



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

AMANDA MARTINS DIONISIO

**AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS ANALGÉSICOS E ANTI-  
INFLAMATÓRIOS DO MEDIADOR LIPÍDICO PRÓ-  
RESOLUÇÃO MARESINA 2 EM MODELO DE DOR  
INDUZIDO POR FORMALINA**

AMANDA MARTINS DIONISIO

**AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS ANALGÉSICOS E ANTI-  
INFLAMATÓRIOS DO MEDIADOR LIPÍDICO PRÓ-  
RESOLUÇÃO MARESINA 2 EM MODELO DE DOR  
INDUZIDO POR FORMALINA**

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verri Júnior.

Londrina  
2022

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

Dionisio, Amanda Martins.

Avaliação dos mecanismos analgésicos e anti-inflamatórios do mediador lipídico pró-resolução maresina 2 em modelo de dor induzido por formalina / Amanda Martins Dionisio. - Londrina, 2022.  
60 f. : il.

Orientador: Waldiceu Aparecido Verri Júnior.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2022.

Inclui bibliografia.

1. Dor - Tese. 2. Inflamação Neurogênica - Tese. 3. Resolução da Inflamação - Tese. 4. CGRP - Tese. I. Verri Júnior, Waldiceu Aparecido . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDU 61

AMANDA MARTINS DIONISIO

**AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS ANALGÉSICOS E ANTI-  
INFLAMATÓRIOS DO MEDIADOR LIPÍDICO PRÓ-  
RESOLUÇÃO MARESINA 2 EM MODELO DE DOR  
INDUZIDO POR FORMALINA**

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

Dra. Ana Carolina Rossaneis  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

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

Londrina 18 de novembro de 2022.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente aos meus pais, Luciana e Wilson, pois sem seu apoio, compreensão e dedicação, tão essenciais para meu crescimento e minhas conquistas.

Agradeço ao meu orientador por todas as oportunidades proporcionadas durante os anos da graduação e mestrado, paciência e dedicação para meu crescimento.

Agradeço a Mariana B. e Tiago Z. por toda a ajuda com os experimentos por todos estes anos, que iam até tarde da noite e que aconteciam também em feriados e fins de semana. Serei sempre grata pelo apoio.

Agradeço também a todo o Laboratório de Dor, Inflamação, Neuropatia e Câncer, pelas ajudas em experimentos, ensinamentos e por tornarem divertidos e mais leves até mesmo momentos desafiadores e cansativos.

Agradeço a Julia B., minha parceira de mestrado, com quem pude dividir as dificuldades e felicidades da pós-graduação.

Agradeço a minha amiga Ketlem A., pela amizade e apoio sempre presentes mesmo com a correria da vida.

Agradeço a todos os membros da banca pela disponibilidade e contribuições.

Agradeço, por fim, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado, e aos órgãos de fomento Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) e Fundação Araucária pelo financiamento do projeto.

Dedico este trabalho aos meus pais, por quem  
sinto profundo amor, carinho e gratidão.

## RESUMO

DIONISIO, Amanda Martins. **Avaliação dos mecanismos analgésicos e anti-inflamatórios do mediador lipídico pró-resolução maresina 2 em modelo de dor induzido por formalina**. 2022. 57 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

A dor é considerada um dos cinco sinais cardinais da inflamação e pode afetar negativamente a vida de milhares de pessoas, sendo que os tratamentos atuais possuem efeitos colaterais que prejudicam sua aderência. Desta forma, novas abordagens terapêuticas se fazem necessárias. O lipídeo pró-resolução maresina 2 (MaR2) tem demonstrado possuir ação analgésica e anti-inflamatória em baixas doses (nanogramas). Desta forma, estabeleceu-se como objetivo avaliar a capacidade analgésica e anti-inflamatória da MaR2, bem como seus mecanismos, em modelo de dor induzido por formalina. Para isto, avaliou-se a dor manifesta, hiperalgesia mecânica, ativação de neurônios do DRG através da ativação de canais TRPA1 (receptor de potencial transitório anquirina do tipo 1), ativação neuronal na medula espinal por colocalização de ERK fosforilado (pERK), recrutamento de neutrófilo e macrófago próximo a fibras CGRP<sup>+</sup> no tecido plantar e expressão de CGRP por imunofluorescência, e parâmetros histopatológicos de tecido plantar. A MaR2 diminuiu a dor manifesta e hiperalgesia mecânica induzidas pelo estímulo com a formalina, bem como inibiu a ativação de TRPA1 de neurônios do DRG e reduziu o número de neurônios positivos a pERK. O recrutamento de neutrófilos e macrófagos próximos a fibras CGRP<sup>+</sup> foram reduzidos assim como a expressão de CGRP pela MaR2. O tratamento com MaR2 também reduziu o recrutamento de células inflamatórias e proliferação vascular analisados por histologia. Assim, este estudo demonstra as propriedades antinociceptiva e anti-inflamatórias da MaR2 e demonstra seus mecanismos centrais e periféricos de ação.

**Palavras-chave:** TRPA1; CGRP; ERK; inflamação neurogênica; dor.

## ABSTRACT

DIONISIO, Amanda Martins. **Evaluation of analgesic and anti-inflammatory mechanisms of pro-resolvin mediator MaR2 in formalin-induced pain model.** 2022. 57 p. Dissertation (Master's degree in Health Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

Pain is one of the five cardinal signals of inflammation and negatively affects thousands of people's lives, and current treatments present side effects that limits its usage. Therefore, new therapeutic approaches are necessary. The pro-resolving lipid maresin 2 has demonstrated analgesic and anti-inflammatory activity at low doses (nanograms). Thus, the aim of this study was to evaluate the analgesic and anti-inflammatory properties of MaR2, as well as its mechanisms, in pain model induced by formalin. For that, we evaluated the over pain-like behavior, mechanical hyperalgesia, DRG neurons activation through TRPA1 (transient receptor potential ankyrin 1) channel activation, activation of spinal cord neurons by colocalization with phosphorylated ERK (pERK), neutrophil and macrophage recruitment close to CGRP<sup>+</sup> fibers in hind paw tissue and CGRP expression by immunofluorescence, and histopathological parameters of hind paw tissue. MaR2 reduced the overt pain-like behavior and the mechanical hyperalgesia induced by the formalin stimuli, inhibited TRPA1 activation in DRG neurons, and reduced neurons pERK<sup>+</sup>. Neutrophil and macrophage recruitment close to CGRP<sup>+</sup> fibers and CGRP expression was reduced by MaR2. Treatment with MaR2 reduced inflammatory cells recruitment and vascular proliferation analyzed by histology. Thus, this study shows the antinociceptive and anti-inflammatory properties of MaR2 and demonstrates its central and peripheral mechanisms.

**Key words:** TRPA1, CGRP, ERK; neurogenic inflammation, pain.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1** – Biossíntese das maresinas a partir do ácido docosahexaenóico ...17

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Critério dos escores utilizados para avaliação histológica .....	22
<b>Tabela 2</b> – Sumário das análises estatísticas .....	23

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AITC	Isotiocianato de alila
BSA	Albumina sérica bovina
CEUA	Comissão de Ética para o Uso de Animais
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
DRG	Gânglio da raiz dorsal ( do inglês dorsal root ganglion)
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
IASP	Associação Internacional de Estudo da Dor
IL-6	Interleucina 6
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 beta
IL-8	Interleucina 8
IL-33	Fator de Interleucina 33
JNK	c-Jun N-terminal
LPS	Lipopolissacarídeo
MaR2	Maresin 2
OCT	Optimal cutting temperature
pERK	Quinase regulada por sinal extracelular fosforilada
PFA	Paraformaldeído
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
TRP	Receptor de potencial transitório
TRPA1	Receptor de potencial transitório anquirina do tipo 1
TRPV1	Receptor de potencial transitório vanilóide do tipo 1
UV	Ultravioleta

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
1.1	INFLAMAÇÃO AGUDA E DOR .....	12
1.2	INFLAMAÇÃO NEUROGÊNICA E Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina (CGRP) .....	13
1.3	MODELO DE DOR ANIMAL INDUZIDO POR FORMALINA .....	14
1.4	RECEPTOR DE POTENCIAL TRANSITÓRIO ANQUIRINA DO TIPO 1 (TRPA1) .....	15
1.5	QUINASE REGULADA POR SINAL EXTRACELULAR (ERK).....	15
1.6	LIPÍDEO PRÓ-RESOLUÇÃO MARESINA 2 .....	16
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	18
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	19
3.1	OBJETIVOS GERAIS .....	19
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	19
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	20
4.1	ANIMAIS .....	20
4.2	PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS .....	20
4.3	TESTE DA FORMALINA.....	20
4.4	HIPERALGESIA MECÂNICA .....	21
4.5	HISTOLOGIA.....	21
4.6	IMUNOFLOURESCÊNCIA .....	22
4.7	IMAGEAMENTO DE $Ca^{2+}$ INTRACELULAR .....	23
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	23
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	25
5.1	ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO .....	26
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	49
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	50

<b>ANEXOS</b> .....	56
ANEXO A – Comitê de Ética no Uso de Animais.....	57

# 1 1 INTRODUÇÃO

## 2 1.1 Inflamação Aguda e Dor

3  
4 A inflamação aguda é uma resposta protetora do organismo frente a  
5 uma agressão ou infecção para eliminar a causa da lesão tecidual e tentar restaurar  
6 a homeostasia. Porém, para que a inflamação mantenha seu papel protetor é preciso  
7 que seja autolimitada e chegue a uma resolução para que se ocorra o reparo tecidual.  
8 Sabe-se que a inflamação possui cinco sinais cardinais: calor, rubor, inchaço, dor e  
9 perda de função (PUNCHARD; WHELAN; ADCOCK, 2004). A resposta inflamatória  
10 envolve eventos vasculares e celulares. As reações vasculares são uma das primeiras  
11 a ocorrer. A vasodilatação, que a princípio causa aumento do fluxo sanguíneo, o qual  
12 pode ser percebido externamente por calor e vermelhidão, são dois dos sinais  
13 cardinais da inflamação. Além disto, há o aumento da permeabilidade vascular com  
14 consequente saída de exsudato (rico em proteínas e células) e formação de edema.  
15 Com a vasodilatação aliada a perda de fluídos, o sangue se torna mais viscoso e o  
16 fluxo sanguíneo diminui, resultando na estase. Isto permite que leucócitos sofram o  
17 processo de marginação, seguido de adesão (transitória), rolamento e então aderem  
18 (firmemente) para migrarem através do endotélio para o tecido em um processo  
19 denominado diapedese (KUMAR; ASTER; ABBAS, 2016) .

20 Durante o processo inflamatório há a liberação de diversos  
21 mediadores inflamatórios como prostaglandinas (PGE2 e PGI2) e citocinas (IL-6, IL-  
22 1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ) que agem nos nociceptores, mediando a dor inflamatória (FERREIRA,  
23 1972; PINHO-RIBEIRO *et al.*, 2015; RONCHETTI; MIGLIORATI; DELFINO, 2017;  
24 VALÉRIO *et al.*, 2009). A dor é definida pela Associação Internacional de Estudo da  
25 Dor (IASP) como uma experiência não apenas sensorial, mas também emocional, e  
26 desagradável associada a um dano tecidual potencial ou efetivo. Os neurônios  
27 sensoriais nociceptivos estão presentes nos tecidos periféricos e fazem a transdução  
28 de sinais externos nocivos e transmitem essa informação à medula espinal, que será  
29 retransmitida a níveis supra espinais (VERRI *et al.*, 2006a). Estes nociceptores podem  
30 ser divididos em três classes: mecânicos, térmicos e polimodais. Os nociceptores  
31 mecânicos possuem axônios A $\delta$  (delta), são finamente mielinizados, e são ativados  
32 por pressão intensa. Os nociceptores térmicos também possuem fibra A $\delta$  e são  
33 ativados por extremos de temperatura. Por outro lado, os nociceptores polimodais são

34 ativados tanto pelos estímulos térmicos e mecânicos quanto por estímulos químicos  
35 nocivos. Estes nociceptores possuem axônio tipo C e não possuem mielina,  
36 conduzindo a informação nociceptiva mais lentamente que os anteriormente citados  
37 (BASBAUM; JESSEL, 2014).

38

## 39 **1.2 Inflamação Neurogênica e Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina** 40 **(CGRP)**

41

42 O processo inflamatório pode envolver a participação dos  
43 nociceptores primários, o que caracteriza a inflamação neurogênica. A participação  
44 destas fibras aferentes primárias na inflamação é possível dada sua morfologia  
45 pseudounipolar, no qual seu axônio bifurca-se e se projeta tanto em direção a  
46 periférica quanto ao corno dorsal da medula espinal. Esta morfologia característica  
47 permite que proteínas produzidas no gânglio possam migrar não apenas em direção  
48 aos terminais nervosos centrais, mas também para os terminais nervosos livres  
49 periféricos. Estes terminais periféricos que, através da liberação de neuropeptídeos  
50 tais como substância P e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), são  
51 responsáveis por originar a inflamação neurogênica com consequente aparecimento  
52 de sinais inflamatórios como edema, rubor e calor. Mediadores pró-inflamatórios como  
53 prostaglandinas e histamina liberados após lesão tecidual ativam os nociceptores  
54 primários e desencadeiam o reflexo axonal, que consiste na liberação de substância  
55 P e CGRP em um terminal livre adjacente do mesmo axônio e a liberação destes  
56 neuropeptídeos acarreta um aumento de mediadores pró-inflamatórios. (BASBAUM;  
57 JESSEL, 2014; IYENGAR, OSSIPOV, JOHNSON, 2017; BASBAUM *et al.*, 2009).  
58 Rosa e Fantozzi (2013) reforçam a correlação entre histamina e CGRP visto que este  
59 neuropeptídeo demonstrou induzir a liberação de histamina pelos mastócitos, a qual,  
60 por sua vez, induz também à liberação de CGRP, estabelecendo um loop de feedback  
61 positivo que potencializa a inflamação neurogênica e a sensibilização periférica.

62 O CGRP, a nível periférico, tem ação vasodilatadora microvascular  
63 potente que age mediando não apenas a vasodilatação neurogênica, com  
64 consequente aparecimento dos sinais inflamatórios anteriormente citados, mas  
65 também o recrutamento de células inflamatórias (CHOI; DI NARDO, 2018; SOUSA-  
66 VALENTE; BRAIN, 2018). Além disto, a relação entre CGRP e dor foi observada em  
67 estudo, no qual notou-se que o uso do antagonista de CGRP preveniu a hiperalgesia

68 térmica e mecânica induzida pela capsaicina (MASSAAD *et al.*, 2004). Além disto,  
69 camundongos geneticamente modificados com nocaute do éxon 5 do gene CT-CGRP  
70 (CGRP<sup>-/-</sup>) foram utilizados por Salmon e colaboradores (2001) no teste da formalina,  
71 no qual observaram que estes camundongos apresentaram redução no tempo de  
72 lambida de pata em ambas as fases do teste.

