate for preventing lunginflammation. **Endocrinology**, v. 151, n. 1, p. 174–184, 2010.

VERRI, W. A. et al. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: Targets foranalgesic drug development?. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 112, n. 1, p.116-138, 2006.

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

WANG, J.; LENARDO, M. J. Roles of caspases in apoptosis, development, and cytokine maturation revealed by homozygous gene deficiencies. **Journal of CellScience**, v. 113, n. 5, p. 753-757, 2000.

WANG, J. et al. The Dopaminergic System in the Ventral Tegmental Area Contributes to Morphine Analgesia and Tolerance. **Neuroscience**, v. 527, n. 1, p. 74-83, 2023.

WANG, Y. et al. Composition and Function of Neutrophil Extracellular Traps. **Biomolecules**, v. 14, n. 4, p. 416, 2024.

WERZ, O. et al. Human macrophages differentially produce specific resolvin orleukotriene signals that depend on bacterial pathogenicity. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 59, 2018.

WHITE, B. et al. Activated protein C inhibits lipopolysaccharide-induced nuclear translocation of nuclear factor κB (NF-κB) and tumour necrosis factor α (TNF-α) production in the THP-1 monocytic cell line. **British Journal of Haematology**, v.110, n. 1, p. 130–134, 2000.

WIECH, K. et al. Influence of prior information on pain involves biased perceptualdecision-making. **Current Biology**, v. 24, n. 15, p. 679-681, 2014.

XU, X. J. et al. Nociceptive responses in interleukin-6-deficient mice to peripheralinflammation and peripheral nerve section. **Cytokine**, v. 9, n. 12, p. 1028–1033, 1997.

XU, D. et al. IL-33 exacerbates antigen-induced arthritis by activating mast cells.**Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 31, p. 10913–10918, 2008.

YANG, K. et al. Capsaicin facilitates excitatory but not inhibitory synaptic transmission in substantia gelatinosa of the rat spinal cord. **Neuroscience Letters**, v.255, n. 3, p. 135–138, 1998.

YAMADA, H. et al. Effect of resolvin D5 on T cell differentiation and osteoclastogenesis analyzed by lipid mediator profiling in the experimental arthritis.**Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 17312, 2021.

YAMAMOTO, M.; KENSLER, T. W.; MOTOHASHI, H. The KEAP1-NRF2 system: A thiol-based sensor-effector apparatus for maintaining redox homeostasis. **Physiological Reviews**, v. 98, n. 3, p. 1169-1203, 2018.

YI, J. J. et al. Synthesis of two new lipid mediators from docosahexaenoic acid bycombinatorial catalysis involving enzymatic and chemical reaction. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 18849, 2020.

ZARPELON, A. C. et al. IL-33/ST2 signalling contributes to carrageenin-induced innate inflammation and inflammatory pain: Role of cytokines, endothelin-1 and prostaglandin E 2. **British Journal of Pharmacology**, v. 169, n. 1, p. 90–101, 2013.

ZHANG, L. et al. Distinct analgesic actions of DHA and DHA-derived specialized pro-resolving mediators on post-operative pain after bone fracture in mice. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, n. 1, p. 412, 2018.

ZHENG, J.; LU, Y.; PERL, E. R. Inhibitory neurones of the spinal substantiagelatinosa mediate interaction of signals from primary afferents. **Journal ofPhysiology**, v. 588, n. 12, p. 2065–2075, 2010.

ZLOTNIK, A.; YOSHIE, O. Chemokines: A new classification system and their role inimmunity. **Immunity**, v. 12, n. 2, p. 121-127, 2000.

ZHOU, Q. L.; STRICHARTZ, G.; DAVAR, G. Endothelin-1 activates ETA receptors toincrease intracellular calcium in model sensory neurons. **NeuroReport**, v. 12, n. 17, p. 3853–3857, 2001.

ZUCOLOTO, A. Z. et al. Probucol attenuates overt pain-like behavior and carrageenan-induced inflammatory hyperalgesia and leukocyte recruitment byinhibiting NF-κB activation and cytokine production without antioxidant effects.**Inflammation Research**, v. 66, n. 7, p. 591–602, 2017.

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 (Frontiers in Pharmacology, ISSN: 1663-9812, Qualis: A1). Os resultados parciais estão descritos no artigo intitulado "Analgesic and antiinflammatoy effects of RvD5 on carrageenan-induced pain and inflammation in mice: Assessment of sexual dimorphism".

Analgesic and antiinflammatory effects of RvD5 on carrageenan-induced pain and inflammation in mice: Assessment of sexual dimorphism

Thaila K. E. Maximiano[1], Jessica A. Carneiro[1], Mariana M. Bertozzi[1], Tiago H. Zaninelli[2], Fernanda S. R. Oliveira[1], Anelise Franciosi[3], Beatriz H. S. Bianchini[1], Geovana M. Cebinelli[1], Vitória R. Araújo[1], Rubia Casagrande[1], 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, Brazil.

[2] Division of Dermatology, Department of Medicine, Washington University School of Medicine, St. Louis, Missouri, USA.

[3] Filadélfia University Center, Clinical/Medical Laboratory Science/Research and Allied Professions, Londrina, Paraná, Brazil.

* Autor to whom correspondence should be addressed. Waldiceu A. Verri Jr. 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, Brazil. Fax: +55 43 33714387, Tel: +55 43 33714979, E-mail address: waldiceujr@yahoo.com.br; waverri@uel.br.

Abstract

Background

Resolvin D5 (RvD5) has anti-inflammatory and pro-resolutive roles in inflammation. Here, we evaluated the effects and mechanisms of action of RvD5 in carrageenan-induced inflammation models in male and female mice.

Methods

Male and female mice were treated with RvD5 (3, 10, 30 ng, i.p) or vehicle (ethanol 3.2% in saline) 1 hour prior to the carrageenan administration in the hind right paw (300 µg, i.pl) and peritoneal cavity (1 mg, i.p). Pain-like behavior and inflammation were performed to assess the effects of RvD5 in vivo.

Results

RvD5 prevented the carrageenan induced mechanical and thermal hyperalgesia in male and female mice. RvD5 prevented edema formation in male mice, and recruitment of leukocytes in male and female mice. RvD5 modulated cytokine production in a sex-dependent way.

Conclusion

RvD5 has an analgesic and anti-inflammatory effect in models of carrageenan-induced inflammation by distinct mechanisms in male and female mice. In male mice, RvD5 reduces IL-1β production while in female mice RvD5 targets TNF-α production

Key-words: Pain, Inflammatory pain, Nociception, Specialized pro-resolving mediators, Sexual differences

1. Introduction

Resolvin D5 (RvD5) is an endogenous specialized pro-resolving mediator (SPM) synthesized by 5- lipoxigenase (LOX) and 15-LOX enzymes, mainly by M2 macrophages in the resolution phase of acute inflammation, through the oxidation of docosahexaenoic acid (DHA) [1, 2]. Its production is associated with regulating several physiological and pathological processes [3]. For example, D-series resolvins, including RvD5, are reduced in patients suffering from sleep disturbance and remain reduced even after recovery sleep [3], and low levels of RvD5 are associated with the pathogenesis and severity of asthma [4].

Since the RvD5 discovery in 2002 [5], pharmacological interventions have been made to assess the potential of RvD5 as an analgesic, anti-inflammatory, and antioxidant drug. It has been shown that RvD5 lowers the antibiotic requirement in infectious models induced by Escherichia coli and Staphylococcus aureus by enhancing the phagocytic capacity in M1 (pro-inflammatory) macrophages [6, 2]. Pre-incubation with RvD5 reduced the interleukin 6 (IL-6) and C-C motif chemokine ligand 5 (CCL5) production in THP-cells stimulated with lipopolysaccharide (LPS) by reducing the activation of the extracellular signal regulated kinase (ERK)/factor nuclear kappa B (NF-κB) pathway [7], and RvD5 was also capable of reducing the production of interleukin 1 beta (IL-1β), tumor necrosis factor alpha (TNF-ἀ) and IL-6, and oxidative stress in a model of endotoxemia induced by LPS by reducing the activation of the NF-κB pathway and activating the nuclear factor erythroid 2 related factor 2 (Nrf2) pathway [8]. Incubation with RvD5 also inhibits the T CD4+ lymphocytes' differentiation to Th17 in Th17-induced conditions in vitro. In vivo, RvD5 was also able to reduce osteoclastogenesis [9].

