



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

KETLEM CRISTINE ANDRADE

**EFEITO ANALGÉSICO E ANTI-INFLAMATÓRIO DO  
MEDIADOR LIPÍDICO PRÓ-RESOLUÇÃO 17(R)-RESOLVINA  
D1 NOS MODELOS DE ARTRITE INDUZIDO POR ZIMOSAN  
E CRISTAIS DE URATO MONOSSÓDICO EM  
CAMUNDONGOS**

KETLEM CRISTINE ANDRADE

**EFEITO ANALGÉSICO E ANTI-INFLAMATÓRIO DO  
MEDIADOR LIPÍDICO PRÓ-RESOLUÇÃO 17(R)-RESOLVINA  
D1 NOS MODELOS DE ARTRITE INDUZIDO POR ZIMOSAN  
E CRISTAIS DE URATO MONOSSÓDICO EM  
CAMUNDONGOS**

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

Orientador: Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verri Junior.

Londrina  
2021

KETLEM CRISTINE ANDRADE

**EFEITO ANALGÉSICO E ANTI-INFLAMATÓRIO DO  
MEDIADOR LIPÍDICO PRÓ-RESOLUÇÃO 17(R)-RESOLVINA  
D1 NOS MODELOS DE ARTRITE INDUZIDO POR ZIMOSAN  
E CRISTAIS DE URATO MONOSSÓDICO EM  
CAMUNDONGOS**

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

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr<sup>o</sup>. Waldiceu Ap. Verri Jr  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andressa de Freitas M Dionísio  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Dr<sup>a</sup>. Camila Rodrigues Ferraz  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 11 de março de 2021.

Dedico este trabalho a todos os envolvidos, a ajuda de cada um foi essencial. Em especial, a minha família e ao meu namorado Diego, pois sempre acreditaram no meu potencial. Amo imensamente vocês!

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por toda saúde, força, ânimo, coragem, paciência e determinação oferecidas para superar todos os desafios surgidos e alcançar mais um dos meus objetivos, pois sem Ele, nada seria possível.

Aos meus amados pais, por todo suporte, confiança, paciência e amor inigualável. Meu eterno carinho e gratidão. Amo vocês. Às minhas irmãs Kauana e Kananda, por nunca deixarem eu me sentir sozinha e estarem sempre por perto para me ouvir reclamar e ao mesmo tempo me fazerem rir. Ao meu incrível namorado Diego, que não mede esforços para me colocar para cima, me ama e me apoia incondicionalmente em todas as minhas escolhas, e está sempre ao meu lado para o que der e vier. Muito obrigado meu amor, te amo! A minha Tia Rô por todo o carinho e cuidado que tem por mim. Aos meus sogros, que me apoiam e sentem orgulho de mim. A minha dog Temari, por sempre me desestressar e me dar amor único e sincero.

Agradeço a minha grande amiga Fernanda Ambrósio, por todas as conversas, desabafos, risadas e lágrimas. Este trabalho não teria sido possível sem a sua grande ajuda. Com a amizade, apoio e carinho, os obstáculos se tornam mais leves. Levarei nossa amizade para toda vida.

Ao meu orientador, Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Waldiceu Aparecido Verri Junior, por todas as oportunidades, paciência e confiança. Serei eternamente grata.

À banca examinadora, escolhida com carinho, pela dedicação e contribuição essencial para este trabalho.

A toda equipe do LabDor e principalmente a Napola, Telma e Tiago. Amigos estes muito queridos, parceiros para todos os momentos e que nunca não mediram esforços para me ajudar. Agradeço imensamente pela contribuição profissional e principalmente pessoal, por todas as risadas que demos juntos, muito obrigada.

Aos professores, reconheço um grande esforço, paciência e sabedoria. Foram eles que me deram recursos e ferramentas para evoluir um pouco mais todos os dias.

À Universidade Estadual de Londrina, quero deixar uma palavra de gratidão por ter me recebido de braços abertos e, com todas as condições, me proporcionou dias ricos de aprendizagem.

Por fim, agradeço aos órgãos de fomento pelo financiamento do projeto e bolsa de mestrado, em específico ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), Fundação Araucária, Capes e Pronex.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

Marthin Luther King

ANDRADE, Ketlem Cristine. **Efeito analgésico e anti-inflamatório do mediador lipídico pró resolução 17(R)-Resolvina D1 nos modelos de artrite induzido por zimosan e cristais de urato monossódico em camundongos**. 2021. 93 páginas. Dissertação de Mestrado (Ciências da Saúde) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

## RESUMO

A artrite reumatoide (AR) é uma doença auto-imune progressiva que afeta as articulações induzindo inflamação em suas membranas sinoviais (sinovite), dor, rigidez, destruição das cartilagens, perda da funcionalidade e incapacidade física, com impacto direto na qualidade de vida e na sociabilidade dos pacientes afetados. Para permitir o estudo de parâmetros inflamatórios articulares semelhantes a AR em camundongos, utilizou-se um modelo experimental de administração intra-articular (i.a.) de zimosan, um polissacarídeo derivado da parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. A artrite gotosa (AG) ou gota é caracterizada por intensa resposta inflamatória articular e dor severa, é ocasionada por aumento da produção e/ou baixa excreção de ácido úrico, com deposição de cristais de urato monossódico (MSU) nas articulações e espaços adjacentes. A administração i.a. de MSU é utilizada como modelo experimental para estudar mecanismos fisiopatológicos e novas terapias para o tratamento da artrite gotosa, visto que este modelo mimetiza os quadros de agudização da gota. Atualmente, as abordagens terapêuticas empregadas no tratamento das artrites apresentam baixa eficiência na redução da dor além de apresentarem inúmeros efeitos adversos. A 17(R)-Resolvina D1 (17(R)-RvD1) ou AT-RvD1, é um mediador lipídico pró-resolução gerado pelo metabolismo dos ácidos graxos poli-insaturados do ômega-3, o ácido docosahexaenóico (DHA) simultaneamente ao tratamento com aspirina. Este mediador possui propriedades anti-inflamatórias e analgésicas. Até o momento, há trabalhos demonstrando o potencial terapêutico dos mediadores lipídicos, no entanto, não existem estudos elucidando os possíveis efeitos da 17(R)-RvD1 no processo inflamatório induzido pelo zimosan e MSU, dessa forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito analgésico e anti-inflamatório e mecanismos de ação do mediador nos dois modelos de artrite apresentados. Camundongos foram pré-tratados intra-peritonealmente (i.p.) com a 17(R)-RvD1 nas doses de 0,03; 0,3 e 3 ng/animal (an), 30 minutos (min) antes do estímulo i.a. de zimosan (100µg/10µL salina (sal)/an), para determinar a dose analgésica mais eficaz. Depois, foram avaliados os efeitos do tratamento sobre a hiperalgesia térmica, distribuição de peso entre as patas, recrutamento leucocitário, edema articular, análises histológicas e produção das citocinas IL-1β, TNF-α, IL-6 e IL-10. Os resultados obtidos demonstraram que a dose de 3ng/an da 17(R)-RvD1 apresentou maior eficácia na redução da hiperalgesia mecânica e térmica, da distribuição de peso entre as patas, do recrutamento total e diferencial de leucócitos, do edema articular, e dos níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-1β, TNF-α, IL-6 e anti-inflamatória IL-10. No modelo de AG, os camundongos foram tratados com a 17(R)-RvD1 (0,03; 0,3 ou 3 ng/an/i.p.) 30 min antes da injeção i.a. de MSU (100µg/10µL sal/an). Observou-se que a 17(R)-RvD1 na dose de 3 ng/an reduziu a hiperalgesia mecânica induzida por MSU de maneira dose-dependente, hiperalgesia térmica, o recrutamento leucocitário total e diferencial, edema articular, produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF-α, IL-1β e IL-6), estresse oxidativo [restabeleceu os

níveis de GSH e reverteu peroxidação lipídica (TBARS)], ativação do fator de transcrição nuclear NF- $\kappa$ B, sem provocar danos renais (níveis séricos de ureia e creatinina), hepáticos (níveis séricos de aspartato aminotransferase [AST] e alanina aminotransferase [ALT]) ou gástricos (atividade da mieloperoxidase [MPO]). Desta forma, demonstrou-se que a 17(R)-RvD1 possui propriedades analgésica e anti-inflamatórias nos modelos artrite induzida por zimosan e na AG induzida por MSU, sugerindo que essa molécula possa ser uma possível candidata ao tratamento dessas doenças.