73

### 74 **1.3 Modelo de Dor Animal Induzido por Formalina**

75

76 Em estudos de dor em animais dois principais sintomas são avaliados:  
77 a dor manifesta e a hiperalgesia. Na dor manifesta o animal apresenta  
78 comportamentos claros de dor após o estímulo como sacudidas e lambidas de pata,  
79 enquanto que para se avaliar a dor na hiperalgesia é necessário a aplicação de um  
80 estímulo adicional externo, mecânico ou térmico, para se observar o comportamento  
81 nociceptivo (MARTINEZ *et al.*, 2016). O modelo animal de dor induzida por formalina,  
82 conhecido por teste da formalina, induz dor manifesta que consiste em sacudida e  
83 lambida de pata após injeção intraplantar com solução de formaldeído diluído em  
84 salina (BORGHI *et al.*, 2013). Apesar de ser um estímulo comumente aplicado na pata,  
85 o teste da formalina também foi adaptado para avaliação de dor orofacial  
86 (CHICHORRO; LORENZETTI; ZAMPRONIO, 2004; CLAVELOU *et al.*, 1989)

87 O teste da formalina possui uma resposta nociceptiva bifásica na qual  
88 cada fase envolve mecanismos diferentes. A primeira fase (neurogênica), ocorre nos  
89 5 primeiros minutos após a injeção da formalina. Nesta fase, há a liberação de  
90 serotonina e histamina por mastócitos residentes e há a ação direta da formalina no  
91 nociceptor por meio da ativação dos receptores de potencial transitório anquirina do  
92 tipo 1 (TRPA1) presentes nestes neurônios sensoriais nociceptivos (MCNAMARA *et al.*,  
93 2007; PARADA *et al.*, 2001; VERRI *et al.*, 2006b). Entre a primeira e segunda fase  
94 ocorre um período de quiescência, conhecida por interfase. A segunda fase  
95 (inflamatória) é marcada pela participação de mediadores inflamatórios tais como  
96 prostaglandinas e citocinas IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-33 e IL-8, e ocorre de 10 a 30  
97 minutos após o estímulo da formalina na pata (CALIXTO-CAMPOS *et al.*, 2015;  
98 MARTINEZ *et al.*, 2016).

99 Além da sua utilidade para avaliar dor manifesta, o estímulo com  
100 formalina também induz hiperalgesia mecânica, a qual pode se manter por semanas  
101 após estímulo (FU; LIGHT; MAIXNER, 2001; SALINAS-ABARCA *et al.*, 2017).

102

#### 103 **1.4 Receptor de Potencial Transitório Anquirina Tipo 1**

104

105 O TRPA1, receptor de potencial transitório anquirina do tipo 1,  
106 pertence a grande família dos receptores de potencial transitório (TRP) e a subfamília  
107 anquirina (TRPA). A família TRP também é composta pelas subfamílias vanilóide  
108 (TRPV), canônica (TRPC), melastatina (TRPM), e mucolipina (TRPML) e policistinas  
109 (TRPP) (KATSIANOU *et al.*, 2018; KOIVISTO *et al.*, 2022). Expresso em nociceptores,  
110 o TRPA1 é altamente permeável ao cálcio ( $Ca^{2+}$ ), porém por ser um canal catiônico  
111 não seletivo, ele também é permeável a  $Na^+$  e  $K^+$ . Participa da transdução de sinais  
112 nocivos endógenos ou exógenos. Dentre estes sinais nocivos pode-se citar estímulos  
113 químicos, como compostos eletrofílicos: isotiocianato de alila (AITC) presente no  
114 wasabi e óleo de mostarda, alicina presente no alho e aldeídos como o formaldeído.  
115 Desta forma, é um canal que está associado a nocicepção (KÁDKOVÁ *et al.*, 2017;  
116 LOGASHINA *et al.*, 2019; VIANA, 2016; ZYGMUNT; HÖGESÄTTT, 2014). A ativação  
117 do TRPA1 pelo seus agonistas desencadeia a despolarização do nociceptor e  
118 promove a excitação de neuropeptídeos como o CGRP, substância P e neuroquinina  
119 A na periferia desencadeando a inflamação neurogênica e amplificando a nocicepção  
120 (KÁDKOVÁ *et al.*, 2017).

121

#### 122 **1.5 Quinase Regulada por Sinal Extracelular (ERK)**

123

124 A transdução de diversos sinais extracelulares é promovida pela  
125 grande família das proteínas quinase ativadas por mitógeno (MAPK). Dentre os  
126 membros desta família está a quinase regulada por sinal extracelular (ERK), a p38 e  
127 a c-Jun N-terminal quinase (JNK), que agem por vias diferentes. As MAPK são  
128 ativadas por uma cascata de fosforilação (JI *et al.*, 2009). Atividades celulares como  
129 mitose e proliferação, por exemplo, são reguladas pela ERK 1 E 2. Porém, a ERK  
130 também tem sido relacionada a neuroplasticidade e dor, sendo este último em razão  
131 de que estímulos nocivos levam a sua ativação (GAO; JI, 2009; KONDO; SHIBUTA,  
132 2020). Atualmente, o ERK fosforilado (pERK) tem sido utilizado como marcador de  
133 ativação neuronal após estímulo nocivo (DAI *et al.*, 2004; KARIM *et al.*, 2006; LEE *et*  
134 *al.*, 2012; LI *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2018)

135

## 136 1.6 Lipídeo Pró-resolução Maresina 2

137

138 O processo de resolução da inflamação, antes considerado um  
139 processo passivo, o qual ocorria em decorrência da diluição de mediadores  
140 inflamatórios, com a identificação dos mediadores lipídicos pró-resolução, é tida hoje  
141 como um processo ativo que promove a restauração da homeostasia (FATTORI *et al.*,  
142 2020a; SERHAN, 2014; XU *et al.*, 2010). Estes mediadores são sintetizados  
143 biologicamente a partir de dos ácidos graxos ômega-3, e são divididas em quatro  
144 famílias: lipoxinas, resolvinas (séries E e D), protectinas e maresinas (FATTORI *et al.*,  
145 2020a). A família das maresinas é composta pela maresina 1 (MaR1) e maresina 2  
146 (MaR2). Derivadas do ácido docosahexaenóico (DHA) e biossintetizadas por  
147 macrófagos, as maresinas tem demonstrado ação anti-inflamatória e anti-nociceptiva  
148 (DENG *et al.*, 2014; SERHAN *et al.*, 2015). Em estudo recente, foi demonstrado que  
149 a MaR2 possui ação analgésica em diversos modelos de dor induzidos por  
150 lipopolissacarídeo (LPS), capsaicina e AITC em camundongos. O tratamento também  
151 inibiu a ativação de canais TRPA1 e TRPV1, bem como inibiu recrutamento  
152 leucocitário próximo a fibras CGRP<sup>+</sup> no tecido plantar induzido por LPS (FATTORI *et*  
153 *al.*, 2022a). Por fim, a MaR2 reduziu parâmetros inflamatórios como infiltrado  
154 inflamatório para o sítio de inflamação em modelos de peritonite por zimosan (DENG  
155 *et al.*, 2014) e em modelo de asma induzido por ovoalbumina (YU *et al.*, 2022).

156

157

158

159

160

161

162

163

164

165

166

167

168

169

170

171

**Figura 1.** Biossíntese das maresinas a partir do ácido docosahexaenóico

172

173

174

175

176

177

178

179

180

181

182

183

184

185

186

187

188

189

190

191

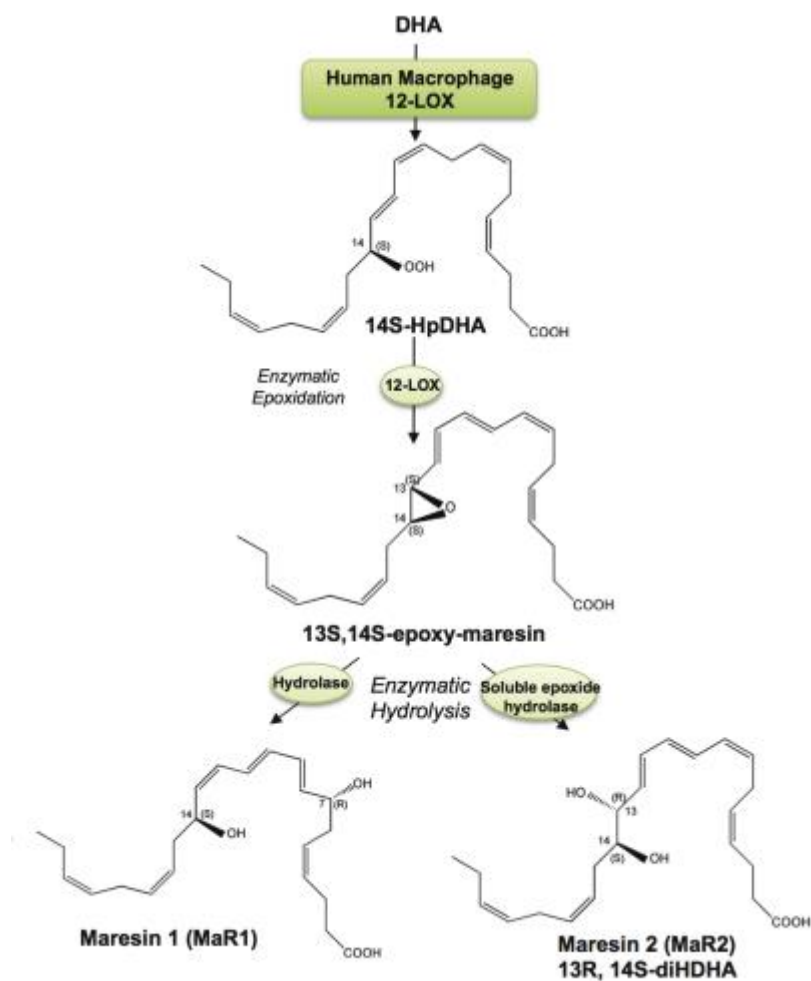
192

193

194

195

196

**Fonte:** Adaptado de DENG *et al.*, 2014.

## 197 2 JUSTIFICATIVA

198 A MaR2 reduz a ativação neuronal induzida por AITC pela via do TRPA1  
199 (FATTORI *et al.*, 2022b). Tendo em vista que o modelo da formalina é amplamente  
200 utilizado e é um modelo clássico de dor do qual depende da ativação de canais  
201 TRPA1, e que a inibição destes canais poderia reduzir a inflamação neurogênica,  
202 avaliamos o efeito da MaR2 e seus mecanismos no modelo de dor induzida por  
203 formalina em camundongos.

## 204 3 OBJETIVOS

### 205 3.1 OBJETIVOS GERAIS

206 Investigar os mecanismos analgésicos e anti-inflamatórios do mediador lipídico  
207 pró-resolução maresina 2 (MaR2) na modulação de nociceptores TRPA1 e CGRP-  
208 positivos no modelo de dor induzida por formalina.

### 209 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 210 • Avaliar o efeito da MaR2 sobre o número de sacudidas (flinches) de pata após  
211 estímulo com formalina 1,5% para determinação da dose mais eficaz do lipídeo  
212 (ensaio de dose-resposta);
- 213 • Avaliar o efeito da MaR2 na hiperalgesia mecânica induzida por formalina;
- 214 • Avaliar o efeito da MaR2 sobre recrutamento de leucócitos para o foco  
215 inflamatório e sua proximidade com nociceptores CGRP-positivos;
- 216 • Avaliar o escore histopatológico e infiltrado de células inflamatórias no tecido  
217 plantar;
- 218 • Verificar o efeito da MaR2 sobre a ativação neuronal pelos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$   
219 intracelular de neurônios dos gânglios da raiz dorsal;
- 220 • Determinar o efeito da MaR2 sobre a ativação neuronal na medula espinal  
221 através da quantificação de neurônios ERK-positivos.

222

## 223 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 224 4.1 ANIMAIS

225 Os experimentos foram realizados em camundongos Swiss machos (20-25 g),  
226 provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina e em  
227 camundongos Lysm e-GFP (heterozigoto) machos (20-25g), provenientes da  
228 Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Os animais  
229 foram mantidos no Biotério do Departamento de Ciências Patológicas em ciclo  
230 claro/escuro (12/12h), com temperatura controlada ( $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e livre acesso a água e  
231 ração por pelo menos dois dias antes dos experimentos. Os animais foram divididos  
232 em gaiolas de polipropileno padrão (41x34x16 cm) de acordo com os grupos  
233 experimentais (máximo de 12 animais por gaiola). Este projeto foi aprovado pela  
234 Comissão de Ética para o Uso de Animais da Universidade estadual de Londrina  
235 (CEUA nº 152/2016) e os procedimentos, cuidado e manuseio dos animais seguiram  
236 as diretrizes da Associação Internacional de Estudo da Dor (IASP).

### 237 4.2 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

238 Os animais receberam um pré-tratamento nas doses de 0,3; 1; 3 ou 10  
239 nanogramas (ng) de Maresina 2 (MaR2) ou veículo (salina + etanol) pela via intratecal  
240 (i.t., 10  $\mu\text{l}$ , entre os seguimentos espinais L4-L6), sob breve anestesia com isoflurano.  
241 Após 1 hora do tratamento com MaR2 ou veículo, os animais receberam o estímulo  
242 via intra-plantar (i.pl) de 25  $\mu\text{l}$  de formalina a uma concentração de 1,5%, como  
243 anteriormente descrito (BORGHI *et al.*, 2013).

### 244 4.3 TESTE DA FORMALINA

245 O efeito dose-resposta da MaR2 foi avaliado em modelo de dor manifesta  
246 induzida por formalina. Os animais receberam o pré-tratamento com MaR2 ou veículo  
247 e o estímulo com formalina 1,5% como descrito na seção *Protocolos Experimentais*.  
248 Após o estímulo, foram determinados o número de flinches de pata entre 0 e 30  
249 minutos. O período de avaliação foi dividido em intervalos de 5 min para observação  
250 da primeira e segunda fases, características do modelo. Os resultados foram

251 apresentados como a média ( $\pm$ EPM) dos flinches na primeira (0-5 min) e segunda fase  
252 (10-30 min). A partir deste teste, a dose que proporcionou o melhor efeito  
253 antinociceptivo foi escolhida para a realização dos demais experimentos.

#### 254 4.4 HIPERALGESIA MECÂNICA

255 Para avaliar a hiperalgesia mecânica foi utilizado o método eletrônico de von  
256 Frey, modificado por Cunha *et al* (2004) do método de von Frey filamentos (von FREY,  
257 1896). Os camundongos foram acomodados em caixas de acrílico com piso de grade  
258 metálica em uma sala silenciosa e com temperatura controlada 1 hora antes do início  
259 do teste. Este teste consiste na aplicação de uma pressão pontual crescente na  
260 superfície plantar da pata estimulada dos camundongos, utilizando uma ponteira de  
261 polipropileno com diâmetro de 0.5 mm<sup>2</sup> associada a um analgesímetro digital  
262 (Insight®) que registra a pressão necessária para evocar o movimento de retirada de  
263 pata pelo animal. A pressão necessária para evocar o movimento de retirada da pata  
264 pelo animal é registrada automaticamente em gramas (g). As medidas de hiperalgesia  
265 mecânica foram feitas antes do estímulo (baseline) e 2, 4 e 6 horas após o estímulo.  
266 Para cada tempo avaliado, foram consideradas a média de três medições. Os  
267 resultados obtidos foram apresentados em delta ( $\Delta$ ) de retirada de pata, calculados  
268 pela subtração dos valores obtidos após o estímulo do valor do baseline.

#### 269 4.5 HISTOLOGIA

270 O tecido plantar foi coletado 6 horas após o estímulo, fixado em formaldeído  
271 (10%) por 24 h e processados para inclusão em parafina. Seções longitudinais (5  $\mu$ m)  
272 foram preparadas e coradas com hematoxilina e eosina (H&E). As imagens das  
273 seções histológicas foram adquiridas digitalmente e analisadas por um  
274 experimentador cego ao tratamento utilizando um microscópio de luz na objetiva de  
275 40x (Olympus CX31RTSF, Tóquio, Japão) acoplado a uma câmera digital de alta-  
276 resolução. As análises de recrutamento leucocitário foram realizadas através do  
277 software ImageJ 1.53 para Windows (software em domínio público:  
278 <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) usando a ferramenta threshold e executadas em imagens  
279 RGB sem tratamento adicional. O recrutamento de leucócitos foi determinado pela  
280 intensidade de marcação por % de área demarcada. Os escores histopatológicos

281 também foram avaliados nos parâmetros de infiltrados inflamatórios e proliferação  
282 vascular (FERRAZ *et al.*, 2021), como descritos na **Tabela 1**.

283

284 **Tabela 1.** Critério dos escores utilizados para avaliação histológica.