In addition to the anti-inflammatory effects, RvD5 has also been reported to have an analgesic effect. In a model of postoperative pain after a bone fracture, RvD5 has promoted an analgesic effect in male mice, indicating that RvD5 is a potential drug to treat chronic postoperative pain [10]. Treatment with RvD5 has also been reported to have an analgesic effect in the models of chemotherapy-induced peripheral neuropathy and formalin-induced pain, but only in male mice [11, 12]. In fact, RvD5 is the first SPM reported to have a sex-dependent analgesic effect, which was confirmed by two distinct pain models, neuropathic and inflammatory, by Luo and colleagues (2019). However, in a model of chronic constriction injury of the infraorbital nerve, RvD5 has also been reported to have an analgesic effect in both, male and female mice, especially in male mice [12]. The mechanism by which such sexual

dimorphism occurs is still unknown. Considering that males and females have distinct analgesic effects in response to RvD5, studies aiming to understand the mechanisms by which such sex differences occur are necessary [11, 12].

In this work, we attempt to elucidate the mechanism by which RvD5 promotes differentiated analgesic effects in models of pain and inflammation induced by carrageenan in male and female mice.

2. Materials and methods

2.1 Animals

Male and female Swiss (20-25 g) mice were used. Mice were housed in standard clear plastic cages with free access to water and food, a light/dark cycle of 12/12h, and a controlled temperature (21°±1°C). Animals were acclimated to the testing room at least one hour before the experiments, and all behavioral testing was performed between 9 a.m. and 5 p.m. Animal care and handling procedures were developed according to the International Association for Study of Pain (IASP) guidelines and with the approval of the State University of Londrina Ethics Committee on Animal Research and Welfare (OF. CIRC. CEUA N° 152/2016). All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering.

2.2 Drugs, Reagents, and antibodies

Materials were obtained from the following sources: saline solution (NaCl 0.9%; Frenesius Kabi Brasil Ltda, Aquiraz, CE, Brazil), RvD5, ≥ 95% purity, was purchased from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA) and pure λ-carrageenan, sc-216084, was purchased from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA). ELISA kits for measurement of TNF-ᾳ, IL-1β, and IL-6 were from eBioscience (Thermo Fisher Scientific, VIE, Austria).

2.3 Experimental procedures

The experiments were dedicated to determine the therapeutic properties upon RvD5 treatment as a potential analgesic and anti-inflammatory drug in male and female

animals. Mice (n=6 per group per experiment) were submitted to two inflammation models. Parameters were pain and inflammation. Mice were treated with RvD5 (3, 10, or 30 ng) or vehicle (3.2% ethanol/saline) [100 µl per animal, intraperitoneal (i.p)] an hour prior to stimuli in the right paw with an intraplantar (i.pl.) injection of carrageenan (300 µg/20 µl/paw) in a model of inflammatory pain and with an i.p injection of carrageenan (1 mg/100 µl/cavity) in a model of peritonitis. Mechanical hyperalgesia (electronic von Frey), thermal hyperalgesia (hot plate) and edema were evaluated before and after carrageenan stimuli (1, 3, and 5 hours after carrageenan stimuli). The dose of treatment was chosen based on our results of mechanical and thermal hyperalgesia, and edema in male mice. After defining the most effective dose of RvD5 (10 ng/animal), mechanical and thermal hyperalgesia, and edema were evaluated in female mice. The thermal hyperalgesia was also evaluated by the hargreaves test in male mice at the same time points indicated in the von Frey test. The paw of the male and female mice submitted to the model of inflammatory pain (300 µg/20 µl/paw) was collected 5 hours after the carrageenan stimuli for leukocyte recruitment analysis. The peritoneal wash of male and female mice submitted to the model of peritonitis (1 mg/100 µl/cavity) were also collected 5 hours after the carrageenan stimuli for leukocyte recruitment analysis. To elucidate the potential mechanisms of this lipid mediator, the peritoneal wash of male and female mice submitted to the model of peritonitis (1 mg/100 µl/cavity) were collected 5 hours after the carrageenan stimuli for cytokine levels analysis by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (IL-1β, TNF-ȹ and IL-6).

2.3 Evaluation of mechanical hyperalgesia

Mice were allowed to habituate to the apparatus for at least one hour during three consecutive days before the measurements. Animals are placed in acrylic cages with a wire grid floor, and the stimulation was performed when the animals were quiet and with the four paws on the grip floor. This method consists of an electronic pressure meter with a force transducer fitted with a polypropylene tip (Electronic von Frey aesthesiometer; Insight instruments, Ribeirao Preto, SP, Brazil). An increased perpendicular force was applied to the central area of the plantar surface to induce flexion of paw, followed by hind paw withdrawal. A digital aesthesiometer recorded the maximal intensity of the force applied [in grams (g)] when the paw was withdrawn. After habituation, a baseline measurement was obtained. The test was performed in the time points of 1, 3, and 5 hours after carrageenan stimulus. The results were expressed as the difference on the mechanical withdrawal threshold after and before

carrageenan stimulus.

2.4 Evaluation of thermal hyperalgesia

Mice were allowed to habituate to the apparatus for at least two hours during three consecutive days before the measurements. After habituation, a baseline measurement was obtained. To measure pain sensitivity to a heat stimulus (heat hyperalgesia), we placed mice on hot plate apparatus (EFF 361, Insight, Ribeirao Preto, SP, Brazil) and a glass plate of a hargreaves apparatus (Model 390G, IITC Life Science, Woodland Hills, CA, USA). Hot plate was kept at 52°C ± 1°C. A radiant heat source was used to stimulate the paw by gradually increasing the temperature of the plantar surface on the hargreaves test. The test was performed in the time points of 1, 3, and 5 hours after carrageenan stimulus. The pain threshold was determined as the latency (in seconds) to evoke a response of paw withdrawal: paw flinches or licking. In this experiment, the device was set to 30% radiant heat source intensity to the hargreaves test and a cut-off time of 20s of exposure was applied to both tests to prevent tissue damage.

2.5 Edema measurements

Paw edema was assessed through measurements of the transverse diameters using a caliper (Digmatic Caliper, Mitutoyo Corporation, Kanagawa, Japan). The edema was determined for each mouse paw by the difference indicated times post-stimulus and zero time. The test was performed at the time points of 1, 3, and 5 hours after carrageenan stimulus. The results were expressed as the difference on the mm/paw after and before carrageenan stimulus.

2.6 MPO and NAG activity

MPO (an indirect marker of neutrophil recruitment) and NAG (an indirect marker of macrophage recruitment) activity were performed. Paw skin samples were collected 5 h after carrageenan stimulus and homogenized, and only the supernatant was used in the assays. For MPO activity assay, paw skin tissues samples were removed and added in 200 μL of 50 mM K2PO4 solution (pH 6.0), composed of hexadecyl trimethylammonium bromide (HTAB; 0,5%) and homogenized in ice-cold condition using a Tissue-Tearor (Biospec®). Subsequently, samples were centrifuged at 16100 g (2 min), and the resultant supernatants (15

μL) were blended with 200 μL 50 mM K2PO4 buffer, pH 6.0, containing 0.167 mg/mL o-dianisidine dihydrochloride and 0.015% hydrogen peroxide. The MPO activity absorbance was determined spectrophotometrically at 450 nm (Multiskan GO Microplate, Thermo Fischer Scientific, Vantaa, Finland). The results present MPO activity in tested samples (neutrophils/mg of paw skin samples). For NAG activity assay, an adapted colorimetric method was applied. Initially, 40 μL of the supernatant obtained followed by the addition of 10 μL of 50 mM phosphate buffer, pH 6.0. The reaction was started by the addition of 2.24 mM 4-nitrophenyl N-acetyl-β-D-glucosaminide. The plate was subsequently incubated at 37 ◦C for 10min, and the reaction was stopped by the addition of 50 μL of 0.2 M glycine buffer, pH 10.6. NAG enzymatic activity was determined spectrophotometrically at 400 nm (Multiskan GO Microplate, Thermo Fischer Scientific, Vantaa, Finland), and results were presented as NAG activity (macrophages/mg of paw skin samples)

2.7 Leukocyte migration to the peritoneal cavity

The total and differential counts of recruited leukocytes to the peritoneal cavity were determined 5 hours after carrageenan stimulus. Briefly, peritoneal cavities were washed with PBS containing EDTA 2 mM (5 mL of solution), which was recovered to evaluate total and differential cell counts. Total cell counts were performed in the Neubauer chamber using Turk's solution, and differential cell counts (100 cells per slide) were performed in slices stained with the panoptic kit under a light microscope (Olympus CX31RTSF, Tokyo, Japan). Results were expressed as total leukocytes, polymorphonuclear cells, and mononuclear cells (cells × 106/ peritoneal cavity).