**Palavras-chave:** artrite reumatoide; gota; AT-RvD1; hiperalgesia; inflamação.

ANDRADE, Ketlem Cristine. 17(R)-Resolvina D1: **Efeito analgésico e anti-inflamatório do mediador lipídico pró resolução 17(R)-Resolvina D1 nos modelos de artrite induzido por zimosan e cristais de urato monossódico em camundongos**. 2020. 93 páginas. Dissertação de Mestrado (Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

## ABSTRACT

Rheumatoid arthritis (RA) is a progressive autoimmune disease that affects the joints inducing inflammation in their synovial membranes (synovitis), pain, stiffness, cartilage destruction, loss of functionality, and physical disability, with a direct impact on the quality of life and sociability of affected patients. To allow the study of joint inflammatory parameters similar to phenomenon RA in mice, an intra-articular experimental model (a.i.) of zymosan, a polysaccharide derived from the cell wall of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, was used. Gouty arthritis (GA) or gout is characterized by an intense articular inflammatory response and severe pain. It is opposed by increased production and/or low excretion of uric acid, with deposition of monosodium urate crystals (MSU) in adjacent joints and spaces. The administration of MSU (i.a.) is used as an experimental model to study pathophysiological mechanisms and new therapies for the treatment of gout since this model mimetics the conditions of gout sharpening. Currently, the therapeutic approaches used in the treatment of arthritis have low efficiency in reducing pain and have numerous adverse effects. 17(R)-Resolvin D1 (17(R)-RvD1) or AT-RvD1 is a pro-resolution lipid mediator generated by the metabolism of polyunsaturated fatty acids of omega-3, docosahexaenoic acid (DHA) simultaneously with aspirin treatment. This mediator has anti-inflammatory and analgesic properties. So far, there are studies demonstrating the therapeutic potential of lipid mediators, however, there are no studies elucidating the possible effects of 17(R)-RvD1 on the inflammatory process induced by zimosan and MSU, therefore, the present study aimed to evaluate the analgesic and anti-inflammatory effect and mechanisms of action of the mediator in the two models of arthritis presented. Mice were pretreated intraperitoneally (i.p.) with 17(R)-RvD1 at doses of 0.03; 0.3; and 3 ng/mouse, 30 minutes (min) before the i.a. zymosan stimulus (100µg/10µL saline/mouse), to determine the most effective analgesic dose. Then, the effects of treatment on thermal hyperalgesia, weight distribution between paws, leukocyte recruitment, joint edema, histological analyses, and production of IL-1β, TNF-α, IL-6, and IL-10 cytokines were evaluated. The results showed that the 3ng/mouse a dose of 17(R)-RvD1 showed greater efficacy in reducing mechanical and thermal hyperalgesia, weight distribution between paws, total and differential recruitment of leukocytes, joint edema, and levels of pro-inflammatory cytokines IL-1β, TNF-α, IL-6, and anti-inflammatory IL-10. In the GA model, the mice were treated with a 17(R)-RvD1 (0.03, 0.3 or 3 ng/mouse/i.p.) 30 min before the a.i. injection of MSU (100µg/10µL saline/mouse). It was observed that 17(R)-RvD1 at a dose of 3 ng/an before stimulation, reduced MSU-induced mechanical hyperalgesia in a dose-dependent manner, thermal hyperalgesia, total and differential recruitment of leukocytes, joint edema, production of pro-inflammatory cytokines (TNF-α, IL-1β and IL-6), oxidative stress (reestablished GSH levels and reversed lipid peroxidation [TBARS]), activation of NF-κB nuclear transcription factor, without causing kidney damage (serum levels of urea and, creatinine), liver damage (serum levels of aspartate aminotransferase [AST]

and, alanine aminotransferase [ALT]) or gastric damage (activity myeloperoxidase [MPO]). Thus, it was demonstrated that 17(R)-RvD1 has analgesic and anti-inflammatory properties in the zymosan-induced arthritis models and MSU-induced GA, suggesting that this molecule may be a possible candidate for the treatment of these diseases.

**Key words:** rheumatoid arthritis; gout; AT-RvD1; hyperalgesia; inflammation.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1-</b>	Fisiopatologia da artrite induzida por Zimosan.....	21
<b>Figura 2 -</b>	Fisiopatologia da artrite gotosa .....	24
<b>Figura 3 -</b>	Metabolismo dos ácidos graxos essenciais do $\omega$ -3.....	27
<b>Figura 4 -</b>	Biossíntese e estrutura química da 17(R)-Resolvina D1 .....	29

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

15-LOX	15 Lipoxigenase
17(R)-RvD1/AT-RvD1/17-epi-RvD1	17(R)-Resolvina D1
5-LOX	5-Lipoxigenase
AG	Artrite gotosa ou gota
AIA	Artrite induzida por antígeno
AINEs	Anti-inflamatórios não esteroidais
ALT	Alanina aminotransferase
AN	Animal
AR	Artrite Reumatoide
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Adenosina trifosfato
C5a	Proteína 5ª do complemento
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
COX-2	Ciclo-oxigenase-2
CXCL1	Ligante de quimiocina 1
CXCL3	Ligante de quimiocina 3
DAMPs	Padrões moleculares associados ao dano
DHA	Ácido docosahexaenóico
DSS	Sulfato dextrano de sódio
EPA	Ácido eicosapentaenóico
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ET-1	Endotelina 1
FFAs	Ácidos graxos livres de cadeia longa
Fibras A $\delta$	Fibras delta
GM-CSF	Fator estimulante de colônias de granulócitos-macrófagos
I.A.	Intra-articular
I.P.	Intra-peritonealmente
IASP	Associação Internacional no Estudo da Dor
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1
IL-1ra	Antagonista de receptor da IL-1
IL-1 $\beta$	Interleucina beta
IL-33	Interleucina 33
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8

LOX	Lipoxigenase
LTB4	Leucotrieno 4
LTs	Leucotrienos
LXs	Lipoxinas
MA	Macrófagos
MLPI	Mediadores lipídicos pró-inflamatório
MLPR	Mediadores lipídicos pró-resolução
MO	Microorganismos
MPO	Mieloperoxidase
mRNA	RNA mensageiro
MSU	Urato monossódico
NE	Neutrófilos
NEK7	Serina/treonina-proteína quinase 7
NETs	Armadilhas extracelulares de neutrófilos
NF-κB	Fator de transcrição nuclear κB
NLRP3	inflamossoma NLRP3
NO	Óxido nítrico
PAFs	Fatores de ativação plaquetária
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PGE2	Prostaglandina E2
PGEI2	Prostaciclina I2
PGs	Prostaglandinas
PMN	Leucócitos polimorfonucleares
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrões
PUFAs	Ácidos graxos poli-insaturados do ômega-3
RIPK3	Serina/treonina-proteína quinase 3
RvD	Resolvinas da série D
RvE	Resolvinas da série E
SAL	Salina
TLRs	Receptores tipo Toll
TNBS	Ácido 2,4,6-trinitrobenzenossulfônico
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
VCAM-1	Proteína de adesão celular vascular 1
XOD	Enzima xantina oxidase hepática
Zym	Zymosan
ω-3	Ômega-3

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
1.1	INFLAMAÇÃO.....	15
1.2	DOR INFLAMATÓRIA .....	18
1.2.1	Artrite induzida por Zimosan.....	20
1.2.2	Artrite Gotosa .....	22
1.3	MEDIADORES LIPÍDICOS PRÓ-RESOLUÇÃO .....	26
1.3.1	17(R)-Resolvina D1.....	28
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	32
2.1	OBJETIVOS GERAIS.....	32
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	32
<b>3</b>	<b>MATERIAS E MÉTODOS</b> .....	33
3.1	ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	33
3.2	MODELO EXPERIMENTAL DE ARTRITE INDUZIDA POR ZIMOSAN .....	33
3.3	MODELO EXPERIMENTAL DE DOR E INFLAMAÇÃO INDUZIDO POR CRISTAIS DE URATO MONOSSÓDICO (MSU) .....	33
3.4	TRATAMENTO DOS ANIMAIS .....	34
3.5	AVALIAÇÃO DA HIPERALGESIA MECÂNICA PELO TESTE DE PRESSÃO CRESCENTE .....	34
3.6	AVALIAÇÃO DAS MUDANÇAS NA DISTRIBUIÇÃO DO PESO DAS PATAS (SWB).....	34
3.7	AVALIAÇÃO DA HIPERALGESIA TÉRMICA.....	35
3.8	AVALIAÇÃO DO EDEMA ARTICULAR.....	35
3.9	DETERMINAÇÃO DO RECRUTAMENTO E PERFIL LEUCOCITÁRIO NA CAVIDADE ARTICULAR POR MICROSCOPIA .....	35
3.10	ANÁLISES HISTOLÓGICAS DAS ARTICULAÇÕES .....	36
3.11	AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO PERIFÉRICA (LOCAL) DE CITOCINAS.....	36
3.12	AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO PELOS NÍVEIS DE GLUTATIONA REDUZIDA (GSH) .....	37
3.13	AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO ATRAVÉS DA PEROXIDAÇÃO	

	LIPÍDICA (TBARS).....	37
3.14	ENSAIO DE IMUNOFLOURESCÊNCIA POR MICROSCOPIA CONFOCAL .....	37
3.15	MARCADORES DE LESÃO RENAL (UREIA / CREATININA).....	38
3.16	MARCADORES ENZIMÁTICOS DE LESÃO HEPÁTICA (AST/ALT) .....	38
3.17	ENSAIO DE TOXICIDADE NO ESTÔMAGO (ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE [MPO]) .....	38
3.18	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	39
<b>4</b>	<b>ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO .....</b>	<b>40</b>
4.1	ARTIGO 1 .....	40
4.2	17(R)-RESOLVIN D1 AMELIORATES ZYMOSAN-INDUCED EXPERIMENTAL ARTHRITIS IN MICE EXERTING ANTI-INFLAMMATORY AND ANALGESIC EFFECTS.....	41
4.3	ARTIGO 2 .....	56
4.4	THE PRO-RESOLVING LIPID MEDIATOR ASPIRIN-TRIGGERED RESOLVIN D1 ATTENUATES GOUTY ARTHRITIS IN MICE VIA INHIBITION OF NF-kB ACTIVATION IN CD11B <sup>+</sup> CELLS.....	57
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>79</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>80</b>
	<b>ANEXO 1 - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS .....</b>	<b>93</b>

# 1 1 INTRODUÇÃO

## 2 1.1 INFLAMAÇÃO

3 A inflamação é uma resposta imune protetora por parte do hospedeiro frente a  
4 um estímulo e/ou circunstância nociva, como uma injúria tecidual provocada por traumas e  
5 infecções causadas por microorganismos (MO) ou corpos estranhos (MAJNO, JORIS, 2004;  
6 MEDZHITOV, 2008). O processo inflamatório, quando ocorre de modo adequado e  
7 controlado, é um processo bioquímico e metabólico ativo, pré-programado, estereotipado e  
8 autolimitado, e é o único mecanismo identificado para restauração do tecido após lesão, para  
9 a resolução de doenças, promoção da homeostase e manutenção da saúde (BANNENBERG  
10 et al., 2005; SERHAN et al., 2004, 2007).