Parâmetro histológico	Escore
Infiltrado Inflamatório	0 = sem inflamação 1 = inflamação leve 2 = inflamação moderada 3 = inflamação severa
Proliferação Vascular	0 = sem proliferação vascular 1 = proliferação vascular leve 2 = proliferação vascular moderada 3 = proliferação vascular severa

#### 285 4.6 IMUNOFLUORESCÊNCIA

286 A medula espinal (nos seguimentos L4-L6) e o tecido plantar foram dissecados  
287 2 e 6 horas após o estímulo, respectivamente. Em seguida, as amostras foram pós-  
288 fixadas em paraformaldeído (PFA, 4%) durante 24 horas e desidratadas em solução  
289 de sacarose 30% por 48 horas a 4°C. As amostras foram embebidas em optimal  
290 cutting temperature (OCT) e congeladas em nitrogênio líquido. Os blocos foram  
291 cortados a 10 ou 45µm de espessura (medula e pata, respectivamente) em um  
292 criostato e armazenados em ultra-freezer para posterior análise por  
293 imunofluorescência. Os cortes foram primeiro bloqueados com 5% de albumina sérica  
294 bovina (BSA) e 0,3% de Triton X-100 durante 1 hora à temperatura ambiente e,  
295 posteriormente, incubados overnight a 4°C com os seguintes anticorpos primários:  
296 anti-phospho-ERK 1/2 (Santa Cruz Biotechnology, EUA), anti-NeuN (Abcam, EUA) ou  
297 anti-CGRP (MilliporeSigma, Burlington, MA, USA). Os cortes foram lavados 3 vezes  
298 com PBS e incubados com os anticorpos secundários específicos (conjugados com  
299 Alexa Fluor 488 ou 647, Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, USA) e DAPI (Cayman  
300 Chemicals) por 2 horas a temperatura ambiente. As imagens foram feitas utilizando  
301 um microscópio confocal (SP8, Leica, Wetzlar, Alemanha) e examinadas utilizando o  
302 Software Leica LAS X.

303 4.7 IMAGEAMENTO DE  $Ca^{2+}$  INTRACELULAR

304 Os gânglios da raiz dorsal (GRD) de animais naïve foram dissecados e então  
 305 processados de acordo com Fattori *et al* (2019). Brevemente, os gânglios foram  
 306 processados e os corpos células dissociados para o imageamento de  $Ca^{2+}$   
 307 intracelular. O  $Ca^{2+}$  intracelular foi monitorado utilizando-se o indicador fluorescente  
 308 de  $Ca^{2+}$  fluo 4 AM (Molecular Probes). As células foram carregadas com 1,2  $\mu$ M de  
 309 fluo-4 AM por 1 h a temperatura ambiente, lavadas 3 vezes e deixadas para de-  
 310 esterificar por aproximadamente 15 minutos em solução salina tampão de Hank com  
 311 HEPES a 10mM. As células receberam pré-tratamento com MaR2 na dose de 100nM  
 312 30 minutos antes da aquisição de imagens. A fluorescência foi mensurada por meio  
 313 do microscópio confocal (SP8, Leica, Wetzlar, Alemanha) com laser Argon à 488 nm.  
 314 A formalina foi administrada diretamente na cultura de neurônios a uma concentração  
 315 de 0,015% durante a aquisição de imagens com auxílio de uma micropipeta.

## 316 4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

317 Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  EPM (erro padrão da média).  
 318 A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk. Para os dados que  
 319 apresentaram distribuição normal, utilizou-se os testes de One-way ANOVA ou Two-  
 320 way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey. Para os dados sem distribuição  
 321 normal, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do teste de  
 322 Dunn. Para os dados do imageamento de cálcio, foi utilizado Two-way RM (repeated  
 323 measures) ANOVA. A **Tabela 2** sumariza a análise estatística utilizada em cada  
 324 experimento. Foram consideradas significativas diferenças para  $P < 0,05$ .

325

326 **Tabela 2.** Sumário das análises estatísticas

Experimento	Teste Estatístico	Pós-teste
Teste da formalina	One-Way ANOVA	Tukey
Hiperalgisia Mecânica	Two-Way ANOVA	Tukey
Histologia	Recrutamento de Leucócitos	Tukey
	Escore Histopatológico	Kruskal-Wallis
Imunofluorescência	One-Way ANOVA	Tukey

Imageamento de Ca <sup>2+</sup> Intracelular	Two-Way RM ANOVA	Tukey
--	------------------	-------

**327 5 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO**

328 O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Dor, Inflamação,  
329 Neuropatia e Câncer da Universidade Estadual de Londrina e segue as normas da  
330 revista Neuropharmacology, ISSN: 18737064 e fator de impacto de 5,273. Os  
331 resultados parciais estão descritos no artigo intitulado “Maresin 2 targets TRPA1  
332 channel to reduce formalin nociception and neurogenic inflammation in mice.”

333

334

335

336

337

338

339

340

341

342

343

344

345

346

347

348

349

350

351

352

353

354

355

356

357

358

359

360 **Maresin 2 targets TRPA1 channel to reduce formalin nociception and neurogenic**  
361 **inflammation in mice.**

362

363 Amanda M. Dionisio<sup>1\*</sup>, Mariana M. Bertozzi<sup>1</sup>, Tiago H. Zaninelli<sup>1</sup>, Telma S. Santos<sup>1</sup>,  
364 Anelise Franciosi<sup>1</sup>, Julia B. Souza<sup>1</sup>, Waldiceu A. Verri. Jr<sup>1\*</sup>.

365

366 <sup>1</sup>Laboratory of Pain, Inflammation, Neuropathy, and Cancer, Department of Pathology,  
367 Center of Biological Sciences, Londrina State University, Londrina, Paraná, Brazil

368

369 Corresponding author:

370 Prof. Waldiceu A. Verri Jr, PhD and Amanda M. Dionisio

371

372 Present address: Departamento de Ciências Patológicas, Universidade Estadual de  
373 Londrina,

374 Rodovia Celso Garcia Cid Km480 PR445, Zip Code 86057-970, Post-office box  
375 10.011, Londrina, Paraná, Brasil.

376 Phone: +55 43 3371 4979.

377 Fax: +55 43 3371 4387.

378 E-mails: WAVJR: waverri@uel.br or waldiceujr@yahoo.com.br;

379 AMD: amandadionisio@gmail.com or amanda.dionisio@uel.br.

380

381

382

383

384

385

386

387

388

389

390

391

392

393

**Abstract**

395

396 The physiological pain is protective to warn us of potential or effective tissue lesion.  
397 After tissue lesion, an inflammatory response is established and might be  
398 accompanied by pain, considered one of the cardinal signals of inflammation, along  
399 with edema, redness, warmth, and loss of function. Current pain treatments possess  
400 limitations due to their side effects. In contrast, pro-resolution lipids have shown  
401 analgesic and anti-inflammatory properties with no side effects. Thus, we aimed to  
402 evaluate the Maresin 2, a pro-resolution lipid, analgesic effect, and mechanisms of  
403 action using the formalin test pain model. Swiss received different doses of MaR2  
404 pretreatment, at nanograms range, via intrathecal before the 1,5% formalin stimulus  
405 via intraplantar. The number of flinches was quantified for 30 min, the mechanical  
406 hyperalgesia was assessed 2, 4, and 6 h after the stimulus. Spinal cord was collected  
407 for ERK 1/2 activation analyses by immunofluorescence and hind paw skin was  
408 collected for histological analyses. To evaluate neutrophil and macrophage recruitment  
409 close to CGRP<sup>+</sup> fibers by immunofluorescence, Lysm e-GFP mice hind paw skin was  
410 collected. Calcium imaging of naïve DRG neurons was used to assess MaR2 action in  
411 TRPA1 channels of nociceptors. MaR2 reduced the overt pain-like behavior and  
412 mechanical hyperalgesia induced by formalin, as well as ERK 1/2 phosphorylation,  
413 leucocyte recruitment and histopathological scores, neutrophil and macrophage  
414 infiltration close to CGRP<sup>+</sup> fibers, and CGRP expression, and inhibited TRPA1  
415 activation. In summary, this study shows the analgesic and anti-inflammatory  
416 properties of MaR2 and elucidates its peripheral and central mechanisms.

417

418

419 **Keywords:** Pain. Neurogenic Inflammation. TRPA1. CGRP. Specialized Pro-  
420 Resolving Lipid Mediator

421

422

423

424

425

426

427

## 428 1. Introduction.

429

430 The formalin test, first introduced in 1977 (Dubuisson and Dennis, 1977), is an  
431 acute nociceptive model commonly used to evaluate the analgesia of treatments and  
432 its possible mechanisms of action. The formalin stimulus is usually injected  
433 subcutaneously in the animal paw and elicits a stereotyped overt pain behavior  
434 consisting of paw licking and flinching. Moreover, this model produces a characteristic  
435 two phases of overt pain behavior, a neurogenic (first) phase and an inflammatory  
436 (second) phase, which permits to exploit the mechanisms involved in analgesia. In  
437 addition, the formalin test also evokes long-lasting mechanical hyperalgesia that starts  
438 hours after the injection and lasts for weeks (Fu et al., 2001; Salinas-Abarca et al.,  
439 2017).

440 The activation of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1), expressed in  
441 primary nociceptors, possesses an essential role in the neurogenic phase of the  
442 formalin stimulus. Formalin direct acts in the nociceptor through TRPA1 activation  
443 (McNamara et al., 2007). TRPA1 is an ion channel highly permeable for  $\text{Ca}^{2+}$  and  
444 associated to the transduction of noxious chemical stimuli such as allyl isothiocyanate  
445 (AITC), allicin, sulfur mustard, etc. (Stenger et al., 2017; Viana, 2016).

446 Extracellular signal-related mitogen 1 and 2 (ERK 1/2), along with p-38 and c-Jun  
447 N-terminal kinase (JNK), is a member of the mitogen-activated protein kinase (MAPK)  
448 family. MEK is the upstream kinase of ERK, and its phosphorylation is necessary for  
449 the sequential activation of ERK. (Ji et al., 2009) ERK is considered a marker of  
450 neuronal activation after noxious stimuli (Gao and Ji, 2009) and is widely used in  
451 formalin model studies (Karim et al., 2006; Lee et al., 2012; Li et al., 2010; Zhang et  
452 al., 2018).

453 After the tissue injury, the release of pro-inflammatory mediators (e.g.,  
454 chemokines, prostaglandins, etc.) promotes leucocyte infiltration. Moreover, leucocyte  
455 infiltration is also elicited by neurogenic inflammation through release of  
456 neuropeptides, such as CGRP, by nociceptors (Russell et al., 2014). It is known that  
457 mediators released by immune cells promotes pain by sensitizing nociceptors (Pinho-  
458 Ribeiro et al., 2017), which highlights the importance of neuron-immune interaction in  
459 pain as well as an important approach to treating pain.

460 Maresin 2 (MaR2) and Maresin 1 are specialized pro-resolving mediators of the  
461 Maresin family. Maresins are synthesized by macrophages from the docosahexaenoic

462 acid, and present anti-inflammatory, analgesic, and pro-resolution properties (Deng et  
463 al., 2014a). Recently, our group demonstrated the MaR2 reduces pain in  
464 lipopolysaccharide (LPS), capsaicin, and AITC pain models (Fattori et al., 2022a). The  
465 anti-inflammatory activity of MaR2 was assessed in ovalbumin model of asthma.  
466 Treatment with MaR2 reduced leucocyte infiltration, activation of inflammasome  
467 NLRP3, and cytokine production (Yu et al., 2022). Reduction in the infiltration of  
468 immune cells in zymosan peritonitis model was also demonstrated (Deng et al.,  
469 2014a).

470 Pain reduces patient quality of life and current pain treatments present side effects  
471 that limits its usage, e.g., enhancement of infection susceptibility due to  
472 immunosuppression (Fattori et al., 2020a; Orlicka et al., 2013). In contrast, studies  
473 have shown that pro-resolving lipid mediators present no side effects (Chiang and  
474 Serhan, 2017; Fattori et al., 2020b). Furthermore, a recent study demonstrated that  
475 MaR2, via TRPA1, reduces neuron activation induced by AITC (Fattori et al., 2022a).  
476 Since the formalin model is a classic model of pain, which involves TRPA1 activation,  
477 we aimed to investigate the analgesic and anti-inflammatory action of MaR2 and to  
478 elucidate if its mechanisms involves TRPA1 activation.

479

480

## 481 **2. Material and Methods.**

482

### 483 **2.1. Animals.**

484 In this study, we used male Swiss mice (20-25 g) from the Londrina State  
485 University, Paraná, Brazil and male Lysm e-GFP (heterozygous, 20-25 g) from the  
486 University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. Mice were housed in  
487 standard clear plastic cages (41x 34x16 cm), with *ad libitum* water and food, kept in  
488 light/dark cycle of 12/12 h, and controlled room temperature (23°C ± 2°C). At the end  
489 of the experiments, animals were euthanized by inhalation overdose with isoflurane  
490 5% followed by decapitation. All experiments were performed in accordance with the  
491 International Association for Study of Pain guidelines and with the approval of the  
492 Londrina State University Ethics Committee on Animal Research and Welfare (process  
493 number 11145.2016.54). Mice were used only once, and all efforts were made to  
494 minimize the number of animals used and their suffering.

495

## 496 2.2. *Experimental Procedures*

497 Mice were treated once with 0.3; 1, 3, or 10 nanograms (ng) of MaR2 (Cayman  
498 Chemical, Ann Arbor, MI, USA) or vehicle (0.2% ethanol in sterile saline) via intrathecal  
499 route (i.t., between L4 and L6 spinal segments, 10  $\mu$ L) under isoflurane anesthesia 1  
500 h before formalin stimulus. Then, mice received intraplantar injection of formalin (i.pl.,  
501 37% v/v, 40.54  $\mu$ L in sterile saline). The control group (saline) received no i.t treatment  
502 or i.pl injection. The MaR2 stock solution (100 ng/ $\mu$ L in 100% ethanol) was kept in a -  
503 80 °C freezer until use. The spontaneous pain behavior was evaluated for 30 min after  
504 the formalin injection. Also, the formalin-induced secondary mechanical hyperalgesia  
505 was assessed using an electronic version of von Frey filaments at 2, 4, and 6 h after  
506 stimuli injection. Hind paw skin was dissected 6 h after the stimulus for histological and  
507 immunofluorescence analyses. Leucocyte recruitment to the site of the injection and  
508 histopathological scores were determined by histology. Recruitment of neutrophils and  
509 macrophages close to CGRP<sup>+</sup> fibers in the hind paw skin of Lysm e-GFP mice was  
510 determined by immunofluorescence. Spinal cord segments were dissected 2 h after  
511 i.pl formalin injection for immunofluorescence to determine neurons pERK<sup>+</sup>. DRG  
512 neurons from naïve mice were dissected and cultured overnight, then pretreated with  
513 MaR2 (100nM) 30 min prior to formalin stimuli (0.015%) to determine calcium influx by  
514 calcium imaging analysis.

515

## 516 2.3. *Formalin Test.*

517 Mice received intraplantar injection of 25  $\mu$ L of formalin 1.5% into the right paw, as  
518 previously described (Borghi et al., 2013). The number of paw flinches were  
519 determined between 0 and 30 min after the stimuli. The period was divided in intervals  
520 of 5 min and clearly demonstrated the presence of the first and second phases, which  
521 are characteristic of the method (Dubuisson and Dennis, 1977; Shibata et al., 1989).  
522 The results are presented as the first (0-5 min) and the second (10-30 min) phases.  
523 The optimal dose of MaR2 was chosen for the following experiments based on the  
524 formalin test.

525

## 526 2.4. *Mechanical Hyperalgesia*

527 The electronic version of von Frey filaments, modified by Cunha et al., (2004), was  
528 used to evaluate the mechanical hyperalgesia as previously reported (Fattori et al.,

529 2022b; Ferraz et al., 2021). Briefly, mice were gently placed in acrylic cages (12×10×17  
530 cm) with a metallic grid floor, 1 h before the start of the test. The test consisted of  
531 evoking hind paw flexion reflex after a perpendicular force was applied using a  
532 polypropylene tip (0.5 mm<sup>2</sup>) coupled to a digital aesthesiometer (Insight®, Brazil). The  
533 tip was applied to the hind paw's central area, with a gradually increasing force. The  
534 force necessary (in grams) to evoke paw withdraw was automatically recorded by the  
535 pressure-meter apparatus. The final value of the response is the average of three  
536 measurements. The results are presented by delta ( $\Delta$ ) of withdraw threshold (in grams)  
537 and were calculated by subtracting the mean measurements at 2, 4 and 6 h after  
538 formalin stimulus from the mean measurements before the stimulus (baseline).