2.8 Cytokine measurement

The peritoneal cavity was washed with saline containing EDTA 2 mM (5 mL of solution) and the inflammatory exudate was collected at 5 hours after carrageenan stimulus. Samples were centrifuged (3000 rpm × 15 min × 4°C). TNF-α, IL-1β, and IL-6 levels were determined from the supernatant by ELISA. The results were expressed as pg of cytokine/mg of protein.

2.9 Statistical analysis

Data were analyzed using GraphPad Prism statistical software (GraphPad Software, Inc., USA-500.288, version 9.0). We used the Shapiro–Wilk normality test and Brown-Forsythe homogeneity tests. Two-way repeated-measures analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post-test was used to compare all groups and doses when responses were measured at different times after the stimulus injection. The analyzed factors were treatments, time, and time versus treatment interaction. Parametric results were evaluated by one-way ANOVA followed by Tukey's post-test for data from a single time point. $P<0.05$ was considered significant.

3. Results

3.1 RvD5 prevents carrageenan-induced mechanical and thermal hyperalgesia in male and female mice

Mechanical hyperalgesia was evaluated by the electronic version of the von Frey test (Fig.4A and Fig.4D) and thermal hyperalgesia was evaluated by the hot plate (Fig.4B and Fig.4E) and hargreaves (Fig.4C) tests. Mice were treated with RvD5 (3, 10 and 30 ng, i.p.) or vehicle (ethanol 3.2% in saline, i.p) one hour prior to the injection of carrageenan (300 µg/20 µL, i.pl). Carrageenan was able to induce mechanical (Fig.4A and Fig.4D) and thermal hyperalgesia (Fig.4B, Fig.4C and Fig.4E) in all time-points analyzed when compared to saline groups in male and female mice. Administration of RvD5 prevented carrageenan-induced mechanical and thermal hyperalgesia in male (Fig.4A, Fig.4B and Fig.4C) and female (Fig.4D and Fig.4E) mice. All doses, 3, 10 and 30 ng were able to prevent carrageenan induced mechanical hyperalgesia in male mice on all time-points observed, except the dose of 30 ng, which did not promote difference at 5h after stimulus when compared to the vehicle group (Fig.4A). In females, the dose of 10 ng was able to prevent carrageenan induced mechanical hyperalgesia on all time-points observed (Fig.4D). Concerning the thermal hyperalgesia, RvD5 at the dose of 10 ng was able to prevent the carrageenan induced thermal hyperalgesia on all time-points observed when compared to vehicle groups in male mice (Fig.4B and Fig.4C). RvD5 at the dose of 30 ng was able to prevent the carrageenan induced thermal hyperalgesia only in the first time point, 1h after stimulus (Fig.4B). The dose of 10 ng was also able to prevent the carrageenan induced thermal hyperalgesia in female mice (Fig.4E). Thus, RvD5 has an analgesic effect in both male and female mice, and such effect is dose-dependent in male

mice.

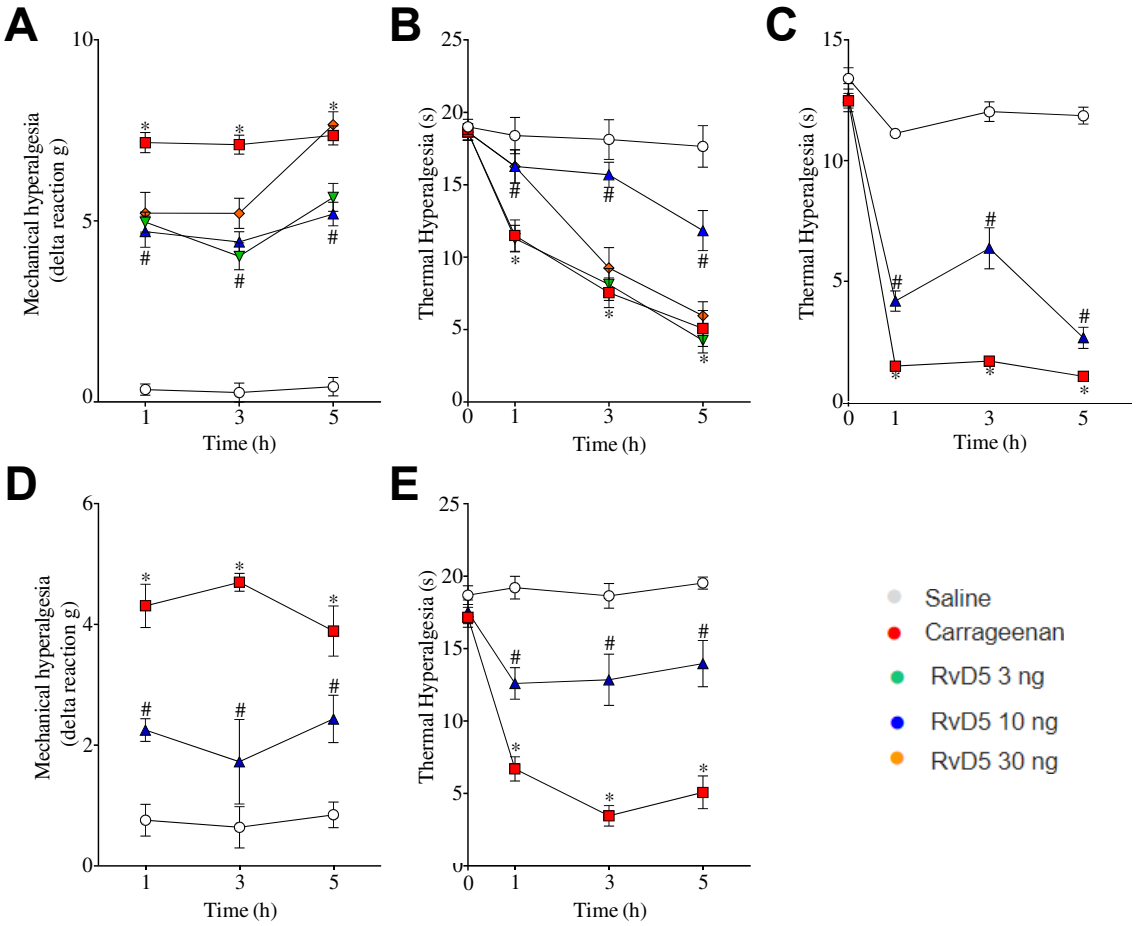


Figure 4 - RvD5 prevents carrageenan-induced mechanical hyperalgesia and thermal hyperalgesia in male and female mice. Intensity of mechanical hyperalgesia in male (A) and female (D) mice and thermal hyperalgesia in male (B and C) and female (E) mice were evaluated 1, 3 and 5 hours after stimulus of carrageenan [300 µg/20 µL, intraplantar (i.pl.)] using an electronic von Frey (A and D), hot plate (B and E), and Hargreaves (C) apparatus. Saline (white), vehicle (red), and RvD5 treatment [3 ng (green), 10 ng (blue), and 30 ng (orange)] groups are shown. Results are presented as Δ mean n ± SEM; n = 6 mice per group per experiment (*P < 0.05 vs saline; #P < 0.05 vs vehicle group; [two-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test]).

3.2 RvD5 prevents carrageenan-induced paw edema formation in male but not female mice

For evaluation of carrageenan-induced edema, mice were treated with RvD5

(3, 10, and 30 ng, i.p.) or vehicle (ethanol 3.2% in saline, i.p) one hour before the injection of carrageenan (300 µg/20 µL, i.pl). Carrageenan was able to induce edema formation in all time points observed in male and female mice (Fig.5A and Fig.5B). RvD5 at the dose of 10 ng was able to prevent edema formation in all time points in male (Fig.5A) mice, however, the doses of 3 and 30 ng prevented the formation of edema only on the two first time points observed, 1 and 3h after stimulus with carrageenan (Fig.5A). Interestingly, there were no differences in the edema formation in female mice treated with RvD5 at the dose of 10 ng and the vehicle group (Fig.5B). Thus, the effect of RvD5 in the formation of edema induced by sub plantar injection of carrageenan is dose and sex dependent.