11 Quando um MO penetra no tecido ou o tecido é lesionado, a presença de  
12 infecção ou lesão, induz duas rotas principais: as reações vasculares e as respostas celulares,  
13 ambas ativadas por mediadores químicos derivados das proteínas plasmáticas e de várias  
14 células imunes (exemplos: macrófagos, células dendríticas, mastócitos) (KUMAR, ABBAS,  
15 ASTER, 2013). As manifestações externas da inflamação, chamadas de sinais cardinais, são:  
16 eritema (rubor ou vermelhidão), calor (temperatura elevada), edema (tumor ou inchaço) e dor  
17 (algia) (MAJNO, JORIS, 2004; KUMAR, ABBAS & FAUSTO, 2005). Quando existe  
18 exacerbação dos 4 primeiros sinais, pode ocorrer destruição de tecidos, formação de fibrose  
19 e eventual perda da função do tecido e/ou órgão afetado (ROCHA & SILVA, 1994; MADERNA  
20 & GODSON, 2009).

21 O processo inflamatório pode ser agudo ou crônico. A inflamação aguda é de  
22 início rápido e de curta duração (poucos minutos a poucos dias), e caracteriza-se pela  
23 exsudação de líquido e proteínas plasmáticas, e acúmulo de leucócitos, predominantemente  
24 neutrófilos (NE). A inflamação crônica é persistente, de duração mais longa (dias a anos) e  
25 representada pelo influxo de linfócitos e macrófagos (MA) com proliferação vascular  
26 associada e fibrose (cicatrização). Entretanto, elas podem se sobrepor (KUMAR, ABBAS,  
27 ASTER, 2013).

28 Os vasos linfáticos assim como os vasos sanguíneos, também participam da  
29 resposta inflamatória. Como o fluxo da linfa é ampliado na inflamação, ele tem por finalidade  
30 drenar: o fluido do edema, os leucócitos e restos celulares do espaço extravascular. Em  
31 situações em que as reações inflamatórias são mais extensas, por exemplo, ocasionadas por  
32 microorganismos, os vasos linfáticos podem transportar o agente lesivo, contribuindo para  
33 sua disseminação (KUMAR, ABBAS, ASTER, 2013).

34 A princípio, transcorre a fase vascular, onde há um aumento do fluxo sanguíneo  
35 resultante da vasodilatação e da permeabilidade vascular, ambos responsáveis por recrutar  
36 células sanguíneas e proteínas para os sítios de infecção ou lesão. Esse aumento da  
37 capacidade do suporte vascular e aporte sanguíneo local, são as causas do eritema e calor.  
38 A maioria das alterações vasculares iniciais são iniciadas por mediadores inflamatórios  
39 liberados por células inflamatórias locais, tais como serotonina, óxido nítrico (NO), histamina,  
40 prostaglandinas, fator ativador de plaquetas (PAF, do inglês Platelet-Activating Factors),  
41 bradicinina e trombina (KUMAR, ABBAS & FAUSTO, 2005). Como a microcirculação torna-se  
42 mais permeável, o líquido rico em proteínas (exsudato) extravasa para dentro dos tecidos  
43 extravasculares e esse acúmulo de líquido forma o edema (KUMAR, ABBAS, ASTER, 2013).  
44 A perda de exsudato faz com que as hemácias fiquem mais concentradas, intensificando,  
45 assim, a viscosidade do sangue e reduzindo a velocidade da circulação (estase).

46 Quando o processo de estase é desenvolvido, há a promoção da fase celular  
47 da resposta inflamatória. Inicia-se com a marginalização dos leucócitos, principalmente os  
48 neutrófilos, que se acumulam ao longo da superfície endotelial vascular. O seu contato com  
49 as células endoteliais ativadas via moléculas de adesão (selectinas e integrinas), ocasiona os  
50 processos de rolamento ao longo da parede do vaso, adesão ao endotélio, transmigração  
51 (diapedese) entre as células endoteliais e migração dos leucócitos para os tecidos intersticiais,  
52 em direção a um estímulo quimiotático (SPECTOR, WILLOUGHBY, 1964; BOTTARO et al.,  
53 1986; KUMAR, ABBAS, FAUSTO, 2005; THEOHARIDES et al., 2007; ABBAS, LICHTMAN,  
54 PILLAI, 2011; KUMAR, ABBAS, ASTER, 2013; MITTAL et al., 2014;).

55 Ao migrarem em direção ao foco inflamatório, os leucócitos devem ser ativados  
56 e exercer suas funções, tais como: -fagocitose e destruição intracelular e extracelular de  
57 patógenos e detritos celulares, por substâncias produzidas nos fagossomos, incluindo  
58 espécies reativas do oxigênio (EROs) e do nitrogênio (ERNs) (KUMAR; ABBAS; FAUSTO,  
59 2005) e enzimas lisossômicas. Um mecanismo pelo qual os neutrófilos destroem  
60 microrganismos extracelulares é a formação de “armadilhas” extracelulares (NETs-  
61 Neutrophils Extracellular Traps). -Produção de mediadores, incluindo as citocinas e os  
62 metabólitos do ácido araquidônico, que amplificam a reação inflamatória, por recrutamento e  
63 ativação de mais leucócitos (KUMAR, ABBAS, ASTER, 2013).

64 Os neutrófilos, leucócitos polimorfonucleares, são as primeiras células imunes  
65 a migrarem em direção ao local lesado, sendo cruciais como a primeira linha de proteção do  
66 sistema imunológico inato devido às suas funções fagocíticas e microbicidas (MIYAZAKI,  
67 2000). Inicialmente liberam mediadores lipídicos pró-inflamatórios (MLPI) contribuindo para a  
68 amplificação da inflamação e podem modificar seu perfil para mediadores lipídicos pró-  
69 resolução (MLPR), agindo como agonistas para limitar ativamente a inflamação e promover a

70 resolução (SERHAN, 2004). Monócitos que se diferenciam em macrófagos não-flogísticos  
71 (leucócitos mononucleares), responsáveis pela limpeza dos debrís celulares e os neutrófilos  
72 flogísticos, que fagocitam sem prorrogar a inflamação também são recrutados para o local  
73 inflamatório (MIYAZAKI, 2000; SAVILL & DRANSFIELD, 2002), no entanto, nem sempre esse  
74 processo de recrutamento celular segue essa sequência temporal, pois não é sempre que um  
75 processo inflamatório é resolvido, podendo perdurar (KUMAR, ABBAS, ASTER, 2013).

76 O sistema imune inato é capaz de reconhecer uma série de tipos de patógenos  
77 distintos, tais como bactérias, vírus e fungos, através dos padrões moleculares associados a  
78 patógenos (PAMPs) ou pelos padrões moleculares associados a danos (DAMPs) mediante  
79 receptores específicos nas células conhecidos como receptores de reconhecimento de  
80 padrões (PRRs, do inglês Pattern-Recognition Receptors). Esses receptores são expressos  
81 por uma variedade de células imunológicas, incluindo macrófagos, monócitos, células  
82 dendríticas e neutrófilos, possibilitando assim uma resolução mais veloz do problema  
83 (TAKEUCHI et al., 2010; ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2011; KAWAI, AKIRA, 2011).

84 Dentre os PRRs, podemos citar os receptores tipo Toll (TLRs, do inglês Toll like  
85 receptors), dos quais a ativação resulta em uma cascata de sinalização complexa,  
86 promovendo a ativação do fator de transcrição nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) e consequente secreção  
87 de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF-  $\alpha$ ), interleucina beta  
88 (IL-1 $\beta$ ), interleucina 33 (IL-33), interleucina 6 (IL-6) e quimiocinas (VERRI et al., 2006;  
89 MEDZHITOV, 2008; LIN; KAKKAR; LU, 2016). As citocinas são polipeptídios capazes de  
90 regular a morte celular de tecidos inflamados, modificar a permeabilidade vascular, recrutar  
91 células sanguíneas para o foco inflamatório e induzir a produção de proteínas de fase aguda  
92 (TAKEUCHI et al., 2010). Além disso, como demonstrado por Cunha et al. (2005), as citocinas  
93 também mediam a hiperalgesia inflamatória em camundongos.

94 Uma vez que a inflamação aguda tenha cumprido o seu papel em vetar o  
95 agente lesivo, inúmeros desfechos que abrangem progressão para inflamação crônica, como  
96 ações de reparo (cicatrização e fibrose) ou resolução completa começam a sobrevir à  
97 inflamação (COTRAN et al., 1999). A lesão celular e tecidual suscita eventos que tem por  
98 finalidade conter a inflamação excessiva e iniciar o processo de cura. O reparo é  
99 frequentemente combinado de regeneração e formação de cicatrizes por deposição de  
100 colágeno. Pode haver graus variados de reparo por regeneração e cicatrização dependendo  
101 do tipo de tecido lesionado, da extensão e intensidade da inflamação (KUMAR; ABBAS;  
102 FAUSTO, 2005). Este episódio é acompanhado pela mudança de classe de MLPI, como as  
103 prostaglandinas (PGs) e leucotrienos (LTs) para a biossíntese de MLPR, como as lipoxinas  
104 (LXs) (LEVY et al., 2001), bem como o aparecimento de novas famílias de mediadores pró-  
105 resolução biossintetizados em exsudatos a partir de precursores de ácidos graxos poli-

106 insaturados do ômega-3 e 6 (PUFAs), originando as lipoxinas, resolvinas, protectinas e  
107 maresinas, moléculas com ações analgésicas e anti-inflamatórias (SERHAN et al., 2000,  
108 2002; HONG et al., 2003).