539

#### 540 2.5. *Histological analysis.*

541 After 6 h of formalin stimulus, hind paw skin was dissected, fixed in 10%  
542 formaldehyde prior to embedding in paraffin and then processed for hematoxylin and  
543 eosin (H&E) staining. The images were digitally acquired using a conventional light  
544 microscope (40x objective) (Olympus CX31RTSF, Tokyo, Japan) coupled to a high-  
545 resolution digital camera. Analyses were performed on ImageJ 1.53 software for  
546 Windows (Software in the public domain: <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) using the threshold  
547 tool and performed on RGB images without further treatment. The leukocyte  
548 recruitment was determined by the intensity of staining per % of the delimited area.  
549 The histopathological score parameters were: (a) inflammatory infiltrate from: no  
550 inflammation (score 0), mild (score 1), moderate (score 2), and severe (score 3)  
551 inflammation and (b) vascular proliferation from: no vascular proliferation (score 0),  
552 mild (score 1), moderate (score 2) and severe (score 3) vascular proliferation (Ferraz  
553 et al., 2021).

554

#### 555 2.6. *Immunofluorescence*

556 Spinal cord segments (L4–L6) and hind paw skin were dissected 2 h and 6 h,  
557 respectively, after the stimuli. Mice were euthanized with isoflurane anesthesia and  
558 perfused intracardially with PBS (Phosphate Buffered Saline) followed by 4%  
559 paraformaldehyde (PFA). Samples were post-fixed in 4% PFA for 24h at 4°C,  
560 cryoprotected with 30% sucrose for 2 days at 4°C, embedded in optimal cutting  
561 temperature (OCT) compound, and frozen in liquid nitrogen. The cryosections (10  $\mu$ m  
562 for spinal cord, 30  $\mu$ m for paw skin) were cut in a cryostat (CM1520, Leica Biosystem,

563 Richmond, IL, USA). The sections were blocked with 5% bovine serum albumin (BSA)  
564 in PBS 0.3% triton (0.3% PBST) for 1 h. The sections were incubated overnight at 4°C  
565 with the primary antibodies anti-phospho-ERK 1/2 (1:50, rabbit sc-23759-R, Santa  
566 Cruz Biotechnology), anti-NeuN (1:500, mouse #MAB377 Merck Millipore) or anti-  
567 CGRP (1:500, rabbit MilliporeSigma, Burlington, MA, USA). The following day,  
568 sections were washed with 0.3% PBST and incubated with secondary antibodies Alexa  
569 Fluor 647 (1:500, anti-rabbit A32733 Invitrogen), Alexa Fluor 488 (1:500, anti-mouse  
570 A-11001 Invitrogen) and DAPI (1:500, Cayman Chemicals) for 1 h at room  
571 temperature. Stained sections were mounted in Fluoromount-G mounting medium with  
572 DAPI (Invitrogen). The images were taken using a Confocal Microscope (TCS SP8,  
573 Leica Microsystems, Mannheim, Germany), and analyses were performed using Leica  
574 LAS X Software.

575

## 576 2.7. *Calcium influx imaging*

577 Naive DRG neurons were dissected and processed as previously described  
578 (Fattori et al., 2019). In brief, DRGs were dissected into Neurobasal-A medium (Life  
579 Technologies, Thermo Fisher Scientific), dissociated in collagenase A (1  
580 mg·ml<sup>-1</sup>)/dispase II (2.4 U·ml<sup>-1</sup>; RocheApplied Sciences, Indianapolis, IN, USA) in  
581 HEPES-buffered saline (MilliporeSigma) up to 20 min at 37°C. DRG neuros were then  
582 loaded with 1.2 µM of Fluo-4AM in Neurobasal-A medium, incubated for 30 min 37°C  
583 and washed with HBSS. The neurons were pretreated with 100nM of MaR2 (as  
584 previously described by Fattori et al., 2022) 30 minutes prior to image acquisition. To  
585 assess TRPA1 activation, DRG plates were recorded for 8 min, divided in 2 min of  
586 initial reading (baseline values), followed by stimulation with formalin at a 0,015%  
587 concentration for 4 min and KCl for 2 min (control, activates all neurons). Calcium flux  
588 was imaged in a Confocal Microscope (TCS SP8, Leica Microsystems) and analyzed  
589 from the mean fluorescence measured with the LAS X Software (Leica Microsystems).

590

## 591 2.8. *Statistical Analysis.*

592 Results are presented as mean ± standard error of the mean (SEM), and all  
593 analyses were performed using Graphpad Prism software version 9. The data  
594 normality was verified through the Shapiro-Wilk test. Data that followed a normal  
595 distribution were analyzed by one or two-way analysis of variance (ANOVA) followed  
596 by Tukey's post hoc. The data that did not follow a normal distribution was analyzed

597 by the Kruskal-Wallis test and Dunn's post hoc. Statistical differences were considered  
 598 significant when  $P < 0.05$ . Calcium imaging influx data was analysed by Two-way RM  
 599 ANOVA followed by Tukey's post test. The statistical analyses for all the figures in the  
 600 manuscript are summarized in Table 1.

601

602 **Table 1**

603 Summary of the statistical analyses

Result	Statistical test	Post test	F value	P value
Fig 1. (formalin test, phase I)	One-way ANOVA	Tukey	F (5, 34) = 9.229	P < 0.0001
Fig 1. (formalin test, phase II)	One-way ANOVA	Tukey	F (5, 34) = 19.47	P < 0.0001
Fig 2. (mechanical hyperalgesia)	Two-way ANOVA	Tukey	Time x Dose: F (4, 39) = 3.368 Time: F (2, 39) = 3.031 Dose: F (2, 39) = 270.1	P = 0.0184 P = 0.0597 P < 0.0001
Fig 3. (3c calcium influx)	Two-way RM ANOVA	Tukey	Time x Dose: F (2, 650) = 471.2 Time: F (1, 325) = 747.8 Dose: F (2, 650) = 471.2 Subject: F (325, 650) = 2.747	P < 0,0001 P < 0,0001 P < 0,0001 P < 0,0001
Fig 4. (4a – eGFP intensity of fluorescence)	One-way ANOVA	Tukey	F (2, 29) = 6.046	P = 0.0064
Fig 4. (4b – CGRP)	One-way ANOVA	Tukey	F (2, 29) =	P < 0.0001

intensity of fluorescence)	of ANOVA		18.91	
Fig 5. (5a	– Kruskal-Wallis	Dunn	n/a	P < 0.0001
histopathological score)				
Fig 5. (5b	– One-way ANOVA	Tukey	F (2, 12) = 16.08	P = 0.0004
leucocyte recruitment)				
Fig 6. (6a	– One-way ANOVA	Tukey	F (2, 18) = 13.92	P=0.0002
pERK/NeuN colocalization)				

604

605

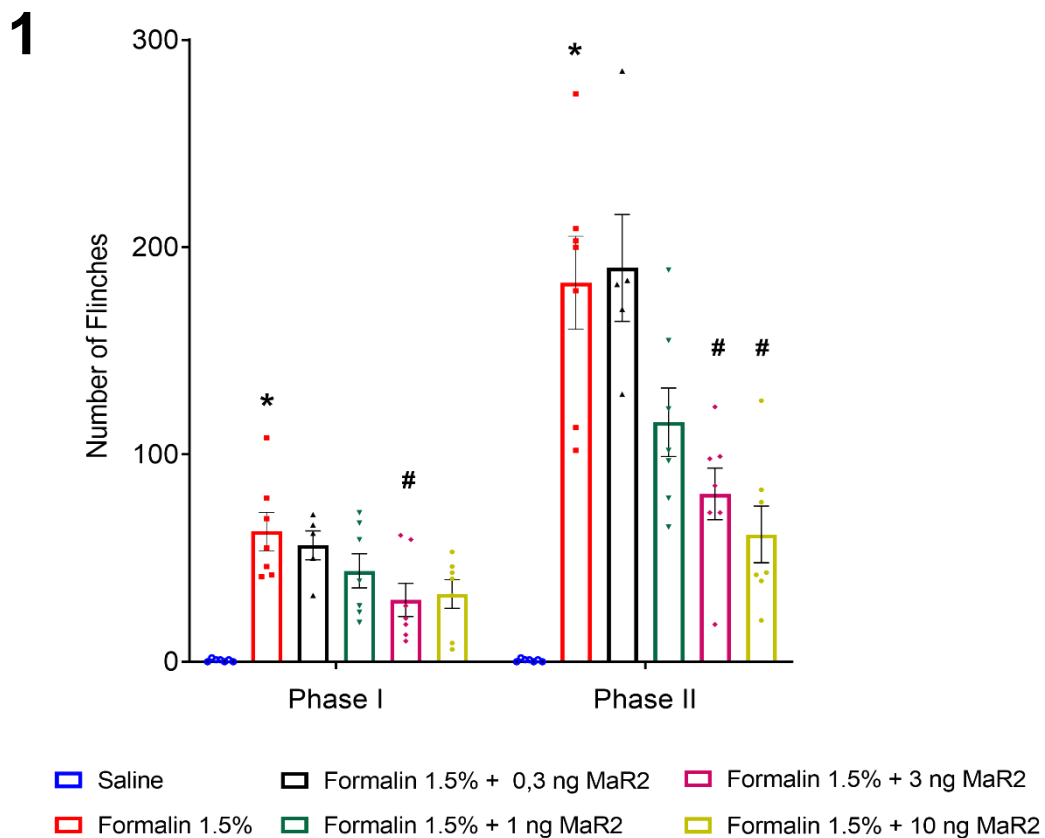
606 **3. Results**

607

608 3.1. *MaR2 reduces overt pain-like behavior induced by formalin*

609

610 The formalin test was used to assess the analgesic effect of Maresin 2 (MaR2) and  
611 establish the optimal treatment dose. Mice were pretreated via intrathecal (i.t., 10  $\mu$ L)  
612 with 0.3, 1, 3, or 10 ng of MaR2 1 h before intraplantar (i.pl., 25  $\mu$ L) injection of formalin  
613 (1.5%). The number of flinches were counted following the formalin injection.  
614 Treatment with MaR2 reduced the number of flinches in both phases of the stimulus,  
615 neurogenic and inflammatory. Although the dose of 10 ng reduced the nociceptive  
616 response in the second phase, only the 3 ng dose reduced the number of flinches in  
617 both phases (Fig. 1). For that reason, the 3 ng dose was chosen for the following  
618 experiments.



619

620

621 **Fig 1.** MaR2 3 ng reduces the overt pain-like behavior in both phases of formalin test.  
 622 Mice received i.t pretreatment of MaR2 1 h before i.pl formalin stimulus. Results are  
 623 presented as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) of number of flinches at first  
 624 (0 - 5 min) and second phases (10 - 30 min). n = 5-7 mice per group (One-way ANOVA  
 625 followed by Tukey's post hoc \*p < 0,05 vs. saline group; #p < 0,05 vs. formalin group).

626

627

628 3.2. *MaR2 reduces secondary mechanical hyperalgesia induced by formalin*

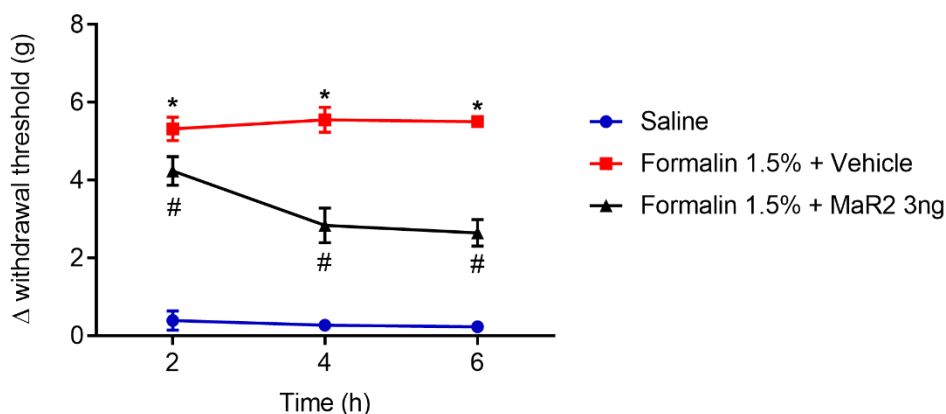
629

630 Besides the formalin test is well known overt pain-like behavior, the injection of  
 631 formalin in the hind paw evokes a long-lasting mechanical hyperalgesia that lasts up  
 632 to 3 weeks (Fu et al., 2001) . For that reason, we evaluated the analgesic effect of  
 633 MaR2 3 ng in the mechanical hyperalgesia induced by i.pl injection of 1.5% formalin at  
 634 2, 4, and 6 h after stimuli. MaR2 3 ng reduced the mechanical hyperalgesia evoked by  
 635 formalin in all evaluated time points (Fig. 2).

636

637

2



638

**Fig 2.** Formalin-induced mechanical hyperalgesia is reduced by MaR2 3 ng pretreatment.

639

Mechanical hyperalgesia was measured 2, 4, and 6 h after i.pl injection of 1.5% formalin

640

using the electronic version of von frey. Results are presented as mean  $\pm$  SEM of  $\Delta$  paw

641

withdraw threshold (in grams). n = 5-6 mice per group (Two-way ANOVA followed by

642

Tukey's post test \*p < 0,05 vs. saline group; #p < 0,05 vs. formalin group).

643

644

### 3.3. *MaR2 inhibits calcium influx evoked by formalin in DRG neurons in vitro*

645

646

Since formalin acts directly in TRPA1 channels of the nociceptors (McNamara et

647

al., 2007) in the first phase of the formalin test, we next evaluated whether MaR2

648

inhibits the calcium influx elicited by TRPA1 activation in DRG neurons after formalin

649

stimulus. Naïve DRG neurons were pretreated with MaR2 (100 nM in HBSS) 30 min

650

before formalin application (0.015%), the vehicle group received no pretreatment and

651

formalin application, and the negative control group (HBSS) received no pretreatment

652

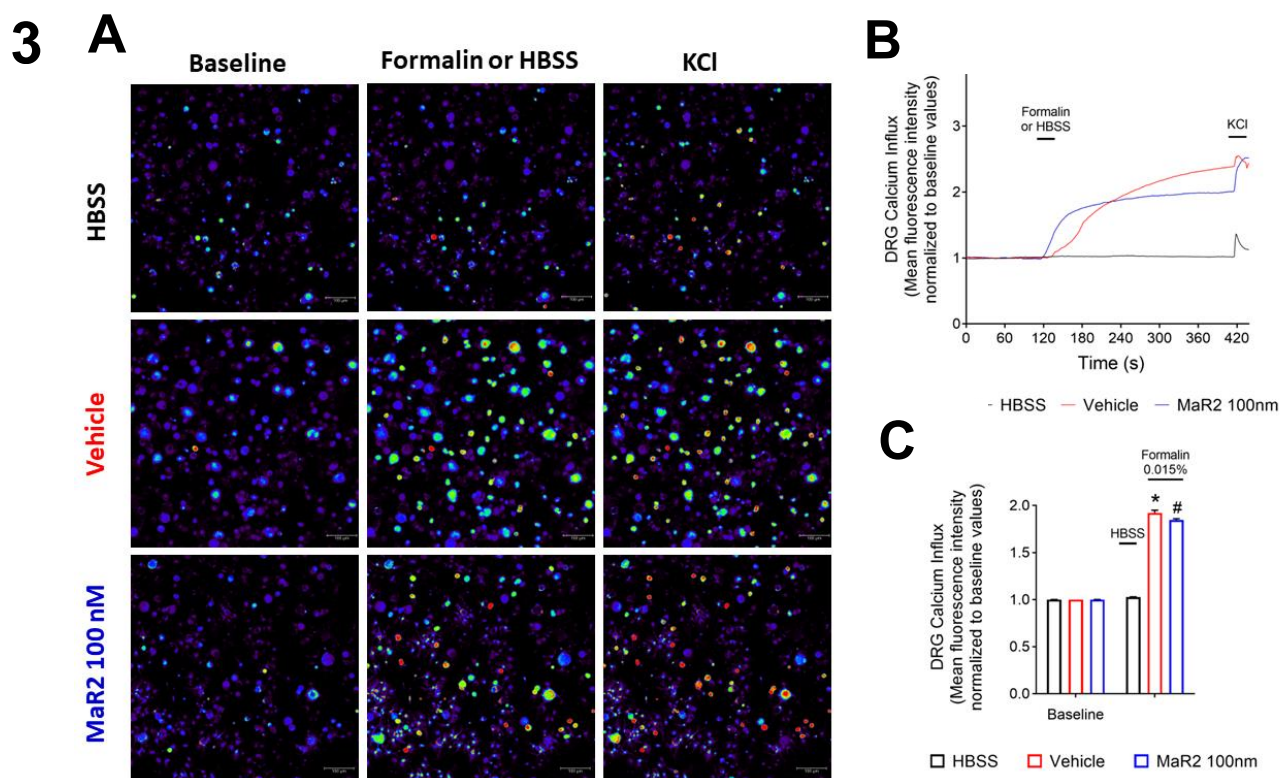
and HBSS instead of formalin. KCl activated all neurons and was used to check neuron

653

viability. Pretreatment with MaR2 100 nM prevented neuron activation by inhibiting

654

calcium influx evoked by formalin through TRPA1 inhibition *in vitro* (Fig 3).