Given the results of mechanical and thermal hyperalgesia, and edema formation in male mice, RvD5 at the dose of 10 ng/animal was chosen for the next experiments in male and female mice.

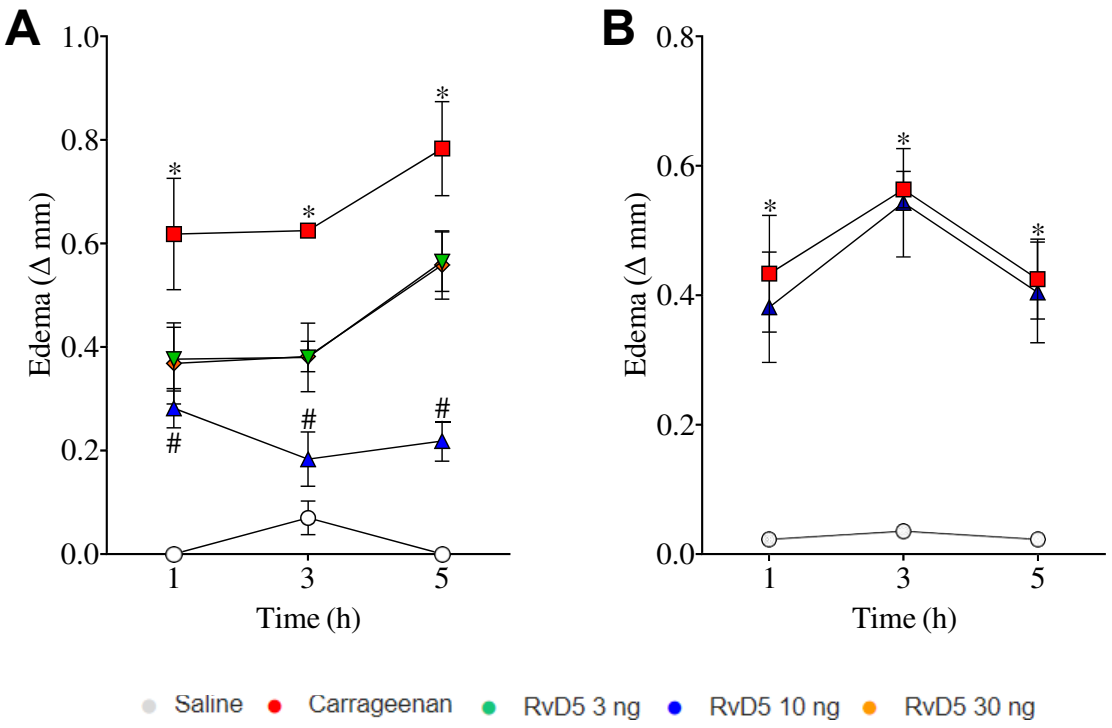


Figure 5 - RvD5 prevents carrageenan-induced paw edema formation in male but not female mice. Edema formation in male (A) and female (B) mice were evaluated 1, 3 and 5 hours after stimulus of carrageenan [300 µg/20 µL, intraplantar (i.pl.)] using a thickness gauge, caliper. Saline (white), vehicle (red), and RvD5 treatment [3 ng (green), 10 ng (blue), and 30 ng (orange)] groups are shown. Results are presented as Δ mean n ± SEM; n = 6 mice per group per experiment (*P < 0.05 vs saline; #P < 0.05 vs vehicle group; [two-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test]).

3.3 RvD5 prevents carrageenan-induced neutrophil migration to the paw in male and female mice

For evaluation of carrageenan-induced recruitment to the paw, mice were treated with RvD5 (10 ng, i.p.) or vehicle (ethanol 3.2% in saline, i.p) one hour prior to the injection of carrageenan (300 µg/20 µL, i.pl). Carrageenan was able to induce neutrophil (Fig.6A and Fig.6C) and macrophage (Fig.6B and Fig.6D) recruitment to the paw in male and female mice when compared to the saline group. RvD5 at the dose of 10 ng was able to prevent neutrophil recruitment to the paw in male (Fig,6A) and female (Fig.6C) mice. RvD5 did not prevent the recruitment of macrophages in both male (Fig.6B) and female (Fig.6D) mice.

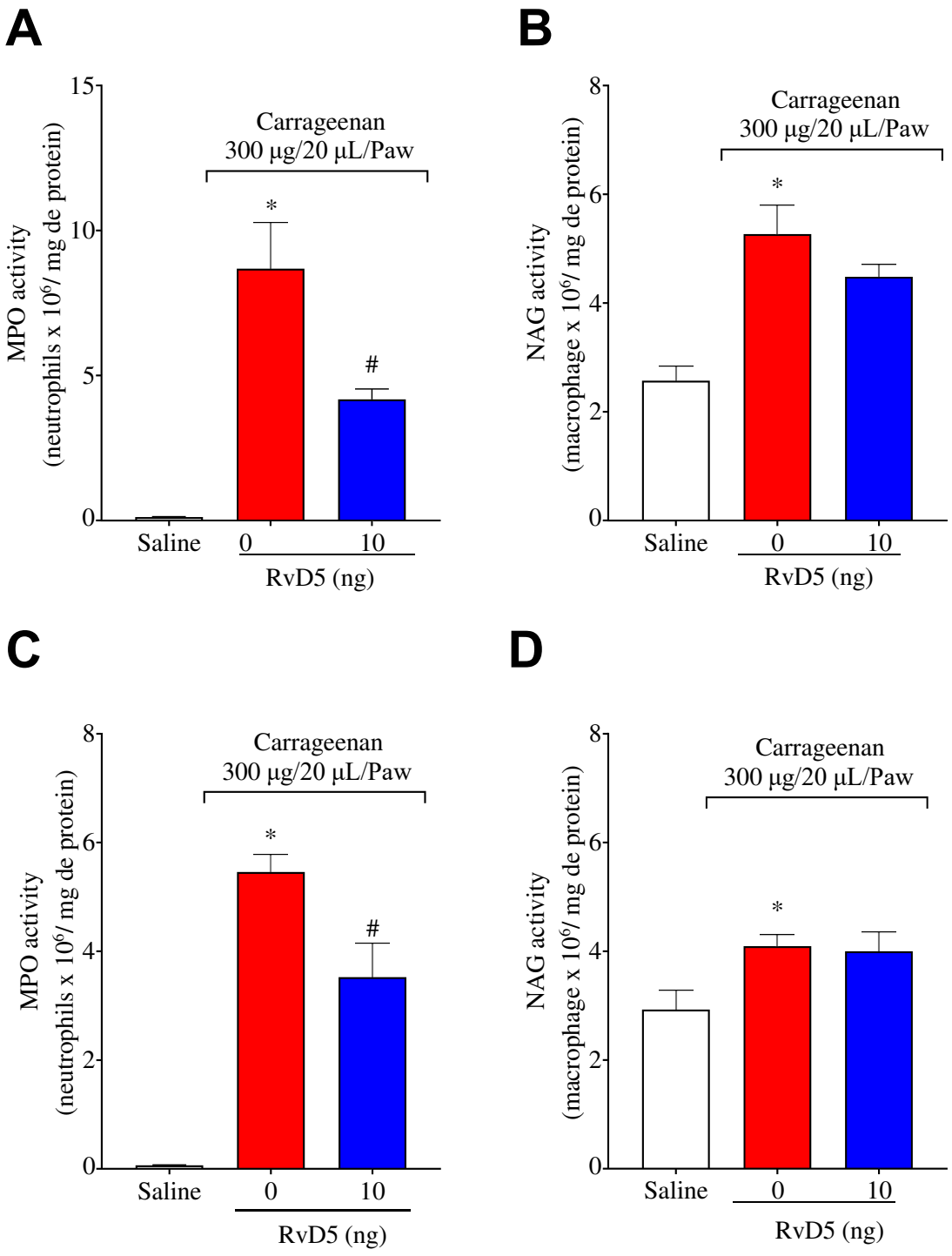


Figure 6 - RvD5 prevents carrageenan-induced neutrophil migration to the paw in male and female mice. Leukocyte recruitment to the paw in male (A and B) and female (C and D) mice were evaluated 5 hours after stimulus of carrageenan [300 µg/20 µL, intraplantar (i.pl.)] and the skin of the hind paw was collected and processed for MPO (A and C) and NAG (B and D) activity measurements analysis. Results are presented as mean n ± SEM; n = 6 mice per group per experiment (*P < 0.05 vs saline; #P < 0.05 vs vehicle group; [one-way ANOVA followed

by Tukey's post hoc test]).