## 109 **1.2 DOR INFLAMATÓRIA**

110 No decorrer da evolução, a dor, ou seja, a detecção de um estímulo nociceptivo  
111 e a transmissão dessa informação nociceptiva para interpretação no córtex cerebral, foi uma  
112 das estratégias resguardadas a fim de conferir ao indivíduo a capacidade de autopreservação.  
113 Esta interpretação considera que a detecção de estímulos dolorosos é crucial para o  
114 reconhecimento de situações que possam causar danos ou regular aquelas já presentes em  
115 uma lesão, assegurando a integridade corporal e perpetuação das espécies. Embora  
116 evolutivamente vantajosas, as sensações nociceptivas agudas e as de natureza duradoura  
117 (dor crônica), levam a diminuição das atividades diárias com significativa perda da qualidade  
118 de vida do indivíduo. Dores contínuas compõem um extenso risco a saúde pública, podendo  
119 desencadear pensamentos e comportamentos depreciativos a integridade física e mental,  
120 além de práticas suicidas (CALATI et al., 2015).

121 A dor é uma sensação complexa, definida segundo a Associação Internacional  
122 para o Estudo da Dor (IASP) como uma experiência sensitiva e emocional desagradável  
123 associada, ou semelhante àquela associada, a uma lesão tecidual real ou potencial (RAJA et  
124 al., 2020). Portanto, o limiar nociceptivo modifica-se de acordo com as experiências  
125 emocionais vividas, estado de humor, atenção (BUSHNELL et al., 2013) e expectativas em  
126 relação à intensidade do estímulo (WIESER et al., 2014). Todavia, as definições mais  
127 modernas da fisiologia da dor enfatizam na sensibilização periférica de nociceptores,  
128 sensibilização espinal, plasticidade neural e mudança de fenótipo neuronal e de células do  
129 sistema imune (MOGIL et al., 2000; WOOLF & SALTER, 2000; SCHOLZ & WOOLF, 2002;  
130 REICHLING & LEVINE, 2009).

131 O fenômeno doloroso, inicia-se com a captação de estímulos (natureza térmica,  
132 química ou mecânica), sensibilização (ação de substâncias químicas, exemplos: acetilcolina,  
133 bradicinina, histamina, serotonina, leucotrieno, substância P, fator de ativação plaquetário,  
134 radicais ácidos, íons potássio, prostaglandinas, tromboxano, interleucinas, fator de necrose  
135 tumoral (TNF $\alpha$ ), fator de crescimento nervoso (NGF) e monofosfato cíclico de adenosina  
136 (AMPc) (BEDBROOK, 1976; PIOTROWSKI & FOREMAN, 1986; CAMPBELL et al., 1989) e  
137 ativação dos receptores específicos para a dor, localizados nas terminações de fibras  
138 nociceptivas aferentes periféricas A $\delta$  (delta) e C. Essas fibras, sofrem alterações nas suas  
139 membranas, permitindo a deflagração de potenciais de ação até o sistema nervoso central

140 (SNC), onde há a interpretação da resposta dolorosa no córtex cerebral (BESSION & PERL  
141 1969; LOEWENSTEIN 1971; LEVINE & TAIWO 1994; FERREIRA et al., 2009). As fibras A $\delta$   
142 são mielinizadas e as fibras C não são mielinizadas e possuem a capacidade de transmitir  
143 estímulos dolorosos em diferentes velocidades. As fibras A $\delta$ , em função da presença da  
144 bainha de mielina, transmitem o estímulo doloroso de forma rápida (35-75 m/s) e causam  
145 sensação dolorosa intensa semelhante à pontada, mas de forma passageira, enquanto as  
146 fibras C são responsáveis pela transmissão lenta (5-30 m/s) da dor (RANG et al., 1991).  
147 Quando ativadas, causam sensação semelhante à queimação persistente (ROBBINS, 2005)  
148 e são responsáveis pela sensação de coceira (FEIN et al., 2011).

149           Sobretudo, o processo de nocicepção abrange a transdução, condução,  
150 transmissão e percepção dos estímulos nocivos por diferentes tratos nervosos ascendentes  
151 e descendentes que regulam esse processo. De modo geral, a sensibilização periférica por  
152 um estímulo nociceptivo suscita um mecanismo ascendente que se traduz na despolarização  
153 de nociceptores de primeira ordem e a condução do impulso nervoso até o corno da raiz dorsal  
154 da medula espinal. Nesta área, mediante neurotransmissores excitatórios (peptídeo  
155 relacionado ao gene da calcitonina [CGRP], substância P, neurocinina A e glutamato)  
156 (SCHOLZ & WOOLF, 2002; BRAZ et al., 2014), acontece a transmissão da informação para  
157 nociceptores de segunda ordem ou interneurônios, em direção a estruturas supra-espinais.  
158 Por fim, a percepção da dor é o fornecimento da informação referente ao estímulo inicial,  
159 através de sinapses no córtex somatosensorial, sobre a localização e intensidade do estímulo  
160 e abrange ainda o componente emocional do processo doloroso (MILLAN, 1999; MOGIL et  
161 al., 2000; WOOLF & SALTER, 2000; SCHOLZ & WOOLF, 2002; REICHLING & LEVINE, 2009;  
162 TODD, 2010).

163           Desta forma, faz-se necessário compreender os mecanismos fisiológicos e os  
164 agentes envolvidos na percepção da dor, em especial a dor inflamatória. A dor inflamatória é  
165 originada pela ação de mediadores inflamatórios (IL-1 $\beta$ , TNF-  $\alpha$ , leucotrieno B4 [LTB<sub>4</sub>],  
166 prostaglandina E2 [PGE<sub>2</sub>], prostaciclina I<sub>2</sub> [PGI<sub>2</sub>], adenosina trifosfato [ATP], C5a, dopamina  
167 e epinefrina) (FERREIRA et al., 1988; CUNHA et al., 1992; FERREIRA et al., 1993; WATKINS  
168 et al., 1995; MOGIL et al., 2000; WOOLF & SALTER, 2000; SCHOLZ & WOOLF, 2002;  
169 GUERRERO et al., 2006; VERRI et al., 2006; BRAZ et al., 2014) e a atuação de EROs e ERNs  
170 formadas no local da inflamação, em seus receptores presentes na membrana dos  
171 nociceptores periféricos (HARDY et al., 1950) que favorecem a dor (WANG et al., 2006;  
172 NDENGELE et al., 2008; KEEBLE et al., 2009).

173           Estes mediadores são liberados pelas células lesionadas, pelo reconhecimento  
174 de um elemento estranho por células de defesa residentes, como, por exemplo, os  
175 macrófagos (FERREIRA, 1993; RIBEIRO et al., 1997, 2000). Por alterações funcionais em

176 células endoteliais (como por exemplo, dilatação e aumento da permeabilidade), ativação de  
177 componentes plasmáticos (calicreína e sistema complemento) e recrutamento de células de  
178 defesa adicionais ao foco inflamatório. Ademais, um fator usual para a persistência da dor  
179 inflamatória é a presença de neutrófilos (CUNHA et al., 2008).

180 Todos estes eventos associados contribuem para o aumento da sensibilidade  
181 neuronal (hiperalgesia) a estímulos que em condições naturais produzem dor moderada ou  
182 dor alguma (alodinia). Essa sensibilização do neurônio é uma característica importante da dor  
183 inflamatória, sendo que o bloqueio deste fenômeno representa o principal mecanismo de ação  
184 dos analgésicos e anti-inflamatórios comercializados para o uso humano e veterinário  
185 (CUNHA et al., 1992, FERREIRA et al., 1993; WATKINS et al., 1995; LORENZETTI et al.,  
186 2002; SACHS et al., 2002).

### 187 **1.2.1 Artrite induzida por Zimosan**

188 A artrite é um termo amplo definida por um distúrbio musculoesquelético  
189 associado a um processo inflamatório existente nas articulações e tecidos adjacentes, que  
190 causam um conjunto de sinais e sintomas como dor, edema e rigidez articular e redução do  
191 movimento, podendo resultar em dor crônica e levar o indivíduo a alterações articulares  
192 permanentes (SPRANGERS et al., 2000; BEUKELMAN et al., 2017). Essa alteração pode  
193 atingir pessoas de todas as idades, raças e sexo (CONTE et al., 2008).

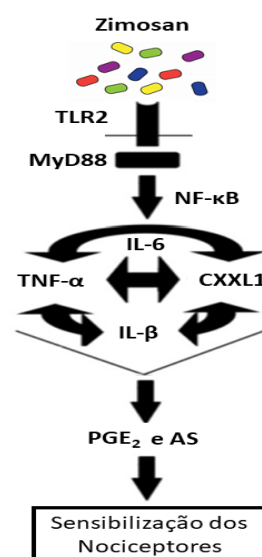
194 Há mais de 100 tipos distintos de artrite e condições associadas, sendo que as  
195 mais relevantes para a saúde pública abrangem: (1) osteoartrites – doença articular  
196 degenerativa acompanhada de alterações das estruturas ósseas vizinhas (artrose ou  
197 osteoartrose), (2) artrite inflamatória e autoimune – engloba a artrite reumatoide e a idiopática  
198 juvenil e está associada ao descontrole do sistema imune que, erroneamente, acomete as  
199 articulações, (3) metabólica – que inclui a artrite gotosa, na qual ocorre o acúmulo de ácido  
200 úrico nas articulações em forma de cristais – e por fim, a (4) infecciosa – iniciada por ação de  
201 um microorganismo como bactéria, fungo ou vírus (CONTE et al., 2008; MATHEW;  
202 RAVINDRAN, 2014; WILSON; SASEEN, 2016).