655

656 **Fig 3.** MaR2 100 nM inhibits calcium influx evoked by 0.015% formalin *in vitro*.657 Representative pictures **(A)** of the intensity of fluorescence during image acquisition of

658 HBSS group (black line), vehicle group (red line) and MaR2 treated group (blue line)

659 **(B)** and mean of fluorescence intensity of calcium influx in baseline and formalin marks660 **(C)**. Results are presented as mean  $\pm$  SEM of DRG neurons. (Two-way repeated661 measurements ANOVA followed by Tukey's post hoc \* $p < 0,05$  vs. 120 s HBSS group;662 # $p < 0,05$  vs. 120 s vehicle group).

663

664

665 3.4. *MaR2 inhibits neutrophil and macrophage infiltration close to CGRP<sup>+</sup> fibers in*666 *the hind paw skin*

667

668 Since CGRP, a neuropeptide released from the peripheral nerve terminals of

669 nociceptors, induce neurogenic inflammation and leucocyte infiltration (Russell et al.,

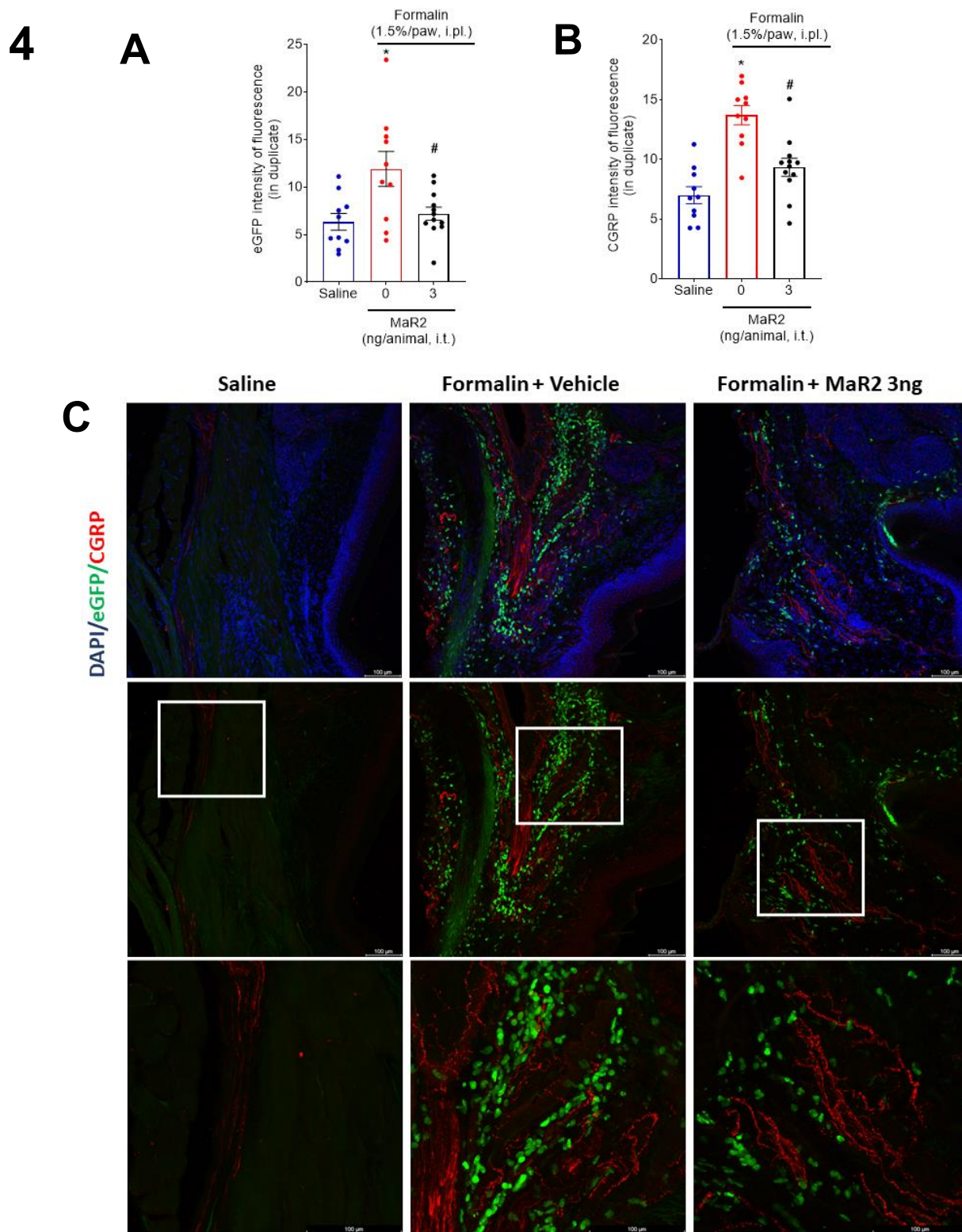
670 2014), we next evaluated whether treatment with MaR2 3 ng inhibits the infiltration of

671 neutrophils and macrophages close to neurons CGRP positive. Animals were

672 pretreated with MaR2 3 ng 1 h before the stimulus and the hind paw skin was collected

673 6 h after i.pl formalin for immunofluorescence. Vehicle group showed increased

674 neutrophil and macrophage infiltration close to CGRP<sup>+</sup> fibers as well as increased  
 675 CGRP expression, which were reduced by MaR2 3 ng pretreatment (Fig 4a, 4b).  
 676



677

678 **Fig 4.** MaR2 3 ng reduces the neutrophil recruitment close to CGRP<sup>+</sup> neuron fibers

679 and CGRP expression. Hind paw skin was dissected 6 h after formalin injection and  
 680 processed for immunostaining. Neutrophils recruitment was assessed using Lysm e-  
 681 GFP mice and fluorescence intensity (in duplicate) was quantified **(A)** as well as CGRP  
 682 intensity of fluorescence (in duplicate) **(B)**. Panel **(C)** presents representative pictures  
 683 of neutrophils close to CGRP<sup>+</sup> fibers. Results are presented as mean  $\pm$  SEM of  
 684 fluorescence intensity in duplicate. n = 5-6 mice per group (One-way ANOVA followed  
 685 by Tukey's post hoc \*p < 0,05 vs. saline group; #p < 0,05 vs. vehicle group).

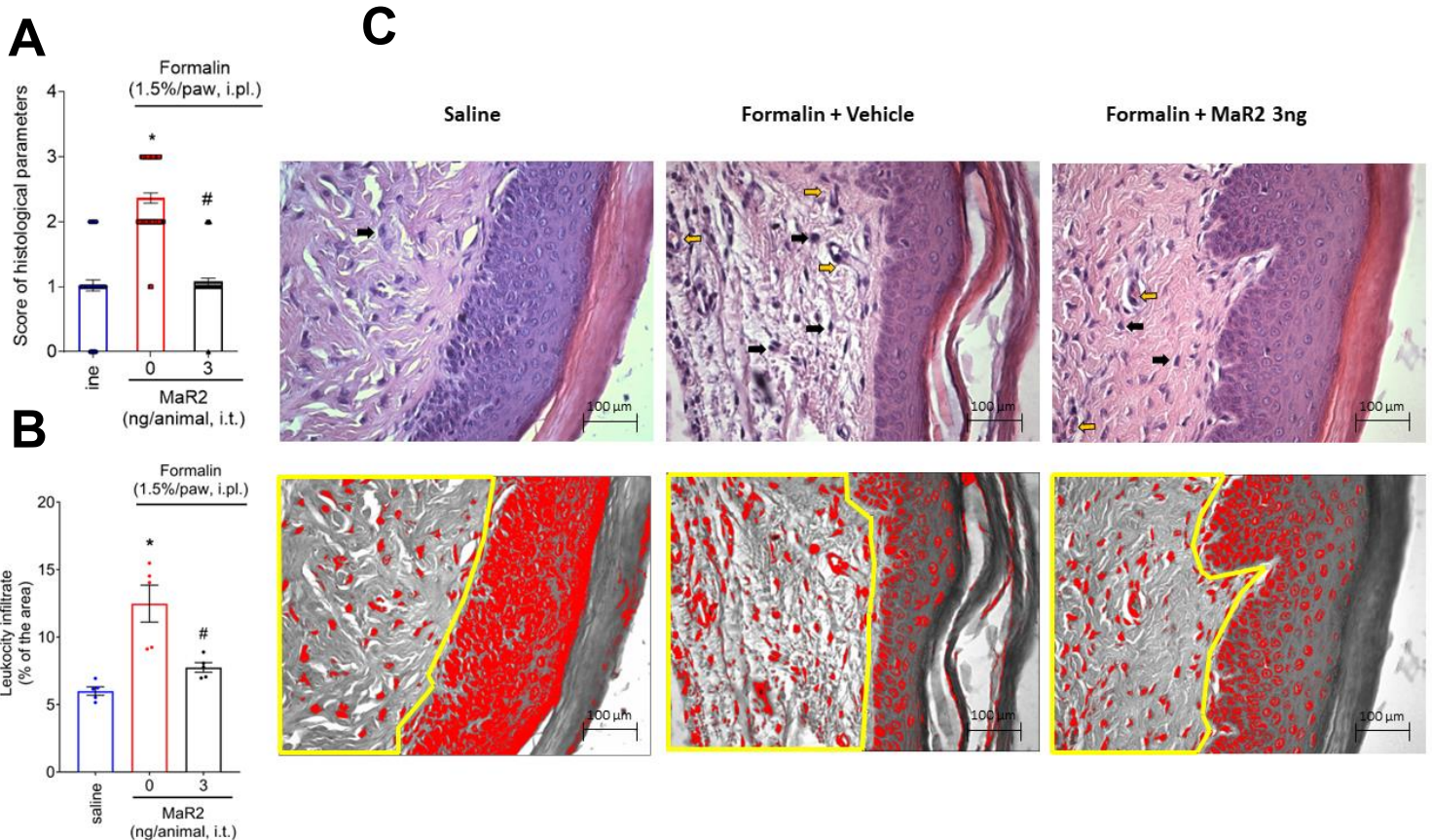
686

### 687 3.5. *MaR2 reduces formalin-induced leucocyte infiltrate and histopathological score* 688 *in hind paw skin*

689

690 Considering that MaR2 3 ng reduced neutrophil recruitment to the hind paw skin,  
 691 we further evaluated its effect in leucocyte infiltration and score parameters by  
 692 histological analyses. The hind paw tissue was dissected 6 h after the formalin injection  
 693 and histopathological score and leucocyte recruitment to the loci of the stimuli was  
 694 assessed. MaR2 3 ng reduced leucocyte infiltration and score parameters  
 695 (inflammatory infiltration and vascular proliferation) induced by the stimuli (Fig 5a, 5b).

## 5



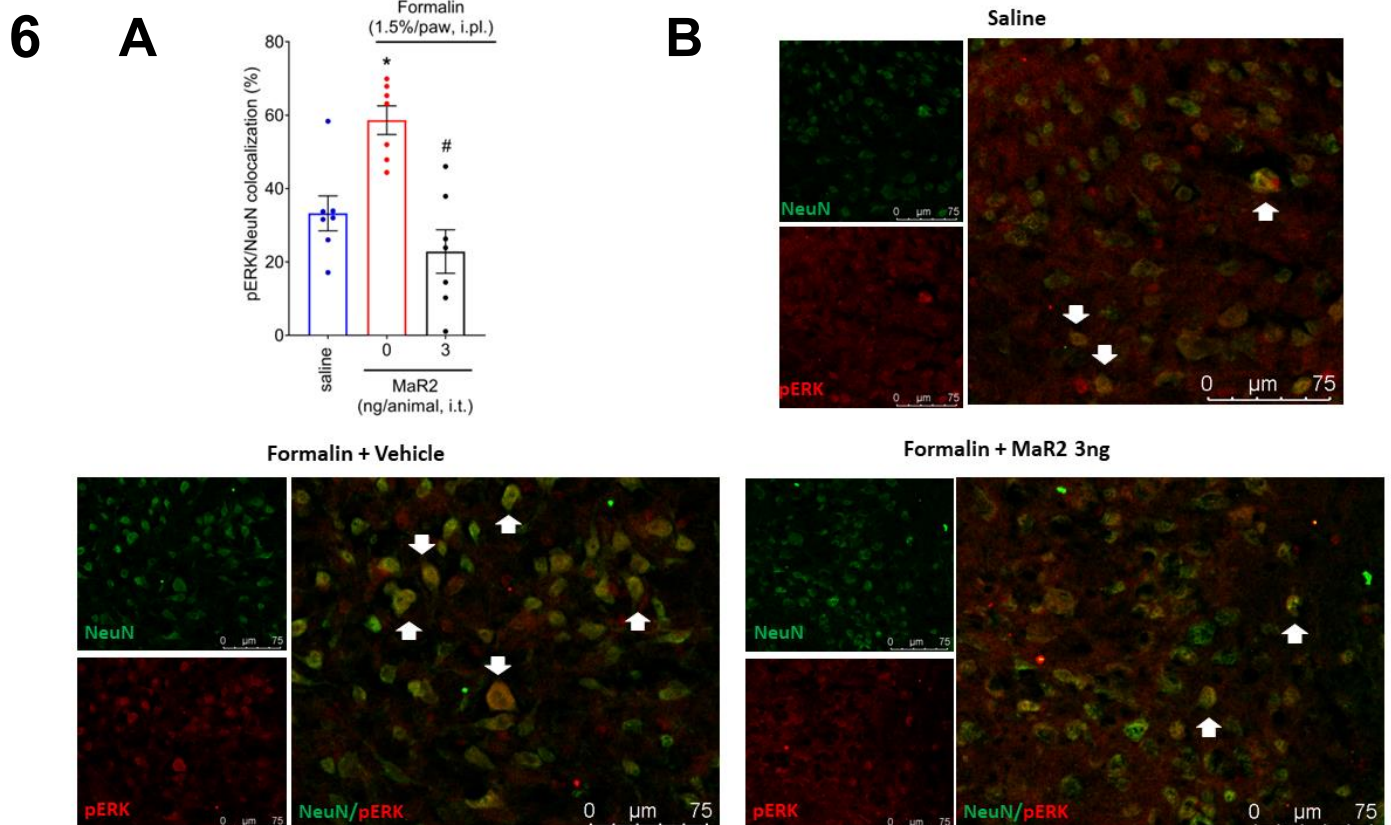
696 **Fig 5.** Pretreatment with MaR2 3 ng reduces leucocyte infiltration to the loci of the  
 697 formalin stimulus and reduces the histopathological score. Hind paw skin was collected  
 698 6 h after i.pl formalin stimulus for H&E analyses. **(A)** Inflammatory infiltration and  
 699 vascular proliferation were evaluated for histopathological scores. The inflammatory  
 700 cellular infiltration was indicated by black arrows and vascularization by yellow arrows  
 701 **(C).** **(B)** Leucocyte infiltration was assessed using ImageJ Software and quantified in  
 702 % of delimited area, highlighted in yellow **(C)**. Results are presented as mean  $\pm$  SEM  
 703 of 5 mice per group (Kruskal-Wallis test and Dunn's post hoc for histopathological  
 704 score and one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc for leucocyte infiltration, \* $p$   
 705  $< 0,05$  vs. saline group; # $p < 0,05$  vs. vehicle group).