3.4 RvD5 prevents carrageenan-induced leukocyte recruitment to the peritoneal cavity in male and female mice

For evaluation of carrageenan-induced recruitment to the peritoneal cavity, mice were treated with RvD5 (10 ng, i.p.) or vehicle (ethanol 3.2% in saline, i.p) one hour prior to the injection of carrageenan (1 mg, i.p) in a model of carrageenan-induced peritonitis. Carrageenan was able to induce leukocyte recruitment to the peritoneal cavity in male (Fig.7A) and female (Fig.7D) mice, including mononuclear (Fig.7C and Fig.7F) and polymorphonuclear (Fig.7B and Fig.7E) cells when compared to the saline group. Treatment with RvD5 at the dose of 10 ng/animal was able to prevent leukocyte recruitment to the peritoneal space in male (Fig.7A) and female (Fig.7D) mice, including mononuclear (Fig.7C and Fig.7F), and polymorphonuclear (Fig.7B and Fig.7E) in compare to the vehicle group.

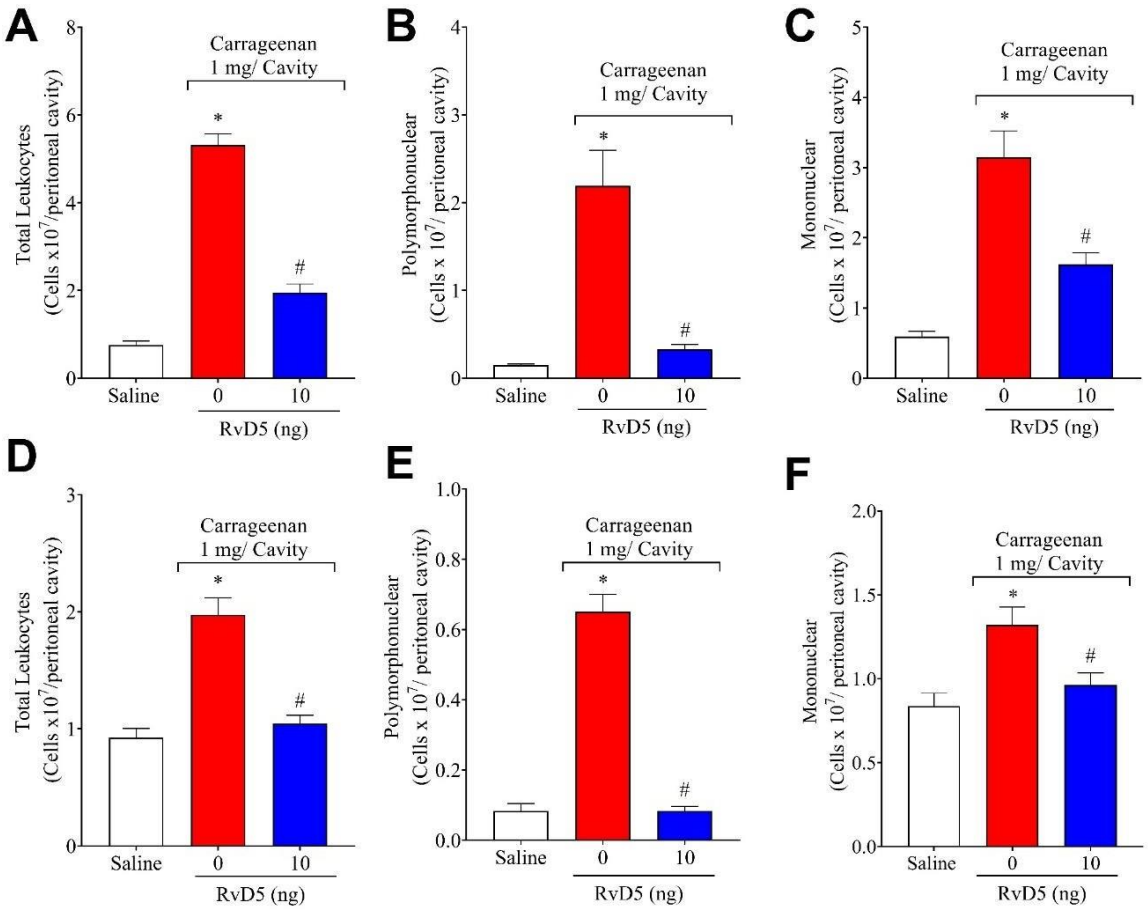


Figure 7 - RvD5 prevents carrageenan-induced leukocyte migration to the peritoneal

microenvironment in male and female mice. The total leukocyte number (A and D), neutrophils (B and E), and mononuclear cells (C and F) were assayed in male (A, B, and C) and female (D, E, and F) mice. Peritoneal wash was collected 5 hours after intraperitoneal injection of carrageenan (1 mg/100 µl/Cavity). Results are presented as mean n ± SEM; n = 6 mice per group per experiment (*P < 0.05 vs saline; #P < 0.05 vs vehicle group; [one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test]).

3.5 RvD5 prevents carrageenan-induced cytokines production in the peritoneal cavity in male and female mice

For evaluation of carrageenan-induced cytokines production in the peritoneal cavity, mice were treated with RvD5 (10 ng, i.p.) or vehicle (ethanol 3.2% in saline, i.p) one hour prior to the injection of carrageenan (1 mg, i.p) in a model of carrageenan-induced peritonitis. Carrageenan was able to induce the production of the proinflammatory cytokines IL-1β (Fig.8A and Fig.8D), TNF-α (Fig.8B and Fig.8E), and IL-6 (Fig.8C and Fig.8F) in the peritoneal cavity in male (Fig.8A, Fig.8B and Fig.8C) and female (Fig.8D, Fig.8E and Fig.8F) mice when compared to the saline group. Treatment with RvD5 at the dose of 10 ng/ animal was able to prevent IL-1β production/liberation in male (Fig.8A) but not female (Fig.8D) mice. Regarding TNF-α production, treatment with RvD5 at the dose of 10 ng/animal was able to prevent the production of TNF-α in female (Fig.8E) but not male (Fig.8B) mice. The production of IL-6 soffered no alteration in male (Fig.8C) and female (Fig.8F) mice when compared to the vehicle group.