203 A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune progressiva que afeta as  
204 articulações induzindo uma inflamação em suas membranas sinoviais (sinovite), dor, rigidez,  
205 destruição das cartilagens, perda da funcionalidade e incapacidade física, com impacto direto  
206 na qualidade de vida e na sociabilidade dos pacientes afetados (ASQUITH et al., 2009;  
207 CROSS et al., 2014).

208 A proliferação de sinoviócitos residentes permitem que ocorra uma

209 neovascularização da membrana sinovial e infiltração de macrófagos e fibroblastos, além de  
 210 um influxo de linfócitos B e T, plasmócitos, mastócitos, células dendríticas e neutrófilos  
 211 (GORONZY; WEYAND, 2005). A camada sinovial hiperplasiada, também chamada de  
 212 “pannus”, contribui para a destruição dos ossos e cartilagens dentro da articulação. Desta  
 213 maneira, as primeiras citocinas produzidas no líquido sinovial são a IL-1 $\beta$  e o TNF- $\alpha$ , que por  
 214 sua vez, induzem várias outras citocinas da cascata pró-inflamatória (SIEBERT et al., 2015;  
 215 GUAZELLI et al., 2018). Para permitir o estudo desse fenômeno inflamatório articular em  
 216 camundongos, foi utilizado um modelo experimental intra-articular de zimosan, um  
 217 polissacarídeo derivado da parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. As  
 218 alterações induzidas pelo zimosan na articulação se assemelham à artrite reumatoide (AKIRA;  
 219 TAKEDA, 2004; GUAZELLI et al., 2018).

220 Neste modelo, a hiperalgesia articular é ativada pela via TLR2 que recruta a  
 221 proteína adaptadora MyD88. Esta via de sinalização leva à ativação de fatores de transcrição,  
 222 como o NF- $\kappa$ B, que desencadeiam a produção de mediadores inflamatórios, incluindo as  
 223 citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 e as quimiocinas CXCL1 e CXCL3 (AKIRA; TAKEDA, 2004;  
 224 GUERRERO et al., 2012) (Figura 1). O sistema complemento, endotelina-1 (ET-1) e produtos  
 225 do ácido araquidônico, como por exemplo, a PGE2 e LTB4 também estão envolvidos na  
 226 inflamação induzida por zimosan. Este último, por sua vez, contribui para a atividade  
 227 quimiotática de neutrófilos e produção de mais citocinas (GUERRERO et al., 2007;  
 228 GUERRERO et al., 2012; GUAZELLI et al., 2018). A endotelina participa da inflamação  
 229 articular atuando através de receptores acoplados à proteína G e modulando o recrutamento  
 230 de neutrófilos, formação de edema e produção de TNF- $\alpha$  e quimiocinas (CONTE et al., 2008).



231

232 **Figura 1- Fisiopatologia da artrite induzida por Zimosan.** Papel da sinalização de TLR2/MyD88  
 233 com participação do NF- $\kappa$ B na dor artrítica pela estimulação de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e CXCL1,  
 234 que por sua vez, promovem a produção de prostaglandinas e aminas simpatomiméticas (AS).

235  
236  
237

**Fonte: Adaptado de GUERRERO, 2011**

238 Os tratamentos clínicos convencionais utilizados na AR são baseados em  
239 glicocorticoides e AINES, para a inflamação aguda, e para terapia de manutenção,  
240 medicamentos antirreumáticos como o metotrexato, hidroxicloroquina, sulfasalazina e  
241 agentes imunobiológicos isolados ou combinados. Estes, apresentam redução dos sintomas  
242 articulares e extra articulares e inibem a progressão radiográfica. Entretanto, não são todos  
243 os pacientes que respondem aos medicamentos antirreumáticos e uma grande parcela, não  
244 tolera o tratamento.

245 Além disso, essas abordagens farmacológicas geralmente apresentam  
246 inconveniências significativas, como necessidade de altas doses, alto custo e frequência de  
247 administração e potenciais efeitos indesejáveis como alterações renais, hepáticas e cardíacas  
248 à que estão associados a suas comorbidades. Desta forma, há a necessidade de desenvolver  
249 pesquisas pré-clínicas com foco em terapias alternativas, como agentes biológicos para o  
250 tratamento da artrite reumatoide (SIEBERT et al., 2015) com objetivo de reduzir a dor  
251 inflamatória e proporcionar uma melhora na qualidade de vida dos indivíduos afetados pela  
252 doença.

### 253 **1.2.2 Artrite Gotosa**

254 A artrite gotosa ou gota é desencadeada por um desbalanço no metabolismo  
255 do ácido úrico, levando a um quadro de hiperuricemia (níveis séricos de urato >7mg/dL  
256 (420µmol/L), com formação de cristais de urato monossódico (MSU) (DALBETH, 2016) e  
257 deposição articular e periarticular de MSU, principalmente nas articulações distais, pois as  
258 baixas temperaturas facilitam a precipitação dos cristais, causando inflamação articular e dor  
259 intensa (MARTINON, GLIMCHER, 2006; ZHU, PANDYA, CHOI, 2007-2008). A quantidade de  
260 urato no organismo depende do equilíbrio entre a ingestão alimentar, síntese e taxa de  
261 excreção (HOCHBERG et al., 2003).

262 A AG é considerada uma doença inflamatória prototípica, pois induz a ativação  
263 do sistema imunológico inato (MCGONAGLE, MCDERMOTT, 2006). Clinicamente é  
264 caracterizada por episódio agudos de inflamação articular usualmente afetando uma única  
265 articulação, intercalada com períodos assintomáticos de duração variável. Constitui uma das  
266 condições agudas mais dolorosas experimentadas pelos seres humanos. Quando tratada, a  
267 gota possui caráter autolimitante, com resolução em até 7-10 dias. Em camundongos, a  
268 resolução é ainda mais rápida, em torno de 24-36 horas, pois os cristais são rapidamente  
269 degradados pelas ureases (AMARAL, 2012). Se não tratada, progride para o acúmulo de urato

270 nos tecidos moles, com ataques recorrentes e destruição progressiva de várias articulações,  
271 cartilagens e ossos e limitações de movimentos (SCHLESINGER, THIELE, 2010). Outras  
272 complicações incluem depósitos renais de ácido úrico que contribuem com a formação de  
273 cálculos renais e indução de insuficiência renal (DALBETH, 2016).

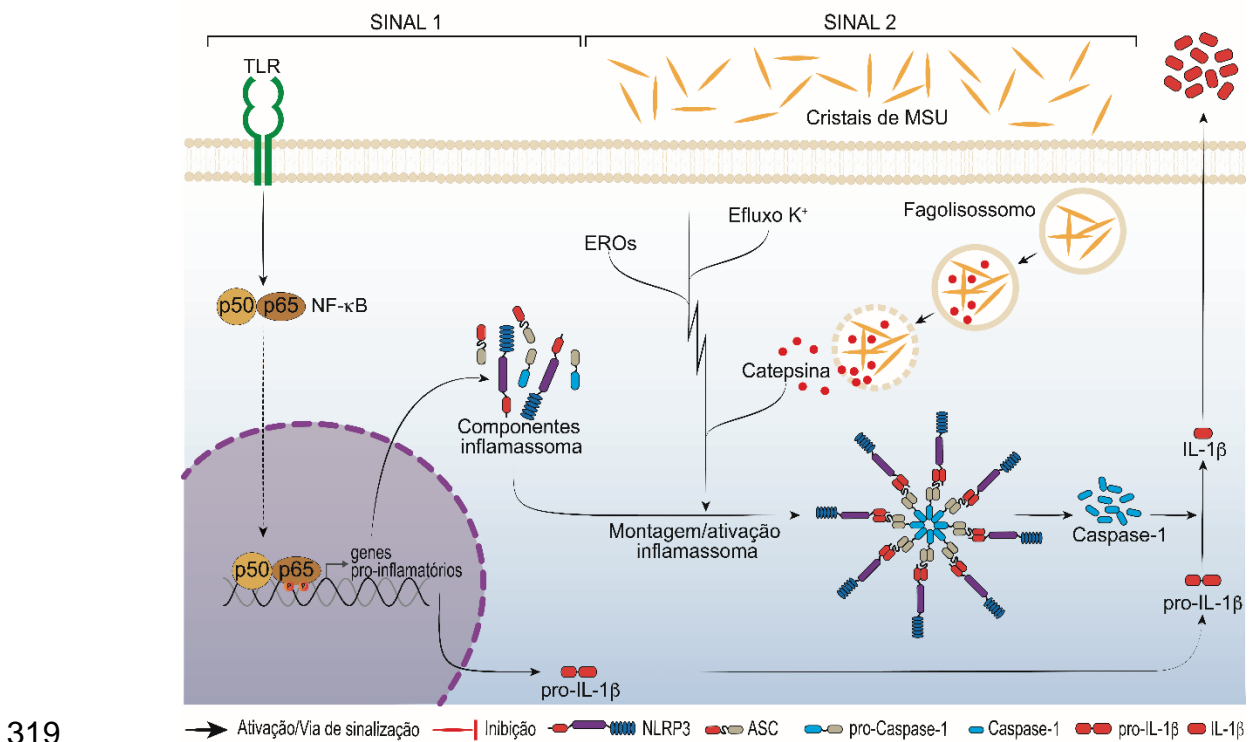
274 As tendências dietéticas (consumo excessivo de carnes e bebidas alcoólicas),  
275 estilo de vida (sedentarismo), síndrome metabólica (resistência à insulina), aumento da  
276 prevalência da obesidade (KAHN, 1988; SAAG, MIKULS, 2005; SAAG, CHOI., 2006; HAK,  
277 CHOI, 2008), hipertensão e hipertrigliceridemia (CHOI, MOUNT, REGINATO, 2005)  
278 associados ao aumento da expectativa de vida podem explicar a crescente incidência da gota  
279 principalmente nos países desenvolvidos e em desenvolvimento (ARROMDEE et al., 2001;  
280 KRAMER, CURHAN, 2002; KUO et al., 2015), tanto na população masculina onde é  
281 prevalente (principalmente após 70 anos) (KUO et al., 2015) quanto na feminina (comum após  
282 a menopausa devido a redução dos níveis de estrógeno, pois esse hormônio regula a  
283 eliminação do ácido úrico pelos rins) (HAK et al., 2010).