706

### 707 3.6. MaR2 reduces formalin-induced neurons pERK+ in the spinal cord

708

709 The input of afferent pain signalization to the neurons of the spinal cord evokes the  
 710 phosphorylation of ERK 1/2, a MAPK member involved in pain (Ji et al., 1999). For that  
 711 reason, we evaluated whether MaR2 3 ng reduces the ERK 1/2 activation in the  
 712 neurons of the dorsal horn of the spinal cord after formalin stimulus. Formalin evoked  
 713 a significant increase of pERK in neurons of the spinal cord 2 hours after the  
 714 intraplantar injection. The pretreatment with MaR2 3 ng reduced the number of pERK-  
 715 positive neurons (Fig 6.).



716 **Fig 6.** MaR2 3 ng pretreatment reduces pERK positive neurons in the dorsal horn of  
717 the spinal cord. Spinal cord was dissected 2 h after formalin stimulus and processed  
718 for immunostaining. Percentage of colocalization area of pERK and NeuN **(A)** and  
719 representative pictures panel **(B)**. Results are presented as mean  $\pm$  SEM of percentage  
720 of colocalization area. n = 7 mice per group (One-way ANOVA followed by Tukey's  
721 post test \*p < 0,05 vs. saline group; #p < 0,05 vs. vehicle group).

722

723

#### 724 **4. Discussion**

725

726 In the present study, we evaluated the analgesic effect of MaR2 treatment in  
727 formalin- induced pain model and its mechanisms *in vivo* and *in vitro*. Intrathecal MaR2  
728 pretreatment reduces pain, the phosphorylation of ERK in the neurons of spinal cord,  
729 recruitment of neutrophils close to CGRP<sup>+</sup> fibers and CGRP expression, as well as the  
730 leucocyte recruitment and histopathological score to the paw skin *in vivo*. MaR2 *in*  
731 *vitro*, inhibited the calcium influx in neurons through TRPA1 inactivation.

732 First, we aimed to test whether MaR2 presents an analgesic effect in the formalin  
733 test in mice. The formalin test is a widely used animal pain model to assess the  
734 analgesic effect of potential treatments. The intraplantar administration of formalin  
735 elicits overt pain-like behavior that consists in paw flinching and licking. The nociceptive  
736 response is biphasic, which comprises a neurogenic and inflammatory phase (Borghini  
737 et al., 2013; Shibata et al., 1989; Staurengo-Ferrari et al., 2014). Thus, we present that  
738 MaR2 reduces the number of flinches in the neurogenic and inflammatory phases of  
739 the stimulus. Formalin stimulus also evokes mechanical hyperalgesia besides the  
740 acute nociceptive response (Fu et al., 2001; Li et al., 2010; Salinas-Abarca et al., 2017;  
741 Zhang et al., 2018). We further show that MaR2 pretreatment reduces the formalin-  
742 induced mechanical hyperalgesia in mice.

743 The neurogenic phase of formalin stimulus involves the release of serotonin and  
744 histamine by resident mast cells, which directly acts in the nociceptor (Parada et al.,  
745 2001; Verri et al., 2006). Moreover, the formalin itself acts directly in the nociceptors  
746 by activating the TRPA1 ion channel (McNamara et al., 2007). Therefore, since MaR2  
747 reduced the number of flinches of the neurogenic phase of the formalin stimulus, the  
748 next step was to evaluate whether treatment with MaR2 would inhibit the formalin-  
749 evoked TRPA1 activation in neurons of the DRG *in vitro*. MaR2 inhibited TRPA1

750 activation which consequently prevented the calcium influx induced by formalin  
751 application in neurons and neuron activation. A previous study evaluating the effect of  
752 MaR2 in an acute pain model induced by AITC, a TRPA1 agonist, showed that MaR2  
753 (30 ng) reduced the number of flinches and time spent licking after the stimulus. In  
754 addition, MaR2 100 nM inhibited calcium influx evoked by AITC (Fattori et al., 2022b).  
755 This study corroborates with our present data, suggesting that MaR2 analgesic effect  
756 might be via TRPA1 inhibition in nociceptors.

757       Beside transmitting nociceptive signals to the central nervous system, nociceptors  
758 also release neuropeptides, such as CGRP, from their nerve terminals in the periphery  
759 through axonal reflex (Pinho-Ribeiro et al., 2018). In a recent study, TRPA1 activation  
760 by formalin in DRG neurons enhanced CGRP mRNA levels, protein expression, and  
761 percentage of CGRP<sup>+</sup> neurons (Wang et al., 2019). This *in vitro* study is in accordance  
762 with our *in vivo* findings which demonstrates that intraplantar formalin stimulus induces  
763 CGRP expression in nociceptors fibers of the hind paw skin, which is prevented by  
764 MaR2 pretreatment. CGRP release in the periphery induce neurogenic inflammation  
765 and leads to vasodilatation, and edema, and contributes to the infiltration of  
766 inflammatory cells (e.g., neutrophils) in the tissue (Kim and Granstein, 2021). Herein,  
767 we show that MaR2 treatment prevents the formalin-induced neutrophil and  
768 macrophages recruitment close to CGRP<sup>+</sup> fibers. It corroborates with a previous study  
769 which demonstrated that MaR2 treatment reduced CD11b<sup>+</sup> immune cell recruitment  
770 close to neurons CGRP<sup>+</sup> after LPS stimulus (Fattori et al., 2022b). These findings  
771 shows that MaR2 inhibits neurogenic inflammation in different stimuli in mice.

772       The inflammatory phase of the formalin test is marked by the release of cytokines  
773 (IL-33, IL-1 $\beta$ , and TNF- $\alpha$ ) and prostaglandins (Calixto-Campos et al., 2015). The  
774 inflammatory response involves the leukocyte recruitment to the site of tissue damage;  
775 here, we demonstrate that formalin evokes recruitment of inflammatory cells to the  
776 locus of injection and promotes vascular proliferation, and that MaR2 prevented these  
777 parameters. This result aligns with the presented reduction of number of flinches in  
778 second phase, mechanical hyperalgesia, and reduced infiltration of neutrophil and  
779 macrophage assessed by immunofluorescence. In the ovalbumin-induced asthma  
780 model, treatment with MaR2 reduced the recruitment of inflammatory cells (neutrophils  
781 and eosinophils) in the bronchoalveolar lavage and reduced the airway  
782 histopathological inflammation score (Yu et al., 2022). MaR2 also reduced the  
783 infiltration of polymorphonuclear cells to the peritoneum of mice in zymosan-induced

784 peritonitis (Deng et al., 2014b).

785 Phosphorylation of ERK 1/2 in neurons of the superficial dorsal horn is triggered  
786 by peripheral noxious stimuli input and is considered a marker for neuronal activation  
787 (Gao and Ji, 2009; Ji et al., 1999). Formalin stimuli induce the activation of ERK 1/2 in  
788 the neurons of spinal cord (Kumar and Vinayak, 2020; Lee et al., 2012). Intrathecal  
789 treatment with PD-98059, a MEK inhibitor that prevent ERK phosphorylation, reduced  
790 the nociceptive behavior in the inflammatory phase of formalin (Lee et al., 2012).  
791 Herein, we demonstrated for the first time that MaR2 reduces the phosphorylation of  
792 ERK 1/2 in neurons of spinal cord, suggesting that MaR2 promotion of analgesia might  
793 be via inhibition of ERK activation in neurons of spinal cord, modulating the  
794 inflammatory phase of the formalin test.

795

796

## 797 **5. Conclusion**

798

799 This study shows that the pro-resolving lipid mediator Maresin 2 promotes  
800 analgesic and anti-inflammatory action in pain model induced by formalin. This activity  
801 is related to inhibition of neuron activation in both, DRG and spinal cord, as well as  
802 inhibition of neurogenic inflammation and inflammatory immune cell recruitment to the  
803 site of formalin injection.

804

## 805 **Acknowledgments**

806 This work is supported by grants from National Council for Scientific and Technological  
807 Development (CNPq, Brazil) and Amanda M. Dionisio acknowledges master degree  
808 scholarship from Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel  
809 (CAPES, Brazil).

810

## 811 **Conflict of interest**

812 The authors declare no conflict of interest.

813

## 814 **Author Contributions:**

815 Amanda M. Dionisio: Project administration, Writing - Original Draft, Conceptualization,  
816 Methodology.

817 Mariana M. Bertozzi: Methodology, Formal analysis.

818 Tiago H. Zaninelli: Methodology, Formal analysis.  
819 Telma S. Santos: Methodology  
820 Anelise Franciosi: Methodology  
821 Julia B. Souza: Methodology  
822 Waldiceu A. Verri Jr: Supervision, Conceptualization, Funding acquisition.

823

824

## 825 **References**

826 Borghi, S.M., Carvalho, T.T., Staurengo-Ferrari, L., Hohmann, M.S.N., Pinge-Filho, P.,  
827 Casagrande, R., Verri, W.A., 2013. Vitexin inhibits inflammatory pain in mice by  
828 targeting TRPV1, oxidative stress, and cytokines. *J. Nat. Prod.* 76, 1141–1146.  
829 <https://doi.org/10.1021/np400222v>

830 Calixto-Campos, C., Carvalho, T.T., Hohmann, M.S.N., Pinho-Ribeiro, F.A., Fattori, V.,  
831 Manchope, M.F., Zarpelon, A.C., Baracat, M.M., Georgetti, S.R., Casagrande, R.,  
832 Verri, W.A., 2015. Vanillic Acid Inhibits Inflammatory Pain by Inhibiting Neutrophil  
833 Recruitment, Oxidative Stress, Cytokine Production, and NFκB Activation in Mice.  
834 *J. Nat. Prod.* 78, 1799–1808. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00246>

835 Chiang, N., Serhan, C.N., 2017. Structural elucidation and physiologic functions of  
836 specialized pro-resolving mediators and their receptors. *Mol. Aspects Med.*  
837 <https://doi.org/10.1016/j.mam.2017.03.005>

838 Cunha, T.M., Verri, W.A., Vivancos, G.G., Moreira, I.F., Reis, S., Parada, C.A., Cunha,  
839 F.Q., Ferreira, S.H., 2004. Mouse paw pressure-meter test Brazilian. *J. Med. Biol.*  
840 *Res.* 37, 401–407.

841 Deng, B., Wang, C.W., Arnardottir, H.H., Li, Y., Cheng, C.Y.C., Dalli, J., Serhan, C.N.,  
842 2014a. Maresin biosynthesis and identification of maresin 2, a new anti-  
843 inflammatory and pro-resolving mediator from human macrophages. *PLoS One* 9.  
844 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102362>

845 Deng, B., Wang, C.W., Arnardottir, H.H., Li, Y., Cheng, C.Y.C., Dalli, J., Serhan, C.N.,  
846 2014b. Maresin biosynthesis and identification of maresin 2, a new anti-  
847 inflammatory and pro-resolving mediator from human macrophages. *PLoS One* 9.  
848 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102362>

- 849 Dubuisson, D., Dennis, S.G., 1977. The formalin test: A quantitative study of the  
850 analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and  
851 cats. *Pain* 4, 161–174. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(77\)90130-0](https://doi.org/10.1016/0304-3959(77)90130-0)
- 852 Fattori, V., Pinho-Ribeiro, F.A., Staurengo-Ferrari, L., Borghi, S.M., Rossaneis, A.C.,  
853 Casagrande, R., Verri, W.A., 2019. The specialised pro-resolving lipid mediator  
854 maresin 1 reduces inflammatory pain with a long-lasting analgesic effect. *Br. J.*  
855 *Pharmacol.* 176, 1728–1744. <https://doi.org/10.1111/bph.14647>
- 856 Fattori, V., Zaninelli, T.H., Ferraz, C.R., Brasil-silva, L., Borghi, S.M., Cunha, J.M.,  
857 Chichorro, J.G., Casagrande, R., Verri, W.A., 2022a. Neuropharmacology  
858 Maresin 2 is an analgesic specialized pro-resolution lipid mediator in mice by  
859 inhibiting neutrophil and monocyte recruitment , nociceptor neuron TRPV1 and  
860 TRPA1 activation , and CGRP release. *Neuropharmacology* 216, 109189.  
861 <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2022.109189>
- 862 Fattori, V., Zaninelli, T.H., Ferraz, C.R., Brasil-Silva, L., Borghi, S.M., Cunha, J.M.,  
863 Chichorro, J.G., Casagrande, R., Verri, W.A., 2022b. Maresin 2 is an analgesic  
864 specialized pro-resolution lipid mediator in mice by inhibiting neutrophil and  
865 monocyte recruitment, nociceptor neuron TRPV1 and TRPA1 activation, and  
866 CGRP release. *Neuropharmacology* 216, 109189.  
867 <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2022.109189>
- 868 Fattori, V., Zaninelli, T.H., Rasquel-Oliveira, F.S., Casagrande, R., Verri, W.A., 2020a.  
869 Specialized pro-resolving lipid mediators: A new class of non-immunosuppressive  
870 and non-opioid analgesic drugs. *Pharmacol. Res.* 151, 104549.  
871 <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104549>
- 872 Fattori, V., Zaninelli, T.H., Rasquel-Oliveira, F.S., Casagrande, R., Verri, W.A., 2020b.  
873 Specialized pro-resolving lipid mediators: A new class of non-immunosuppressive  
874 and non-opioid analgesic drugs. *Pharmacol. Res.*  
875 <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104549>
- 876 Ferraz, C.R., Manchope, M.F., Andrade, K.C., Saraiva-Santos, T., Franciosi, A.,  
877 Zaninelli, T.H., Bagatim-Souza, J., Borghi, S.M., Cândido, D.M., Knysak, I.,  
878 Casagrande, R., Kwasniewski, F.H., Verri, W.A., 2021. Peripheral mechanisms  
879 involved in *Tityus bahiensis* venom-induced pain. *Toxicon* 200, 3–12.