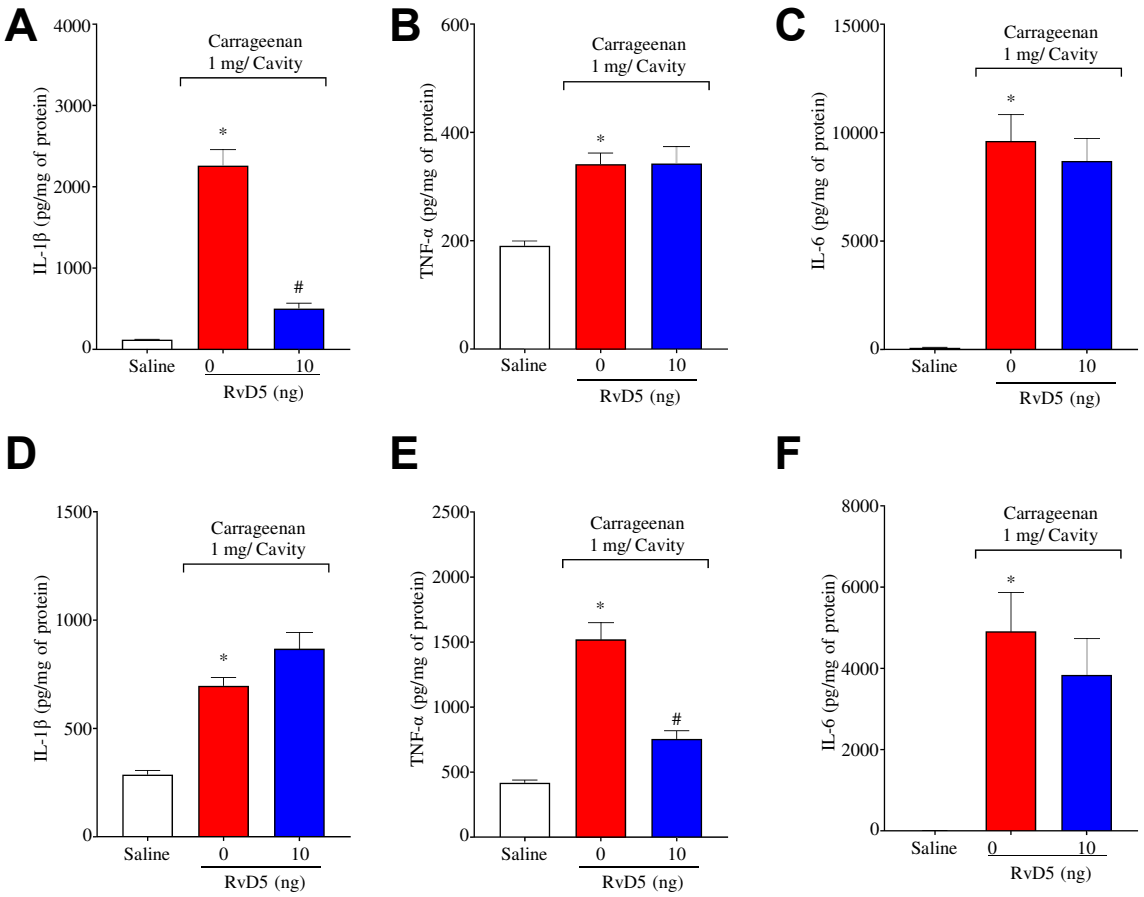


Figure 8 - RvD5 prevents carrageenan-induced TNF-α and IL-1β production in a sex-dependent way. The levels of proinflammatory cytokines IL-1β (A and D), TNF-α (B and C), and IL-6 (C and F) were assayed in male (A, B, and C) and female (D, E and F) mice by ELISA. Peritoneal wash was collected 5 hours after intraperitoneal injection of carrageenan (1 mg/100 µl/Cavity). Results are presented as mean n ± SEM; n = 6 mice per group per experiment (*P < 0.05 vs saline; #P < 0.05 vs vehicle group; [one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test]).

4. Discussion

We have demonstrated that treatment with RvD5 prevents carrageenan induced mechanical and thermal hyperalgesia, edema formation, leukocyte recruitment, and cytokine production in a dose and sex dependent manner. At first, evaluation of mechanical and thermal hyperalgesia, and edema formation was performed in male mice to establish the best dose to exert analgesic and anti-inflammatory properties.

It is worth noticing that carrageenan induces more severe acute hyperalgesia

in female than male mice, which is in accordance with existing literature [13, 14, 15, 16]. It has been shown that testosterone can promote an antinociceptive effect and estrogens can promote a nociceptive effect, which is associated with adrenoceptors alpha 2A [13, 14].

We demonstrated that treatment with RvD5, at the dose of 10 ng per animal, was able to reduce all time points related to hyperalgesia, including mechanical and thermal hyperalgesia, in male mice in a dose dependent-way. RvD5, at the dose of 10 ng per animal, was also able to prevent edema formation in male mice at all time points observed. Considering that RvD5 at the dose of 10 ng was the best dose to prevent these parameters of pain and inflammation applied in male mice, this dose was chosen for the following experiments in male and female mice.

In the model of carrageenan induced hyperalgesia, RvD5 at the chosen dose was also able to prevent mechanical and thermal hyperalgesia in female mice. It has been reported that RvD5 is unable to produce an analgesic effect in distinct pain models, including neuropathic and in inflammatory pain models. Luo and colleagues [11] have shown that RvD5 has no analgesic effect in models of chemotherapy-induced peripheral neuropathy and formalin-induced pain. However, in a model of chronic constriction injury of the infraorbital nerve, RvD5 have been reported to have an analgesic effect in female mice [12]. These results suggest that the analgesic effects of RvD5 can be dependent in the pain model in question, given that which model has its own particular properties. This allegation can be supported given that RvD5 in the dose of 10 ng per animal was unable to induce an analgesia effect in the formalin-induced pain model by two distinct studies [11, 12].

As carrageenan-induced hyperalgesia is caused by the inflammatory process as a result from the recognition of carrageenan, a sulfated polysaccharide from red marine algae, for resident immune cells [17, 18, 19, 20], inflammatory parameters were also evaluated. As expected, carrageenan was able to induce edema formation in male and female mice, especially in males. It has been shown that sexual hormones, especially estrogens, have a protective effect against inflammation in female mice. Vegeto and colleagues [21] have shown that estradiol E2 administration can act on estrogen alpha receptors (ER-α) reducing leukocyte recruitment and adhesion factors in endothelial cells.

Interestingly, the treatment with RvD5 was able to prevent edema formation in male but not female mice, indicating that RvD5 prevention of carrageenan induced edema formation is sex-dependent in this model of inflammatory pain. It has been demonstrated that RvD5 can act on human coronary arteries and reduce PGE2-induced contraction, which was associated with the expression of DRV1/GPR32 in these vessels [22], and Miyahara and

colleagues [23] have demonstrated the expression of DRV1/GPR32 in vascular smooth muscle and endothelial cells of humans and rabbits. As no homologs of DRV1/GPR32 exist in mice so far [24], mechanisms by which RvD5 promotes its vascular sex-dimorphism are unknown.

In the model of inflammatory pain induced by administration of carrageenan in the paw, we demonstrated that carrageenan is able to induce leukocyte recruitment, neutrophil and macrophages, to the paw, especially in males, as have been previously reported [21]. Treatment with RvD5 was able to prevent the neutrophil but not the macrophage recruitment to the paw. The reduction in recruitment can be associated with the reduction of adhesion factors by endothelial cells. In fact, it has been shown that RvD5n-3 DPA, an analog of RvD5 DHA, can reduce the expression of ICAM-1 induced by TNF-α in endothelial cells and expression of CD11b in neutrophils in vitro [25].

In the model of carrageenan peritonitis, we have shown that carrageenan is able to induce leukocyte recruitment, including polymorphic and mononuclear cells, in male and female mice, especially in male. In this model, RvD5 is capable of preventing the leukocyte recruitment, including polymorphic and mononuclear cells, in male and female mice. We attribute the reduction of macrophages by RvD5 in this model of carrageenan-induced peritonitis to the peritoneal distinct environment [26]. Peritoneal cavity has a great number of immune cells, including a high number of resident macrophages and B and T cells [27]. Actually, the peritoneal cavity has a peritoneal cavity-resident B cell subset known as B1 cells, that in addition to the conventional B2 cells, is a great producer of IL-10 [27]. It is also worth mentioning that both RvD5 and carrageenan were delivered to the peritoneal cavity, which may have promoted a more direct effect of RvD5 in the peritoneal cavity cells.

In the peritonitis model, we have shown that carrageenan is also able to enhance the production of several proinflammatory cytokines, such as IL-1β, TNF-α, and IL-6, in male and female mice in different proportions. IL-1β and IL-6 were much more produced in male than female mice in response to the carrageenan peritoneal induced stimulus while TNF-α was much more produced in female than male mice. In fact, increased IL-6 levels were found in the subnucleus caudalis (Sp5C) after CCI-ION in males, but not female rats, indicating a sexual dimorphism in the production of cytokines occurs [28]. We have shown that treatment with RvD5 is able to prevent the production of pro-inflammatory mediators in male and female mice, however, with sex differences. RvD5 prevent the production of IL-1β in male but not female mice, prevent the production of TNF-α in female but not male mice.