284 Os cristais de MSU ao serem fagocitados por macrófagos sinoviais residentes,  
285 desencadeiam uma resposta inflamatória, promovendo a montagem e ativação do  
286 inflamassoma NLRP3, um complexo citosólico multiproteico que exerce atividade na  
287 maturação da citocina pró-inflamatória IL-1 $\beta$  (MARTINON & Glimcher 2006; BROZ & DIXIT,  
288 2016). Em resumo, a fisiopatologia da AG integra dois estímulos independentes. O primeiro  
289 estímulo (priming ou sinal 1), atua na expressão de todos os constituintes necessários para  
290 formação e ativação do inflamassoma (NLRP3, ASC e pró-CASPASE-1) bem como o produto  
291 do substrato da caspase-1 ativada, pró-IL-1 $\beta$  (BURNS et al., 2003). A expressão de todos  
292 estes elementos é dependente da ativação do NF- $\kappa$ B e as suas vias de sinalização  
293 downstream.

294 A origem do sinal 1 presente na natureza ainda não foi inteiramente elucidada,  
295 contudo, essa ativação é dependente de receptores do tipo Toll (LIU-BRYAN et al., 2005;  
296 MARTINON & TSCHOPP, 2005). Dentre os prováveis candidatos pode-se apontar: as  
297 proteínas endógenas ligantes de TLR (em particular TLR2 e TLR4) (LIU-BRYAN et al., 2005),  
298 proteínas S100A8 e S100A9 (HOLZINGER et al., 2014), fator estimulante de colônias de  
299 granulócitos-macrófagos (GM-CSF) (AN et al., 2014), proteína do complemento C5a (AN et  
300 al., 2014; KHAMENEH et al., 2017) e ácidos graxos livres de cadeia longa (FFAs) (JOOSTEN  
301 et al., 2010). Até mesmo a IL-1 $\beta$  junto com esses ligantes, participa da ativação,  
302 proporcionando um loop de auto amplificação (SO, MARTINON, 2017), (Figura 2).

303 O segundo estímulo (sinal 2), catalisa a montagem do inflamassoma ativando-  
304 o. Este estímulo é mais específico que o sinal 1 e direciona diretamente a agregação e

305 polimerização pós-transcricional e translacional dos componentes do inflamassoma, ou seja,  
 306 propicia a clivagem da pró-caspase-1 em caspase-1 que ativada cliva a pró-IL-1 $\beta$  em IL-1 $\beta$   
 307 madura (MARTINON et al., 2006, SO & MARTINON, 2017). Os mecanismos pelos quais a  
 308 ativação do NLRP3 ocorre não são completamente compreendidos. Entre eles destacam-se  
 309 a ativação do NLRP3 por perturbações no equilíbrio iônico celular, em particular pelo efluxo  
 310 de potássio e influxo de cálcio (PETRILLI et al., 2007; YARON et al., 2015), com geração de  
 311 espécies reativas de oxigênio nas mitocôndrias, com aumento de MSU mediado pelo  
 312 leucotrieno B4 (AMARAL et al., 2012), contribuindo com a ativação da kinase 7 (Nek7). Nestas  
 313 condições, Nek7 se liga diretamente ao inflamassoma, ativando-o (HE et al., 2016; SCHMID-  
 314 BURGK et al., 2016; SHI et al., 2016), (Figura 2). Interessantemente, a ativação do  
 315 inflamassoma NLRP3 por cristais de MSU também é correlacionada ao rompimento do  
 316 fagolisossomo e a liberação de seu conteúdo no espaço citosólico (MARTINON et al., 2006;  
 317 DUEWELL et al., 2010). Dentre os integrantes fagolisossomais, as enzimas catepsina B e L  
 318 induzem a ativação de NLRP3.



320 **Figura 2 - Fisiopatologia da artrite gótica.** O 1º sinal, é mediado por vias de ativação do NF- $\kappa$ B,  
 321 como aquelas ativadas por um membro da família de receptores semelhantes a Toll (TLR). Essa  
 322 cascata de sinalização induz a expressão de genes pró-inflamatórios, dentre eles os componentes do  
 323 inflamassoma NALP3 e a pro-IL-1 $\beta$ . O 2º sinal, consiste no reconhecimento e fagocitose dos cristais  
 324 de MSU por macrófagos residentes sinoviais. Os cristais, após fagocitose rompem o fagolisossomo  
 325 liberando catepsina. A catepsina junto com EROs derivadas das mitocôndrias e o efluxo de potássio,  
 326 levam a montagem e ativação do inflamassoma NALP3. A junção do receptor NOD NALP com a  
 327 molécula adaptadora ASC e a pro-caspase-1, a partir dos estímulos, clivam a pro-caspase-1 em  
 328 caspase-1, que por vez, cliva a pro-IL-1 $\beta$ , liberando IL-1 $\beta$  madura.  
 329

Fonte: ZANINELLI, 2018

330

331 A IL-1 $\beta$  é a principal citocina na fisiopatologia da AG, promove vasodilatação e  
332 leva ao recrutamento de monócitos e neutrófilos (responsável pela expressão de moléculas  
333 de adesão) para locais de injúria tecidual, uma resposta de extrema importância no combate  
334 a infecções e restauração da homeostase, além de ser responsável pelas dores excruciantes  
335 da doença pois sensibilizam os nociceptores estimulando o fenótipo altamente doloroso. O  
336 recrutamento de neutrófilos é um marcador das doenças reumáticas (FATTORI et al., 2016)  
337 e de fato é o tipo celular predominante no líquido sinovial de pacientes durante os ataques  
338 inflamatórios da gota (MITROULIS et al., 2013). Entretanto, a secreção prolongada de IL-1 $\beta$   
339 pode resultar na produção de enzimas degradantes da matriz de cartilagens e ossos  
340 (SCHLESINGER, THIELE, 2010).

341 Existente no foco inflamatório, em consequência da produção de IL-1 $\beta$  e LTB<sub>4</sub>  
342 (AMARAL et al., 2012), o reconhecimento dos cristais de MSU por neutrófilos predispõe a  
343 degranulação (POPA-NITA et al., 2007) e a formação de armadilhas extracelulares de  
344 neutrófilos, processo titulado NETose (MITROULIS et al., 2011). A formação de NETs  
345 depende da produção de EROs e de moléculas que regulam a necroptose pela via RIPK3  
346 (DESAI et al., 2016). Uma vez formados, agregados celulares contendo NETs podem  
347 degradar rapidamente uma ampla gama de citocinas pró-inflamatórias e, em modelos  
348 experimentais, a inibição de NETs resulta na persistência de uma grave inflamação gotosa.  
349 No entanto, quando a formação de NETs não é prejudicada, a inflamação articular é resolvida  
350 espontaneamente após 3 dias (SCHAUER et al., 2014).

351 Estes dados demonstram que os neutrófilos apresentam um papel duplo na  
352 inflamação gotosa: na fase inicial, o recrutamento de neutrófilos atua na amplificação da  
353 resposta inflamatória e depois limitam a progressão da doença e iniciam o processo resolutivo  
354 da AG (SO, MARTINON, 2017). Além do mais, a expressão da proteína Anexina-1 (AnxA1),  
355 uma potente inibidora da fosfolipase A<sub>2</sub>, também é expressa em neutrófilos, macrófagos e  
356 outros tipos de células e exerce suas funções por meio da ligação e da ativação do receptor  
357 de formilpeptídeo 2/receptor de lipoxina A<sub>4</sub> (FPR2 / ALXR) (PERRETTI & FLOWER, 2004). O  
358 AnxA1 modula vários eventos biológicos importantes durante a resolução da inflamação:  
359 reduz o recrutamento e a transmigração de granulócitos, induz a apoptose de neutrófilos e  
360 eferocitose, aumenta o recrutamento de monócitos não flogísticos (SUGIMOTO, 2016;  
361 PERRETTI & D'ACQUISTO, 2009) e atua na promoção da resolução em modelo de gota em  
362 camundongos (GALVAO et al., 2017).