- 880 <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2021.06.013>
- 881 Fu, K.Y., Light, A.R., Maixner, W., 2001. Long-lasting inflammation and long-term  
882 hyperalgesia after subcutaneous formalin injection into the rat hindpaw. *J. Pain* 2,  
883 2–11. <https://doi.org/10.1054/jpai.2001.9804>
- 884 Gao, Y.-J., Ji, R.-R., 2009. c-Fos or pERK, Which is a Better Marker for Neuronal  
885 Activation and Central Sensitization After Noxious Stimulation and Tissue Injury?  
886 *Open Pain J.* 2, 11–17. <https://doi.org/10.2174/1876386300902010011>
- 887 Ji, R.R., Baba, H., Brenner, G.J., Woolf, C.J., 1999. Nociceptive-specific activation of  
888 ERK in spinal neurons contributes to pain hypersensitivity. *Nat. Neurosci.* 1999  
889 212 2, 1114–1119. <https://doi.org/10.1038/16040>
- 890 Ji, R.R., Gereau IV, R.W., Malcangio, M., Strichartz, G.R., 2009. MAP kinase and pain.  
891 *Brain Res. Rev.* 60, 135–148. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2008.12.011>
- 892 Karim, F., Hu, H., Adwanikar, H., Kaplan, D., Iv, R.W.G., 2006. Impaired inflammatory  
893 pain and thermal hyperalgesia in mice expressing neuron-specific dominant  
894 negative mitogen activated protein kinase kinase ( MEK ) 10, 1–10.  
895 <https://doi.org/10.1186/1744-8069-2-2>
- 896 Kim, Y.J., Granstein, R.D., 2021. Roles of calcitonin gene-related peptide in the skin,  
897 and other physiological and pathophysiological functions. *Brain, Behav. Immun. -*  
898 *Heal.* 18, 100361. <https://doi.org/10.1016/J.BBIH.2021.100361>
- 899 Kumar, S., Vinayak, M., 2020. NADPH oxidase1 inhibition leads to regression of  
900 central sensitization during formalin induced acute nociception via attenuation of  
901 ERK1/2-NFκB signaling and glial activation. *Neurochem. Int.* 134, 104652.  
902 <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2019.104652>
- 903 Lee, M.J., Jang, M., Jung, H.S., Kim, S.H., Cho, I.H., 2012. Ethyl pyruvate attenuates  
904 formalin-induced inflammatory nociception by inhibiting neuronal ERK  
905 phosphorylation. *Mol. Pain* 8, 1–13. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-8-40>
- 906 Li, K., Lin, T., Cao, Y., Light, A.R., Fu, K.Y., 2010. Peripheral formalin injury induces 2  
907 stages of microglial activation in the spinal cord. *J. Pain* 11, 1056–1065.  
908 <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2010.01.268>
- 909 McNamara, C.R., Mandel-Brehm, J., Bautista, D.M., Siemens, J., Deranian, K.L.,

- 910 Zhao, M., Hayward, N.J., Chong, J.A., Julius, D., Moran, M.M., Fanger, C.M.,  
911 2007. TRPA1 mediates formalin-induced pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104,  
912 13525–13530. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705924104>
- 913 Orlicka, K., Barnes, E., Culver, E.L., 2013. Prevention of infection caused by  
914 immunosuppressive drugs in gastroenterology. *Ther. Adv. Chronic Dis.*  
915 <https://doi.org/10.1177/2040622313485275>
- 916 Parada, C.A., Tambeli, C.H., Cunha, F.Q., Ferreira, S.H., 2001. The major role of  
917 peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalin-induced  
918 nociception. *Neuroscience* 102, 937–944. [https://doi.org/10.1016/S0306-](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(00)00523-6)  
919 [4522\(00\)00523-6](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(00)00523-6)
- 920 Pinho-Ribeiro, F.A., Baddal, B., Haarsma, R., O’Seaghdha, M., Yang, N.J., Blake, K.J.,  
921 Portley, M., Verri, W.A., Dale, J.B., Wessels, M.R., Chiu, I.M., 2018. Blocking  
922 Neuronal Signaling to Immune Cells Treats Streptococcal Invasive Infection. *Cell*  
923 173, 1083-1097.e22. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.04.006>
- 924 Pinho-Ribeiro, F.A., Verri, W.A., Chiu, I.M., 2017. Nociceptor Sensory Neuron–  
925 Immune Interactions in Pain and Inflammation. *Trends Immunol.* 38, 5–19.  
926 <https://doi.org/10.1016/j.it.2016.10.001>
- 927 Russell, F.A., King, R., Smillie, S.J., Kodji, X., Brain, S.D., 2014. Calcitonin gene-  
928 related peptide: physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev.* 94, 1099–1142.  
929 <https://doi.org/10.1152/physrev.00034.2013>
- 930 Salinas-Abarca, A.B., Avila-Rojas, S.H., Barragán-Iglesias, P., Pineda-Farias, J.B.,  
931 Granados-Soto, V., 2017. Formalin injection produces long-lasting  
932 hypersensitivity with characteristics of neuropathic pain. *Eur. J. Pharmacol.* 797,  
933 83–93. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.01.018>
- 934 Shibata, M., Ohkubo, T., Takahashi, H., Inoki, R., 1989. Modified formalin test:  
935 characteristic biphasic pain response. *Pain* 38, 347–352.  
936 [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(89\)90222-4](https://doi.org/10.1016/0304-3959(89)90222-4)
- 937 Staurengo-Ferrari, L., Zarpelon, A.C., Longhi-Balbinot, D.T., Marchesi, M., Cunha,  
938 T.M., Alves-Filho, J.C., Cunha, F.Q., Ferreira, S.H., Casagrande, R., Miranda,  
939 K.M., Verri, W.A., 2014. Nitroxyl inhibits overt pain-like behavior in mice: role of  
940 cGMP/PKG/ATP-sensitive potassium channel signaling pathway.

- 941 <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2014.04.003>
- 942 Stenger, B., Popp, T., John, H., Siegert, M., Tsoutsoulopoulos, A., Schmidt, A.,  
943 Mückter, H., Gudermann, T., Thiermann, H., Steinritz, D., 2017. N-Acetyl-L-  
944 cysteine inhibits sulfur mustard-induced and TRPA1-dependent calcium influx.  
945 Arch. Toxicol. 91, 2179–2189. <https://doi.org/10.1007/S00204-016-1873-X>
- 946 Verri, W.A., Cunha, T.M., Parada, C.A., Poole, S., Cunha, F.Q., Ferreira, S.H., 2006.  
947 Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: Targets for analgesic drug  
948 development? Pharmacol. Ther. 112, 116–138.  
949 <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2006.04.001>
- 950 Viana, F., 2016. TRPA1 channels: molecular sentinels of cellular stress and tissue  
951 damage. J. Physiol. 594, 4151–4169. <https://doi.org/10.1113/JP270935>
- 952 Wang, X.L., Cui, L.W., Liu, Z., Gao, Y.M., Wang, S., Li, H., Liu, H.X., Yu, L.J., 2019.  
953 Effects of TRPA1 activation and inhibition on TRPA1 and CGRP expression in  
954 dorsal root ganglion neurons. Neural Regen. Res. 14, 140–148.  
955 <https://doi.org/10.4103/1673-5374.243719>
- 956 Yu, C., Shi, Z., Ou, G., Chen, X., Liu, Q., Zeng, D., Nie, X., Chen, J., 2022. Maresin-2  
957 alleviates allergic airway inflammation in mice by inhibiting the activation of NLRP3  
958 inflammasome , Th2 type immune response and oxidative stress. Mol. Immunol.  
959 146, 78–86. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2022.03.118>
- 960 Zhang, L., Yin, J. Bin, Hu, W., Zhao, W.J., Fan, Q.R., Qiu, Z.C., He, M.J., Ding, T.,  
961 Sun, Y., Kaye, A.D., Wang, E.R., 2018. Analgesic effects of duloxetine on  
962 formalin-induced hyperalgesia and its underlying mechanisms in the CeA. Front.  
963 Pharmacol. 9, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00317>
- 964
- 965
- 966
- 967
- 968

## 969 **6 CONCLUSÃO**

970 Neste estudo, apresentamos o efeito analgésico e anti-inflamatório da maresina  
971 2 em modelo de dor induzido por formalina em camundongos. O tratamento com a  
972 MaR2 reduziu a dor manifesta (número de sacudidas de pata) nas fases neurogênica  
973 e inflamatória, bem como reduziu a hiperalgesia mecânica. Além disso, o tratamento  
974 inibiu a ativação dos neurônios do DRG, através da inibição da ativação do TRPA1, e  
975 da medula espinal, por reduzir a fosforilação da ERK. A inflamação neurogênica e o  
976 recrutamento de leucócitos para o tecido plantar também foi reduzida pelo tratamento.

977 Portanto, os dados deste estudo confirmam o potencial terapêutico da maresina  
978 2 que promove ação analgésica e anti-inflamatória, em uma faixa de nanogramas, e  
979 elucida seus mecanismos de ação.

980

981

982

983

984

985

986

987

988

989

990

991

992

993

994

995

996

## REFERÊNCIAS

- 997 BASBAUM, A. I.; JESSEL, T. M. Dor. *In*: KANDEL, E. R., *et al.*, Princípios de  
998 Neurociências. Tradução de Rodrigues, Ana L. S. *et al.* 5. ed. Porto Alegre: AMGH,  
999 2014. p, 462-482.
- 1000 BASBAUM, A. I.; BAUTISTA, D. M.; SCHERRER, G.; JULIUS, D. Cellular and  
1001 Molecular Mechanisms of Pain. **Cell**, vol. 139, no. 2, p. 267–284, 16 Oct. 2009.  
1002 <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2009.09.028>.
- 1003 BINGHAM, B.; AJIT, S. K.; BLAKE, D. R.; SAMAD, T. A. The molecular basis of pain  
1004 and its clinical implications in rheumatology. **Nature Clinical Practice Rheumatology**  
1005 **2009 5:1**, vol. 5, no. 1, p. 28–37, 2009. DOI 10.1038/ncprheum0972. Available at:  
1006 <https://www.nature.com/articles/ncprheum0972>. Accessed on: 21 Sep. 2022.
- 1007 BORGHI, S. M.; CARVALHO, T. T.; STAURENGO-FERRARI, L.; HOHMANN, M. S.  
1008 N.; PINGE-FILHO, P.; CASAGRANDE, R.; VERRI, W. A. Vitexin inhibits inflammatory  
1009 pain in mice by targeting TRPV1, oxidative stress, and cytokines. **Journal of Natural**  
1010 **Products**, vol. 76, no. 6, p. 1141–1146, 2013. <https://doi.org/10.1021/np400222v>.
- 1011 CALIXTO-CAMPOS, C.; CARVALHO, T. T.; HOHMANN, M. S. N.; PINHO-RIBEIRO,  
1012 F. A.; FATTORI, V.; MANCHOPE, M. F.; ZARPELON, A. C.; BARACAT, M. M.;  
1013 GEORGETTI, S. R.; CASAGRANDE, R.; VERRI, W. A. Vanillic Acid Inhibits  
1014 Inflammatory Pain by Inhibiting Neutrophil Recruitment, Oxidative Stress, Cytokine  
1015 Production, and NFκB Activation in Mice. **Journal of Natural Products**, vol. 78, no. 8,  
1016 p. 1799–1808, 2015. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00246>.
- 1017 CHICHORRO, J. G.; LORENZETTI, B. B.; ZAMPRONIO, A. R. Involvement of  
1018 bradykinin, cytokines, sympathetic amines and prostaglandins in formalin-induced  
1019 orofacial nociception in rats. **British Journal of Pharmacology**, vol. 141, no. 7, p.  
1020 1175–1184, 2004. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705724>.
- 1021 CHOI, J. E.; DI NARDO, A. Skin neurogenic inflammation. **Seminars in**  
1022 **Immunopathology**, vol. 40, no. 3, p. 249–259, 30 Apr. 2018. DOI 10.1007/s00281-  
1023 018-0675-z. Available at: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00281-018-0675-z>.  
1024 Accessed on: 13 Sep. 2022.
- 1025 CLAVELOU, P.; PAJOT, J.; DALLEL, R.; RABOISSON, P. Application of the formalin  
1026 test to the study of orofacial pain in the rat. **Neuroscience letters**, vol. 103, no. 3, p.  
1027 349–353, 11 Sep. 1989. DOI 10.1016/0304-3940(89)90125-0. Available at:  
1028 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2812522/>. Accessed on: 13 Sep. 2022.
- 1029 CUNHA, T. M.; VERRI, W. A.; VIVANCOS, G. G.; MOREIRA, I. F.; REIS, S.; PARADA,  
1030 C. A.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. Mouse paw pressure-meter test Brazilian.  
1031 **Journal of Medical and Biological Research**, vol. 37, no. 3, p. 401–407, 2004. .
- 1032 DAI, Y.; FUKUOKA, T.; WANG, H.; YAMANAKA, H.; OBATA, K.; TOKUNAGA, A.;

- 1033 NOGUCHI, K. Contribution of sensitized P2X receptors in inflamed tissue to the  
1034 mechanical hypersensitivity revealed by phosphorylated ERK in DRG neurons. **Pain**,  
1035 vol. 108, no. 3, p. 258–266, Apr. 2004. DOI 10.1016/J.PAIN.2003.12.034. Available at:  
1036 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15030945/>. Accessed on: 16 Sep. 2022.
- 1037 DENG, B.; WANG, C. W.; ARNARDOTTIR, H. H.; LI, Y.; CHENG, C. Y. C.; DALLI, J.;  
1038 SERHAN, C. N. Maresin biosynthesis and identification of maresin 2, a new anti-  
1039 inflammatory and pro-resolving mediator from human macrophages. **PLoS ONE**, vol.  
1040 9, no. 7, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102362>.
- 1041 FATTORI, V.; PINHO-RIBEIRO, F. A.; STAURENGO-FERRARI, L.; BORGHI, S. M.;  
1042 ROSSANEIS, A. C.; CASAGRANDE, R.; VERRI, W. A. The specialised pro-resolving  
1043 lipid mediator maresin 1 reduces inflammatory pain with a long-lasting analgesic effect.  
1044 **British Journal of Pharmacology**, vol. 176, no. 11, p. 1728–1744, 2019.  
1045 <https://doi.org/10.1111/bph.14647>.
- 1046 FATTORI, V.; ZANINELLI, T. H.; FERRAZ, C. R.; BRASIL-SILVA, L.; BORGHI, S. M.;  
1047 CUNHA, J. M.; CHICHORRO, J. G.; CASAGRANDE, R.; VERRI, W. A. Maresin 2 is  
1048 an analgesic specialized pro-resolution lipid mediator in mice by inhibiting neutrophil  
1049 and monocyte recruitment, nociceptor neuron TRPV1 and TRPA1 activation, and  
1050 CGRP release. **Neuropharmacology**, vol. 216, p. 109189, 2022a. DOI  
1051 10.1016/j.neuropharm.2022.109189. Available at:  
1052 <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2022.109189>. Accessed on: 19 Aug. 2022.
- 1053 FATTORI, V.; ZANINELLI, T. H.; FERRAZ, C. R.; BRASIL-SILVA, L.; BORGHI, S. M.;  
1054 CUNHA, J. M.; CHICHORRO, J. G.; CASAGRANDE, R.; VERRI, W. A.  
1055 Neuropharmacology Maresin 2 is an analgesic specialized pro-resolution lipid mediator  
1056 in mice by inhibiting neutrophil and monocyte recruitment , nociceptor neuron TRPV1  
1057 and TRPA1 activation , and CGRP release. **Neuropharmacology**, vol. 216, no. July,  
1058 p. 109189, 2022b. DOI 10.1016/j.neuropharm.2022.109189. Available at:  
1059 <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2022.109189>.
- 1060 FATTORI, V.; ZANINELLI, T. H.; RASQUEL-OLIVEIRA, F. S.; CASAGRANDE, R.;  
1061 VERRI, W. A. Specialized pro-resolving lipid mediators: A new class of non-  
1062 immunosuppressive and non-opioid analgesic drugs. **Pharmacological Research**,  
1063 2020a. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104549>.
- 1064 FATTORI, V.; ZANINELLI, T. H.; RASQUEL-OLIVEIRA, F. S.; CASAGRANDE, R.;  
1065 VERRI, W. A. Specialized pro-resolving lipid mediators: A new class of non-  
1066 immunosuppressive and non-opioid analgesic drugs. **Pharmacological Research**,  
1067 vol. 151, p. 104549, 2020b. DOI 10.1016/j.phrs.2019.104549. Available at:  
1068 <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104549>.
- 1069 FERRAZ, C. R.; MANCHOPE, M. F.; ANDRADE, K. C.; SARAIVA-SANTOS, T.;  
1070 FRANCIOSI, A.; ZANINELLI, T. H.; BAGATIM-SOUZA, J.; BORGHI, S. M.; CÂNDIDO,  
1071 D. M.; KNYSIAK, I.; CASAGRANDE, R.; KWASNIEWSKI, F. H.; VERRI, W. A.  
1072 Peripheral mechanisms involved in *Tityus bahiensis* venom-induced pain. **Toxicon**,  
1073 vol. 200, no. January, p. 3–12, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2021.06.013>.