Gobbetti and colleagues [25] demonstrated that RvD5n-3 DPA is cable to

partially reduce the production of IL-1β in a model of dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in male mice with no alteration in the production of TNF-α, IL-6, and IL-10 cytokines [25]. Considering that RvD5-DHA activates GPR101 in a similar way to RvD5n-3 DPA [29], it is possible that the activation of this receptor in macrophages and neutrophils interfere with IL-1β production, resulting in analgesia. In fact, it has been observed that RvD5-DHA, i.p, reduces anxiety and depressive-like behavior by reducing IL-1β production in the hippocampus and prefrontal cortex of diabetic male rats [30]. Additionally, lox-GPR101-lox Cre mice have been shown to reduced phagocytic capacity of E. coli and S. aureus by macrophages and reduced efferocytosis [29]. Lox-GPR101-lox Cre mice also had higher numbers of macrophages, monocytes, and neutrophils in response to the bacterial challenge of E. coli and yeast cell wall challenge of zymosan in models of peritonitis, which was associated with the reduction of several SPMs [29]. Thus, GPR101 is critical to macrophage regulation, and endogenous RvD5- DHA and RvD5n-3 DPA may potentiate macrophage activity by autocrine and paracrine mechanisms in vivo, which may also help to control inflammation.

NF-κB is a transcription factor involved in the modulation of genes encoding proinflammatory cytokines, such as TNF-α, IL-1, and IL-6, and inducible enzymes, such as COX-2 and iNOS [31, 32]. Activation of TLR4 by carrageen and its metabolites results in the production of TNF-α by the TLR4/MyD88/Bcl10/NF-κB pathway [17, 18, 19, 20]. In models of carrageenan-induced inflammation, TNF-α leads to the production of IL-6, KC/CXCL1, and IL-1β in mice [33]. Besides, KC/CXCL1 can also induce the production of IL-1β in a TNF-α independent way [33].

In female mice, RvD5 prevents the TNF-α production but no difference is observed in the IL-1β production. Considering the ordered cytokine release cascade, it is possible that the inhibition in the production of TNF-α by RvD5 leads to an enhancement of KC/CXCL1, which leads to the compensatory production of IL-1β in female mice. In fact, in a model of LPS-induced peritonitis, IL-6 knockout mice (IL-6 -/-) have presented three times more TNF-α production in a compensatory mechanism [34]. It is worth mentioning that the IL-1β production needs two signs. The first sign leads to the production of its pro-from, pro-IL-1β, inactive form, and the second sign leads to the maturation of pro-IL-1β to IL-1β, active form [35]. Lopes and colleagues [35] have demonstrated that in a model of carrageenan-induced inflammation in the paw, the inflammasome NLRC4 is necessary for the maturation of pro-IL-1β to its active form, IL-1β.

5. Conclusion

RvD5 has analgesic and anti-inflammatory effects in male and female mice but such effects are due to distinct mechanisms. In male mice, RvD5 reduces IL-1β production while in female mice RvD5 targets TNF-α production. It is possible that the analgesic and anti-inflammatory effects observed in female mice are due to the inhibition of the NF-κB activation, which may reduce TNF-α production, and the analgesic and anti-inflammatory effects observed in male mice are due to the inhibition of IL-1β maturation. However, more studies are necessary to establish the mechanisms that lead to the RvD5 properties in male and female mice.

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] Perry, S. C., Kalyanaraman, C., Tourdot, B. E., Conrad, W. S., Akinkugbe, O., Freedman, J. C., et al. (2020). 15-Lipoxygenase-1 biosynthesis of 7S,14S-diHDHA implicates 15-Lipoxygenase-2 in biosynthesis of resolvin D5. J. Lipid Res. 61, 1087–1103. doi:10.1194/JLR.RA120000777

[2] Werz, O., Gerstmeier, J., Libreros, S., De La Rosa, X., Werner, M., Norris, P. C., et al. (2018). Human macrophages differentially produce specific resolvin or leukotriene signals that depend on bacterial pathogenicity. Nat. Commun. 9. doi: 10.1038/s41467-017-02538-5

[3] Engert, L. C., Mullington, J. M., and Haack, M. (2023). Prolonged experimental sleep disturbance affects the inflammatory resolution pathways in healthy humans. Brain. Behav. Immun. 113, 12–20. doi: 10.1016/j.bbi.2023.06.018

[4] Johnson, R. K., Manke, J., Campbell, M., Armstrong, M., Boorgula, M. P., Pinheiro, G., et al. (2022). Lipid mediators are detectable in the nasal epithelium and differ by asthma status in female subjects. J. Allergy Clin. Immunol. 150, 965-971.e8. doi: 10.1016/j.jaci.2022.02.026

[5] Serhan, C. N., Hong, S., Gronert, K., Colgan, S. P., Devchand, P. R., Mirick, G., et al. (2002). Resolvins: A family of bioactive products of omega-3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter proinflammation signals. J. Exp. Med. 196, 1025–1037. doi: 10.1084/jem.20020760

[6] Chiang, N., Fredman, G., Bäckhed, F., Oh, S. F., Vickery, T., Schmidt, B. A., et al. (2012). Infection regulates pro-resolving mediators that lower antibiotic requirements. Nature 484, 524–528. doi: 10.1038/nature11042

[7] Chun, H. W., Lee, J., Pham, T. H., Lee, J., Yoon, J. H., Lee, J., et al. (2020). Resolvin D5, a Lipid Mediator, Inhibits Production of Interleukin-6 and CCL5 Via the ERK-NF-κB Signaling Pathway in Lipopolysaccharide-Stimulated THP-1 Cells. J. Microbiol. Biotechnol. 30, 85–92. doi: 10.4014/jmb.1907.07033

[8] Cardoso, R. D. R., Chambo, S. D., Zaninelli, T. H., Bianchini, B. H. S., Silva, M. D. V. da, Bertozzi, M. M., et al. (2023). Resolvin D5 (RvD5) Reduces Renal Damage Caused by LPS Endotoxemia in Female Mice. Molecules 28. doi: 10.3390/molecules28010121

[9] Yamada, H., Saegusa, J., Sendo, S., Ueda, Y., Okano, T., Shinohara, M., et al. (2021). Effect of resolvin D5 on T cell differentiation and osteoclastogenesis analyzed by lipid mediator profiling in the experimental arthritis. Sci. Rep. 11, 17312. doi: 10.1038/s41598-021-96530-1

[10] Zhang, L., Terrando, N., Xu, Z. Z., Bang, S., Jordt, S. E., Maixner, W., et al. (2018). Distinct analgesic actions of DHA and DHA-derived specialized pro-resolving mediators on post-operative pain after bone fracture in mice. Front. Pharmacol. 9. doi: 10.3389/fphar.2018.00412

[11] Luo, X., Gu, Y., Tao, X., Serhan, C. N., and Ji, R. R. (2019). Resolvin D5 Inhibits Neuropathic and Inflammatory Pain in Male But Not Female Mice: Distinct Actions of D-Series Resolvins in Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. Front. Pharmacol. 10. doi: 10.3389/fphar.2019.00745

[12] Baggio, D. F., da Luz, F. M. R., Lopes, R. V., Ferreira, L. E. N., Araya, E. I., and Chichorro, J. G. (2023). Sex Dimorphism in Resolvin D5-induced Analgesia in Rat Models of Trigeminal Pain. J. Pain 24, 717–729. doi: 10.1016/j.jpain.2022.12.013

[13] Nag, S., and Mokha, S. S. (2006). Activation of α2-adrenoceptors in the trigeminal region produces sex-specific modulation of nociception in the rat. Neuroscience 142, 1255–1262. doi: 10.1016/j.neuroscience.2006.07.012

[14] Thompson, A. D., Angelotti, T., Nag, S., and Mokha, S. S. (2008). Sex-specific modulation of spinal nociception by α2-adrenoceptors: Differential regulation by estrogen and testosterone. Neuroscience 153, 1268–1277. doi: 10.1016/j.neuroscience.2008.03.008

[15] Li, L., Hao, J. X., Fredholm, B. B., Schulte, G., Wiesenfeld-Hallin, Z., and Xu, X. J. (2010). Peripheral adenosine A2A receptors are involved in carrageenan-induced mechanical hyperalgesia in mice. Neuroscience 170, 923–928. doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.07.045

[16] Chow, L. H., Chen, Y. H., Wu, W. C., Chang, E. P., and Huang, E. Y. K. (2016). Sex difference in oxytocin-induced anti-hyperalgesia at the spinal level in rats with intraplantar carrageenan-induced inflammation. PLoS One 11. doi: 10.1371/journal.pone.0162218