363 Nos dias atuais, os medicamentos empregados na AG, são os que tratam o  
364 ataque agudo e os que controlam a hiperuricemia, reduzindo a concentração corporal de ácido

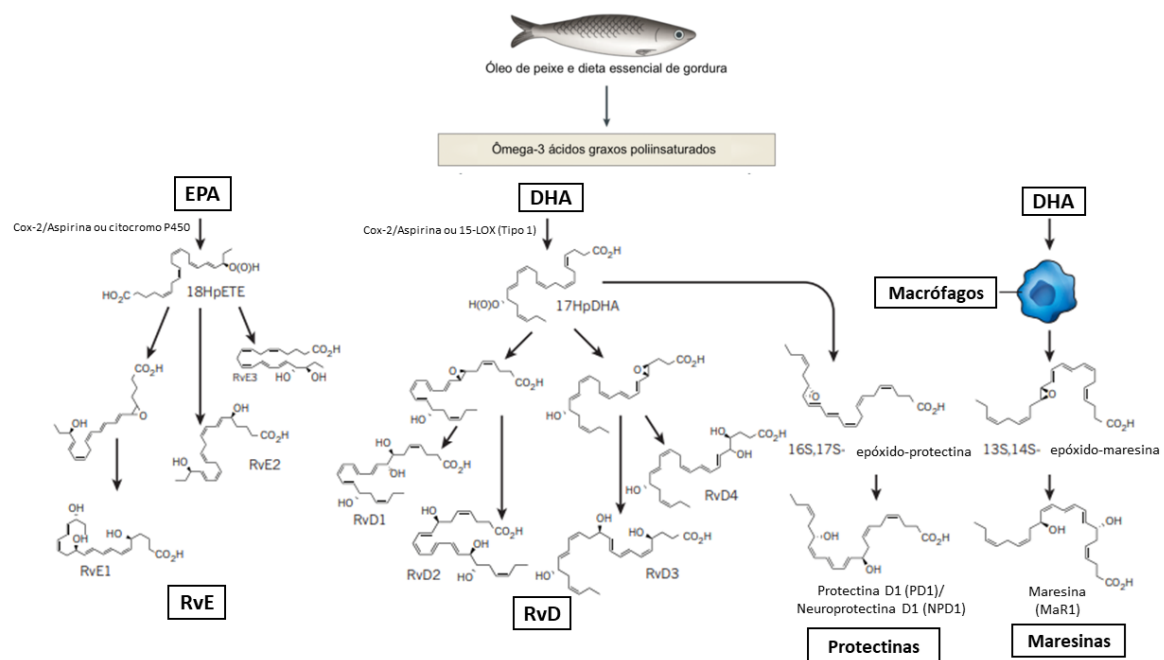
365 úrico (PEREZ et al., 2009). O alopurinol, por exemplo, atua inibindo a atividade da enzima  
366 xantina oxidase hepática (XOD), ou seja, reduzindo os níveis séricos de ácido úrico. No  
367 entanto, o alopurinol não é capaz de controlar ataques agudos de gota (DUBCHAK, FALASCA  
368 2010), e pode induzir vários efeitos colaterais, como febre, erupções cutâneas, reações  
369 alérgicas, hepatite e nefropatia (UMAMAHESWARI et al., 2014). Deste modo, fármacos anti-  
370 inflamatórios não esteroidais (AINEs) (por exemplo, indometacina), corticoides e fármacos  
371 alcalóides (por exemplo, colchicina) são regularmente manuseados como abordagens de  
372 tratamento de primeira linha para a inflamação aguda da artrite gotosa (CRONSTEIN,  
373 TERKELTAUB, 2006; PASCHKE et al., 2013). No entanto, essas classes de medicamentos  
374 induzem efeitos adversos graves, como gastrite, desequilíbrio hormonal, diarreia,  
375 sangramento, disfunção renal e problemas cardiovasculares (FARKOUH, GREENBERG,  
376 2009; NEOGI, 2011). Terapias imunobiológicas, antagonista do receptor de IL-1 $\beta$ , conhecido  
377 como Anakinra, também são úteis no tratamento de ataques de artrite gotosa, mas o alto custo  
378 restringe seu uso clínico (DUBCHAK, FALASCA, 2010; NEOGI, 2011). Por conseguinte, tem  
379 crescido o interesse na pesquisa de novos medicamentos, compostos e ou moléculas para  
380 tratar a dor e inflamação na AG (NEOGI, 2011; SABINA et al., 2011; DE SOUZA et al. 2012;  
381 RUKDEE et al., 2015; ZHAO, HUANG 2015; XU et al., 2016).

### 382 **1.3 MEDIADORES LIPÍDICOS PRÓ-RESOLUÇÃO**

383 Mediadores pró-resolução apresentam um papel endógeno crucial e de  
384 regulação ativa no processo inflamatório. São uma família de lipídios que incluem as  
385 resolvinas, protectinas, maresinas e lipoxinas. As lipoxinas são formadas a partir de ácido  
386 araquidônico (AA, 20: 4 n-6) (SERHAN et al., 2011; MAS et al., 2012) e os demais lipídeos  
387 derivados da transformação dos ácidos graxos poli-insaturados essenciais (PUFAs) de cadeia  
388 longa do ômega-3 (SOMMER & BIRKLEIN, 2010), (Figura 3). Os dois principais ácidos graxos  
389 essenciais do  $\omega$ -3 presentes no óleo de peixe são: o ácido eicosapentaenoico (EPA, C20: 5)  
390 e ácido docosaenoico (DHA, C22: 6). Embora tenham sido primeiramente identificados na  
391 resolução do processo inflamatório, esses mediadores desempenham ações indispensáveis  
392 na defesa do hospedeiro, manutenção da dor e remodelamento tecidual (SERHAN, 2014).

393 Dentre as funções compartilhadas dos mediadores, sobressaem ativação de  
394 macrófagos não-flogísticos. Essas células de defesa realizam a redução de expressão de  
395 citocinas pró-inflamatórias, a eferocitose dos corpos apoptóticos de neutrófilos e remoção dos  
396 debris inflamatórios e infecciosos, promovendo a resolução inflamatória (SERHAN et al.,  
397 2000; 2002; 2014). Em adição às características analgésicas, anti-inflamatórias, resolutivas e  
398 imunomoduladoras, os MLPR (exemplos: resolvinas e protectinas) não possuem atividade

399 imunossupressora, o que posiciona essas moléculas como fortes candidatas a testes clínicos  
 400 em contraposição aos tratamentos atuais que aumentam a susceptibilidade às infecções.  
 401 Apesar dos MLPR apresentarem tempo de meia-vida extremamente curto, na faixa de  
 402 segundos em meio aquoso (AURSNEs et al., 2015), eles apresentam um efeito biológico  
 403 duradouro, na faixa de dias (SERHAN et al., 2012). Estes dados encorajam e dão suporte  
 404 para o uso dos MLPR e de seus isolados em testes clínicos. De fato, a Resolvin E1, derivada  
 405 do EPA, atingiu a clínica como RX-3 10045® para testes no tratamento da síndrome dos olhos  
 406 ressecados. Os pacientes apresentaram melhora significativa na condição de maneira dose-  
 407 dependente (Clinicaltrials.gov identificação NCT00799552) (LEE, 2012; NORLING &  
 408 PERRETTI, 2013).



409

410 **Figura 3 - Metabolismo dos ácidos graxos essenciais do ω-3.** MLPR derivados da transformação  
 411 dos PUFAs de cadeia longa do ω-3 presentes no óleo de peixe : EPA e DHA.

412 **Fonte: Adaptado de AURSNEs et al., 2015., 2014; BARDEN et al., 2016.**

413

414 As resolvinas são uma família de mediadores lipídicos derivados do EPA,  
 415 classificada em série E (RvE) e do DHA, em série D (RvD) (SERHAN et al., 2000; 2002; HONG  
 416 et al., 2003). O DHA é o precursor de dois grupos de resolvinas, referidas como as séries 17S  
 417 e 17R, que são produzidas por distintas rotas biossintéticas durante a fase de resolução  
 418 inflamatória (SERHAN et al., 2002; HONG et al., 2003). O DHA endógeno é convertido in vivo  
 419 por lipoxigenases (LOX) para o 17S-hidroxi contendo uma série de quatro resolvinas,  
 420 conhecida como resolvin D1-D4 (SERHAN et al., 2002; HONG et al., 2003). Especificamente,  
 421 a biossíntese da RvD1 envolve oxigenações sequenciais por 15-lipoxigenase (15-LOX) e 5-  
 422 lipoxigenase (5-LOX). No entanto, no caso do tratamento com aspirina, ocorre a acetilação da

423 ciclo-oxigenase-2 (COX-2) resultando na produção de 17R-hidroxi-DHA, que na oxigenação  
424 subsequente por 5-LOX gera a Resolvina D1 induzida por aspirina (AT-RvD1), também  
425 conhecida como 17-epi-RvD1 ou 17(R)-resolvina D1 (17-R-RvD1) (SERHAN et al., 2002;  
426 SERHAN & CLISH, 2003; SERHAN, 2004). A 17(R)-RvD1, também pode ser produzida  
427 endogenamente na ausência de aspirina por vias alternativas envolvendo as enzimas do  
428 citocromo P450 (SERHAN, 2014).