- 1074 FERREIRA, S. H. Prostaglandins, Aspirin-like Drugs and Analgesia. **Nature New**  
1075 **Biology** **1972** **240:102**, vol. 240, no. 102, p. 200–203, 13 Dec. 1972. DOI  
1076 10.1038/newbio240200a0. Available at:  
1077 <https://www.nature.com/articles/newbio240200a0>. Accessed on: 15 Sep. 2022.
- 1078 FU, K. Y.; LIGHT, A. R.; MAIXNER, W. Long-lasting inflammation and long-term  
1079 hyperalgesia after subcutaneous formalin injection into the rat hindpaw. **Journal of**  
1080 **Pain**, vol. 2, no. 1, p. 2–11, 2001. <https://doi.org/10.1054/jpai.2001.9804>.
- 1081 GAO, Y.-J.; JI, R.-R. c-Fos or pERK, Which is a Better Marker for Neuronal Activation  
1082 and Central Sensitization After Noxious Stimulation and Tissue Injury? **The Open Pain**  
1083 **Journal**, vol. 2, no. 1, p. 11–17, 2009. <https://doi.org/10.2174/1876386300902010011>.
- 1084 JI, R. R.; GEREAU IV, R. W.; MALCANGIO, M.; STRICHARTZ, G. R. MAP kinase and  
1085 pain. **Brain Research Reviews**, vol. 60, no. 1, p. 135–148, 2009. DOI  
1086 10.1016/j.brainresrev.2008.12.011. Available at:  
1087 <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainresrev.2008.12.011>.
- 1088 JI, R. R.; XU, Z. Z.; GAO, Y. J. Emerging targets in neuroinflammation-driven chronic  
1089 pain. **Nature Reviews Drug Discovery**, vol. 13, no. 7, p. 533–548, 2014. DOI  
1090 10.1038/nrd4334. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nrd4334>.
- 1091 JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica e Atlas**. [S. l.: s. n.], 2013.
- 1092 KÁDKOVÁ, A.; SYNITSYA, V.; KRUSEK, J.; ZÍMOVÁ, L.; VLACHOVÁ, V. Molecular  
1093 basis of TRPA1 regulation in nociceptive neurons. A review. **Physiological research**,  
1094 vol. 66, no. 3, p. 425–439, 2017. DOI 10.33549/PHYSIOLRES.933553. Available at:  
1095 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28730837/>. Accessed on: 15 Sep. 2022.
- 1096 KARIM, F.; HU, H.; ADWANIKAR, H.; KAPLAN, D.; IV, R. W. G. Impaired inflammatory  
1097 pain and thermal hyperalgesia in mice expressing neuron-specific dominant negative  
1098 mitogen activated protein kinase kinase ( MEK ). vol. 10, p. 1–10, 2006.  
1099 <https://doi.org/10.1186/1744-8069-2-2>.
- 1100 KATSIANOU, M. A.; SKONDRA, F. G.; GARGALIONIS, A. N.; PIPERI, C.; BASDRA,  
1101 E. K. The role of transient receptor potential polycystin channels in bone diseases.  
1102 **Annals of translational medicine**, vol. 6, no. 12, p. 246–246, Jun. 2018. DOI  
1103 10.21037/ATM.2018.04.10. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30069448/>.  
1104 Accessed on: 15 Sep. 2022.
- 1105 KIM, Y. J.; GRANSTEIN, R. D. Roles of calcitonin gene-related peptide in the skin, and  
1106 other physiological and pathophysiological functions. **Brain, Behavior, & Immunity -**  
1107 **Health**, vol. 18, p. 100361, 1 Dec. 2021. <https://doi.org/10.1016/J.BBIH.2021.100361>.
- 1108 KOIVISTO, A. P.; BELVISI, M. G.; GAUDET, R.; SZALLASI, A. Advances in TRP  
1109 channel drug discovery: from target validation to clinical studies. **Nature Reviews**  
1110 **Drug Discovery**, vol. 21, no. 1, p. 41–59, 2022. DOI 10.1038/s41573-021-00268-4.

- 1111 Available at: <https://doi.org/10.1038/>.
- 1112 KONDO, M.; SHIBUTA, I. Extracellular signal-regulated kinases (ERK) 1 and 2 as a  
1113 key molecule in pain research. **Journal of Oral Science**, vol. 62, no. 2, p. 147–149,  
1114 2020. <https://doi.org/10.2334/JOSNUSD.19-0470>.
- 1115 KUMAR, V.; ASTER, J.; ABBAS, A. Robbins & Cotran Patologia - Bases Patológicas  
1116 das Doenças. **Elsevier Brasil**, no. 9º, p. 382–387, 2016. .
- 1117 LEE, M. J.; JANG, M.; JUNG, H. S.; KIM, S. H.; CHO, I. H. Ethyl pyruvate attenuates  
1118 formalin-induced inflammatory nociception by inhibiting neuronal ERK  
1119 phosphorylation. **Molecular Pain**, vol. 8, p. 1–13, 2012. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-8-40>.
- 1121 LI, K.; LIN, T.; CAO, Y.; LIGHT, A. R.; FU, K. Y. Peripheral formalin injury induces 2  
1122 stages of microglial activation in the spinal cord. **Journal of Pain**, vol. 11, no. 11, p.  
1123 1056–1065, 2010. DOI 10.1016/j.jpain.2010.01.268. Available at:  
1124 <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpain.2010.01.268>.
- 1125 LOGASHINA, Y. A.; KOROLKOVA, Y. V.; KOZLOV, S. A.; ANDREEV, Y. A. TRPA1  
1126 Channel as a Regulator of Neurogenic Inflammation and Pain: Structure, Function,  
1127 Role in Pathophysiology, and Therapeutic Potential of Ligands. **Biochemistry**  
1128 **(Moscow)**, vol. 84, no. 2, p. 101–118, 2019.  
1129 <https://doi.org/10.1134/S0006297919020020>.
- 1130 MARTINEZ, R. M.; ZARPELON, A. C.; DOMICIANO, T. P.; GEORGETTI, S. R.;  
1131 BARACAT, M. M.; MOREIRA, I. C.; ANDREI, C. C.; VERRI, W. A.; CASAGRANDE,  
1132 R. Antinociceptive Effect of Tephrosia sinapou Extract in the Acetic Acid, Phenyl-p-  
1133 benzoquinone, Formalin, and Complete Freund's Adjuvant Models of Overt Pain-Like  
1134 Behavior in Mice. **Scientifica**, vol. 2016, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/8656397>.
- 1135 MASSAAD, C. A.; SAFIEH-GARABEDIAN, B.; POOLE, S.; ATWEH, S. F.; JABBUR,  
1136 S. J.; SAADÉ, N. E. Involvement of substance P, CGRP and histamine in the  
1137 hyperalgesia and cytokine upregulation induced by intraplantar injection of capsaicin  
1138 in rats. **Journal of Neuroimmunology**, vol. 153, no. 1–2, p. 171–182, 2004.  
1139 <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2004.05.007>.
- 1140 MCNAMARA, C. R.; MANDEL-BREHM, J.; BAUTISTA, D. M.; SIEMENS, J.;  
1141 DERANIAN, K. L.; ZHAO, M.; HAYWARD, N. J.; CHONG, J. A.; JULIUS, D.; MORAN,  
1142 M. M.; FANGER, C. M. TRPA1 mediates formalin-induced pain. **Proceedings of the**  
1143 **National Academy of Sciences of the United States of America**, vol. 104, no. 33,  
1144 p. 13525–13530, 2007. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705924104>.
- 1145 PARADA, C. A.; TAMBELI, C. H.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. The major role of  
1146 peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalin-induced  
1147 nociception. **Neuroscience**, vol. 102, no. 4, p. 937–944, 2001.  
1148 [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(00\)00523-6](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(00)00523-6).

- 1149 PINHO-RIBEIRO, F. A.; HOHMANN, M. S. N.; BORGHI, S. M.; ZARPELON, A. C.;  
1150 GUAZELLI, C. F. S.; MANCHOPE, M. F.; CASAGRANDE, R.; VERRI, W. A. Protective  
1151 effects of the flavonoid hesperidin methyl chalcone in inflammation and pain in mice:  
1152 Role of TRPV1, oxidative stress, cytokines and NF- $\kappa$ B. **Chemico-Biological**  
1153 **Interactions**, vol. 228, p. 88–99, 2015. DOI 10.1016/j.cbi.2015.01.011. Available at:  
1154 <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2015.01.011>.
- 1155 PINHO-RIBEIRO, F. A.; VERRI, W. A.; CHIU, I. M. Nociceptor Sensory Neuron–  
1156 Immune Interactions in Pain and Inflammation. **Trends in Immunology**, vol. 38, no. 1,  
1157 p. 5–19, 1 Jan. 2017. DOI 10.1016/J.IT.2016.10.001. Available at:  
1158 <http://www.cell.com/article/S1471490616301430/fulltext>. Accessed on: 12 Sep. 2022.
- 1159 PUNCHARD, N. A.; WHELAN, C. J.; ADCOCK, I. The Journal of Inflammation.  
1160 **Journal of Inflammation**, vol. 1, 2004. DOI 10.1186/1476-9255-1-1. Available at:  
1161 <http://www.journal-inflammation.com/content/1/1/1>. Accessed on: 15 Sep. 2022.
- 1162 RONCHETTI, S.; MIGLIORATI, G.; DELFINO, D. V. Association of inflammatory  
1163 mediators with pain perception. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, vol. 96, no.  
1164 December, p. 1445–1452, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.12.001>.
- 1165 ROSA, A. C.; FANTOZZI, R. The role of histamine in neurogenic inflammation. **British**  
1166 **journal of pharmacology**, vol. 170, no. 1, p. 38–45, Sep. 2013. DOI  
1167 10.1111/BPH.12266. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23734637/>.  
1168 Accessed on: 13 Sep. 2022.
- 1169 SALINAS-ABARCA, A. B.; AVILA-ROJAS, S. H.; BARRAGÁN-IGLESIAS, P.;  
1170 PINEDA-FARIAS, J. B.; GRANADOS-SOTO, V. Formalin injection produces long-  
1171 lasting hypersensitivity with characteristics of neuropathic pain. **European Journal of**  
1172 **Pharmacology**, vol. 797, p. 83–93, 2017. DOI 10.1016/j.ejphar.2017.01.018.  
1173 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.01.018>.
- 1174 SALMON, A. M.; DAMAJ, M. I.; MARUBIO, L. M.; EPPING-JORDAN, M. P.; MERLO-  
1175 PICH, E.; CHANGEUX, J. P. Altered neuroadaptation in opiate dependence and  
1176 neurogenic inflammatory nociception in  $\alpha$ CGRP-deficient mice. **Nature**  
1177 **Neuroscience**, vol. 4, no. 4, p. 357–358, 2001. <https://doi.org/10.1038/86001>.
- 1178 SERHAN, C. N. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology.  
1179 **Nature**, 2014. <https://doi.org/10.1038/nature13479>.
- 1180 SERHAN, C. N.; DALLI, J.; COLAS, R. A.; WINKLER, J. W.; CHIANG, N. Protectins  
1181 and maresins: New pro-resolving families of mediators in acute inflammation and  
1182 resolution bioactive metabolome. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and**  
1183 **Cell Biology of Lipids**, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2014.08.006>.
- 1184 SOUSA-VALENTE, J.; BRAIN, S. D. A historical perspective on the role of sensory  
1185 nerves in neurogenic inflammation. **Seminars in Immunopathology**, vol. 40, no. 3, p.  
1186 229–236, 1 May 2018. DOI 10.1007/s00281-018-0673-1. Available at:  
1187 </pmc/articles/PMC5960476/>. Accessed on: 13 Sep. 2022.

- 1188 VALÉRIO, D. A.; GEORGETTI, S. R.; MAGRO, D. A.; CASAGRANDE, R.; CUNHA, T.  
1189 M.; VICENTINI, F. T. M. C.; VIEIRA, S. M.; FONSECA, M. J. V.; FERREIRA, S. H.;  
1190 CUNHA, F. Q.; VERRI, W. A. Quercetin reduces inflammatory pain: Inhibition of  
1191 oxidative stress and cytokine production. **Journal of Natural Products**, vol. 72, no.  
1192 11, p. 1975–1979, 2009. <https://doi.org/10.1021/np900259y>.
- 1193 VERRI, W. A.; CUNHA, T. M.; PARADA, C. A.; POOLE, S.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA,  
1194 S. H. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: Targets for analgesic drug  
1195 development? **Pharmacology and Therapeutics**, vol. 112, no. 1, p. 116–138, 2006a.  
1196 <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2006.04.001>.
- 1197 VERRI, W. A.; CUNHA, T. M.; PARADA, C. A.; POOLE, S.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA,  
1198 S. H. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: Targets for analgesic drug  
1199 development? **Pharmacology and Therapeutics**, vol. 112, no. 1, p. 116–138, 2006b.  
1200 <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2006.04.001>.
- 1201 VIANA, F. TRPA1 channels: molecular sentinels of cellular stress and tissue damage.  
1202 **Journal of Physiology**, vol. 594, no. 15, p. 4151–4169, 2016.  
1203 <https://doi.org/10.1113/JP270935>.
- 1204 VON FREY, M. Untersuchungen über die Sinnesfunctionen der menschlichen Haut.  
1205 Bände der Abhandlungen der mathematisch-physischen Classe der Königl.  
1206 Sächsischen Gesellschaft der Wissenschaften, 23: 175-266, 1896.
- 1207 XU, Z. Z.; ZHANG, L.; LIU, T.; PARK, J. Y.; BERTA, T.; YANG, R.; SERHAN, C. N.;  
1208 JI, R. R. Resolvins RvE1 and RvD1 attenuate inflammatory pain via central and  
1209 peripheral actions. **Nature Medicine**, 2010. <https://doi.org/10.1038/nm.2123>.
- 1210 YU, C.; SHI, Z.; OU, G.; CHEN, X.; LIU, Q.; ZENG, D.; NIE, X.; CHEN, J. Maresin-2  
1211 alleviates allergic airway inflammation in mice by inhibiting the activation of NLRP3  
1212 inflammasome, Th2 type immune response and oxidative stress. **Molecular**  
1213 **Immunology**, vol. 146, no. April, p. 78–86, 2022. DOI 10.1016/j.molimm.2022.03.118.  
1214 Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2022.03.118>.
- 1215 ZHANG, L.; YIN, J. Bin; HU, W.; ZHAO, W. J.; FAN, Q. R.; QIU, Z. C.; HE, M. J.; DING,  
1216 T.; SUN, Y.; KAYE, A. D.; WANG, E. R. Analgesic effects of duloxetine on formalin-  
1217 induced hyperalgesia and its underlying mechanisms in the CeA. **Frontiers in**  
1218 **Pharmacology**, vol. 9, no. APR, p. 1–15, 2018.  
1219 <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00317>.
- 1220 ZYGMUNT, P. M.; HÖGESÄTTT, E. D. TRPA1. **Handbook of Experimental**  
1221 **Pharmacology**, vol. 222, p. 583–630, 2014. DOI 10.1007/978-3-642-54215-  
1222 2\_23/COVER. Available at: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-54215-2\\_23](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-54215-2_23). Accessed on: 15 Sep. 2022.
- 1224
- 1225

1226

1227

1228

1229

1230

1231

1232

1233

1234

1235

1236

1237

1238

1239

## **ANEXOS**

1240

1241

1242

1243

1244

1245

1246

1247

1248

1249

1250

1251

1252

1253

1254

1255

1256

1257

1258

1259  
1260  
1261  
1262

## ANEXO A

### Comissão de Ética no Uso de Animais



#### 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<sub>2</sub>) 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

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

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

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

**Ilmo. Sr.**

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

Coordenador do Projeto

Departamento de Ciências Patológicas / Centro de Ciências Biológicas

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