[17] Tobacman, J. K. (2001). Review of harmful gastrointestinal effects of carrageenan in animal experiments. Environ. Health Perspect. 109, 983–994. doi: 10.1289/ehp.01109983

[18] Chen, H., Wang, F., Mao, H., and Yan, X. (2014). Degraded λ-carrageenan activates NF-κB and AP-1 pathways in macrophages and enhances LPS-induced TNF-α secretion through AP-1. Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj. 1840, 2162–2170. doi: 10.1016/j.bbagen.2014.03.011

[19] Bhattacharyya, S., Dudeja, P. K., and Tobacman, J. K. (2008). Carrageenan-induced NFκB activation depends on distinct pathways mediated by reactive oxygen species and Hsp27 or by Bcl10. Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj. 1780, 973–982. doi: 10.1016/j.bbagen.2008.03.019

[20] Tsuji, R. F., Hoshino, K., Noro, Y., Tsuji, N. M., Kurokawa, T., Masuda, T., et al. (2003). Suppression of allergic reaction by λ-carrageenan: Toll-like receptor 4/MyD88-dependent and -independent modulation of immunity. Clin. Exp. Allergy 33, 249–258. doi: 10.1046/j.1365-2222.2003.01575.x

[21] Vegeto, E., Cuzzocrea, S., Crisafulli, C., Mazzon, E., Sala, A., Krust, A., et al. (2010). Estrogen receptor-α as a drug target candidate for preventing lung inflammation. Endocrinology 151, 174–184. doi: 10.1210/en.2009-0876.

[22] Bouhadoun, A., Manikpurage, H. D., Deschildre, C., Zalghout, S., Dubourdeau, M., Urbach, V., et al. (2023). DHA, RvD1, RvD5, and MaR1 reduce human coronary arteries contractions induced by PGE2. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 165. doi: 10.1016/j.prostaglandins.2022.106700

[23] Miyahara, T., Runge, S., Chatterjee, A., Chen, M., Mottola, G., Fitzgerald, J. M., et al. (2013). D-series resolvin attenuates vascular smooth muscle cell activation and neointimal hyperplasia following vascular injury. FASEB J. 27, 2220–2232. doi: 10.1096/fj.12-225615

[24] Arnardottir, H., Thul, S., Pawelzik, S. C., Karadimou, G., Artiach, G., Gallina, A. L., et al. (2021). The resolvin D1 receptor GPR32 transduces inflammation resolution and atheroprotection. J. Clin. Invest. 131. doi: 10.1172/JCI142883

[25] Gobbetti, T., Dalli, J., Colas, R. A., Canova, D. F., Aursnes, M., Bonnet, D., et al. (2017). Protectin D1n-3 DPA and resolvin D5n-3 DPA are effectors of intestinal protection. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 114, 3963–3968. doi: 10.1073/pnas.1617290114

[26] Louwe, P. A., Badiola Gomez, L., Webster, H., Perona-Wright, G., Bain, C. C., Forbes, S. J., et al. (2021). Recruited macrophages that colonize the post-inflammatory peritoneal niche convert into functionally divergent resident cells. Nat. Commun. 12. doi: 10.1038/s41467-021-21778-0

[27] Ray, A., and Dittel, B. N. (2010). Isolation of mouse peritoneal cavity cells. J. Vis. Exp., 1488. doi: 10.3791/1488

[28] Baggio, D. F., da Luz, F. M. R., Lopes, R. V., Ferreira, L. E. N., Araya, E. I., and Chichorro, J. G. (2023). Sex Dimorphism in Resolvin D5-induced Analgesia in Rat Models of Trigeminal Pain. J. Pain 24, 717–729. doi: 10.1016/j.jpain.2022.12.013

[29] Flak, M. B., Koenis, D. S., Sobrino, A., Smith, J., Pistorius, K., Palmas, F., et al. (2020). GPR101 mediates the pro-resolving actions of RvD5n-3 DPA in arthritis and infections. J. Clin. Invest. 130, 359–373. doi: 10.1172/JCI131609

[30] Leão, F. F., Waltrick, A. P. F., Verri, W. A., da Cunha, J. M., and Zanoveli, J. M. (2022). Resolvin D5 disrupts anxious- and depressive-like behaviors in a type 1 diabetes mellitus animal model. Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol. 395. doi: 10.1007/s00210-022-02274-8

[31] Baker, R. G., Hayden, M. S., and Ghosh, S. (2011). NF-κB, inflammation, and metabolic disease. Cell Metab. 13, 11–22. doi: 10.1016/j.cmet.2010.12.008

[32] Hanada, T., and Yoshimura, A. (2002). Regulation of cytokine signaling and inflammation. Cytokine Growth Factor Rev. 13, 413–421. doi: 10.1016/S1359-6101(02)00026-6

[33] Cunha, T. M., Verri, W. A., Silva, J. S., Poole, S., Cunha, F. Q., and Ferreira, S. H. (2005). A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 102, 1755–1760. doi: 10.1073/pnas.0409225102

[34] Fattori, E., Cappelletti, M., Costa, P., Sellitto, C., Cantoni, L., Carelli, M., et al. (1994). Defective inflammatory response in interleukin 6-deficient mice. J. Exp. Med. 180, 1243–1250. doi: 10.1084/jem.180.4.1243

[35] Lopes, A. H., Silva, R. L., Fonseca, M. D., Gomes, F. I., Maganin, A. G., Ribeiro, L. S., et al. (2020). Molecular basis of carrageenan-induced cytokines production in macrophages. Cell Commun. Signal. 18. doi: 10.1186/s12964-020-00621-x

ANEXOS

ANEXO A

Universidade Estadual de Londrina

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 152/2016 **Londrina, 15 de Julho de 2016.**

Prezado Pesquisador,

Certificamos que o projeto intitulado **"Avaliação dos mecanismos analgésicos e anti-inflamatórios dos mediadores lipídicos pró-resolução resolvina D5 (RvD5), maresina 2 (Mar2), protectina (PD1), 15-epi-lipoxina A4 (ATLA4) em modelos de dor e inflamação"**, protocolo CEUA nº **11145.2016.54**, sob a responsabilidade de **Waldiceu Aparecido Verri Junior**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL), em reunião realizada em **05/07/2016**.

O objetivo do projeto investigar os mecanismos dos resolvina D5 (RvD5), maresina 2 (Mar2), protectina (PD1), 15-epi-lipoxina A4 (ATLA4) em modelos de dor induzidos por formalina, carragenina, adjuvante completo de Freund (CFA) e LPS. Os animais serão divididos em gaiolas de polipropileno padrão medindo 41 X 34 X 16 CM. (Insight®) no biotério de acordo com os grupos experimentais (máximo de 12 animais por gaiola), com livre acesso à água e ração e serão adaptados aos ambientes e condições experimentais com pelo menos 1 hora de antecedência em relação aos experimentos. Os procedimentos de cuidado e manuseio de animais estarão de acordo com as diretrizes da Associação Internacional de Estudo da Dor (IASP). Para o tratamento intratecal, os animais serão anestesiados com isoflurano, via inalatória. Os animais são eutanasiados por inalação de isoflurano (3% em O_2) seguido de decaptação para coleta das amostras. GI 2.

Vigência do Projeto	01/01/2017 a 01/12/2022
Espécie/linhagem	Camundongo heterogênico / Swiss
Nº de animais	1296
Peso/idade	20-25 g / 2 meses
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central / UEL
Amostras a serem coletadas	Tecido plantar cutâneo, lavado peritoneal

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

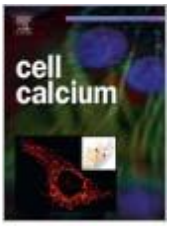
Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessária. Sem mais para o momento, subscrevo, cordialmente.

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

Ilmo. Sr.
Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verri Junior
Coordenador do Projeto
Departamento de Ciências Patológicas / Centro de Ciências Biológicas
Com cópia para Coord. do Biotério Central/UEL: Chefe do Departamento de Ciências Patológicas e Diretor(a) do Centro de Ciências Biológicas

ANEXO B

Cell Calcium
Volume 119, May 2024, 102870



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 [a]

Show more

+ Add to Mendeley Share Cite

https://doi.org/10.1016/j.ceca.2024.102870 Get rights and content