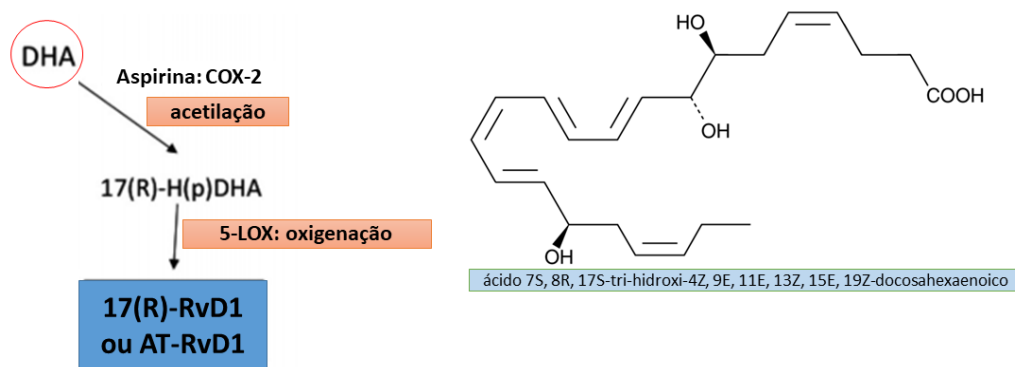
429 Os SPMs da série das RVDs são capazes de modular a produção de IL-1 $\beta$  em  
430 macrófagos, inibindo o priming e reprimido a ativação do inflamassoma NLRP3, limitando a  
431 inflamação e acelerando a resolução. Este achado é importante porque a IL-1 $\beta$  inicia a  
432 cascata inflamatória ativando, entre outros processos a desgranulação de neutrófilos,  
433 expressão de moléculas de adesão, liberação de outras citocinas e quimiocinas, incluindo IL-  
434 6, TNF- $\alpha$  e MCP-1, uma resposta conhecida como “tempestade de citocinas” (LOPATEGI et  
435 al., 2019). Demonstrou-se que as RvDs exibem ações anti-inflamatórias em modelo animal  
436 de isquemia/reperfusão renal (DUFFIELD et al., 2006), em doenças inflamatórias como colite,  
437 periodontite e asma através da capacidade de reduzir o recrutamento de neutrófilos e  
438 eosinófilos, e estimulam monócitos e macrófagos a realizar fagocitose de microrganismos e  
439 células apoptóticas sem liberar mediadores pró-inflamatórios (SERHAN et al., 2008).

440 O mecanismo de ação dessas moléculas isoladas dos mediadores lipídicos  
441 está relacionado com a inibição do NF- $\kappa$ B e conseqüentemente inibição de componentes pró-  
442 inflamatórios derivados desse fator de transcrição, como citocinas (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 e  
443 interleucina 8 [IL-8]) e quimiocinas (CXCL1, CXCL3), o que culmina na inibição do  
444 recrutamento de neutrófilos e ativação de células da glia como astrócitos e micróglia  
445 (BUCKLEY; GILROY; SERHAN, 2014; SERHAN et al., 2015). Assim, acompanhado da  
446 inibição da resposta pró-inflamatória, os mediadores lipídios pró-resolução aumentam a  
447 resposta anti-inflamatória e regeneração tecidual. Esse mecanismo é decorrente do aumento  
448 da expressão da enzima heme-oxigenase 1, aumento da produção de IL-10, IL-1ra  
449 (antagonista de receptor da IL-1), e adiponectina, além do aumento da eferocitose e  
450 capacidade de eliminar bactérias por macrófagos (BUCKLEY et al., 2014; SERHAN et al.,  
451 2015).

### 452 **1.3.1 17(R)-Resolvina D1**

453 A 17(R)-Resolvina D1 [17(R)-RvD1] é produzida localmente em resposta a  
454 estímulos inflamatórios (Figura 4). Possui potente ação anti-inflamatória, diminui infiltração  
455 leucocitária total, promove a resolução inflamatória (SERHAN et al., 2002, HONG et al., 2003),  
456 é antinociceptiva (ABDELMOATY et al., 2013), suprime a atividade mediada por TRPV3 em

457 queratinócitos (BANG et al., 2012), resiste à rápida inativação por eicosanoides oxirredutores  
 458 e é mais resistente à desidrogenação e, portanto, um análogo mais estável da resolvina D1  
 459 (SERHAN et al., 2011). Seus efeitos biológicos foram atribuídos ao receptor de proteína G  
 460 acoplados aos receptores GPR32 e ao peptídeo formil 2 (FPR2 / ALX), utilizando Gi e  
 461 possivelmente Gq como transdutores de sinal (CHIANG et al., 2006; BACK et al., 2014).  
 462 Ambos os receptores são expressos em células polimorfonucleares e endoteliais (SERHAN  
 463 et al., 2002; HONG et al., 2003), mas o GPR32 ainda não foi identificado em roedores  
 464 (ABDELMOATY et al., 2013).



465

466 **Figura 4 - Biossíntese e estrutura química da 17(R)-Resolvina D1.** Ela é originada do DHA, depende  
 467 do tratamento com a aspirina, ou seja, a COX-2 acetilada por aspirina origina a 17-R-hidroxi-DHA, que  
 468 na oxigenação subsequente por 5-LOX gera a 17(R)-RvD1.

469 **Fonte- Adaptado de SERHAN et al., 2002; SERHAN & CLISH, 2003; SERHAN, 2004**

470

471 Suas características anti-inflamatórias e pró-resolutivas foram explanadas em  
 472 vários modelos experimentais de doenças inflamatórias, incluindo peritonite (NORLING et al.,  
 473 2011; CHIANG et al., 2012), obesidade (TITOS et al., 2011), lesão pulmonar aguda (WANG  
 474 et al., 2011a), diabetes (HELLMANN et al., 2011), lesão de nervo periférico (HUANG et al.,  
 475 2011), sepse (CHIANG et al., 2012), dor inflamatória (BANG et al., 2012), artrite induzida por  
 476 CFA (LIMA-GARCIA et al., 2011; XU & JI 2011), asma (ROGERIO et al., 2012), fibrose  
 477 idiopática pulmonar (MASAKIYO et al., 2015) e em modelo de endometriose em ratos  
 478 (DMITRIEVA, SWESS, SHIRLEY., 2014).

479 Abdelmoatty e colaboradores (2013) mostraram que o pré-tratamento com  
 480 injeção intra-tecal de 17(R)-RvD1 reduz a hipersensibilidade mecânica e edema de pata,  
 481 atenua significativamente a liberação de TNF- $\alpha$  induzida por carragenina, além de diminuir  
 482 tanto a sua liberação induzida por IFN- $\gamma$  quanto por LPS em culturas de astrócitos primários  
 483 espinais de ratos (ABDELMOATY et al., 2013). Lima-Garcia e colaboradores (2011)  
 484 demonstraram que a administração sistêmica de 17(R)-RvD1 causou efeitos anti-  
 485 hiperálgicos (mecânica) pronunciados e de longa duração quando avaliados num modelo  
 486 de dor inflamatória e artrite induzida por Complexo Adjuvant de Freud (CFA) em ratos (LIMA-

487 GARCIA et al., 2011). Os mesmos autores mostraram também que os mecanismos  
488 subjacentes às ações anti-hiperalgésicas foram principalmente associados à inibição de  
489 mediadores pró-inflamatórios e pró-nociceptivos, como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , e através do bloqueio  
490 da expressão de COX-2 e ativação de NF- $\kappa$ B.

491 De acordo com Bento e colaboradores (2011), o tratamento sistêmico com o  
492 epímero 17(R)-RvD1, bloqueou significativamente a atividade enzimática de mieloperoxidase  
493 (MPO) no modelo experimental de colite induzida por DSS (sulfato dextrano de sódio) e TNBS  
494 (ácido 2,4,6-trinitrobenzenossulfônico), reduzindo danos no tecido do cólon e sugerindo um  
495 comprometimento da infiltração de PMN da mucosa epitelial intestinal no modelo experimental  
496 de colite (BENTO et al., 2011). Algumas evidências indicam que citocinas e quimiocinas  
497 podem regular positivamente a expressão de moléculas de adesão (ESSANI, et al., 1995;  
498 STOCKER, et al., 2000), que são críticas para a adesão e transmigração de leucócitos  
499 sanguíneos para o tecido inflamado (DANESE, et al., 2005). Neste artigo, demonstrou-se que  
500 a 17(R)-RvD1 diminuiu os níveis das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , das quimiocinas MIP-2 e  
501 CXCL1/KC, a expressão do mRNA para as moléculas de adesão VCAM-1 (vascular), ICAM-  
502 1 (intercelular) e LFA-1 e inibiu a fosforilação do NF- $\kappa$ B no cólon de camundongos com colite  
503 induzida por DNN.

504 A administração de 17(R)-RvD1 desde o início do tratamento de fibrose  
505 pulmonar induzida por bleomicina em camundongos, atenuou a infiltração alveolar  
506 neutrofílica, teor de colágeno pulmonar, IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$ 1, fator de crescimento de tecido  
507 conjuntivo (CTGF), e expressão mRNA de colágeno tipo I, juntamente com posterior redução  
508 na fibrose histologicamente detectável (YATOMI et al., 2015). Dmitrieva e colaboradores  
509 (2014), mostraram que a 17(R)-RvD1 em modelo de endometriose em ratos, diminuiu  
510 significativamente a permeabilidade vascular no tecido endometrial ectópico e a gravidade da  
511 hiperalgesia vaginal (DMITRIEVA et al., 2014)

512 As terapias vigentes aplicadas na artrite induzida por zimosan e na gota até  
513 então são restritas a medicamentos que apresentam diversos efeitos colaterais, eficácia  
514 limitada, despesa elevada e toxicidade na maioria dos casos. Deste modo, é imprescindível a  
515 realização de estudos e pesquisas visando o desenvolvimento de novos fármacos e  
516 tratamentos capazes de amenizar a inflamação e dor articular com menor ocorrência de  
517 efeitos indesejáveis. Assim, torna-se possível conter as doenças possibilitando a melhoria no  
518 bem-estar dos pacientes.

519 Até o momento, há trabalhos demonstrando que os mediadores lipídicos  
520 apresentam promissor potencial terapêutico, no entanto, não existem estudos elucidando os  
521 possíveis efeitos e mecanismos de ação da 17(R)-Resolvina D1 no modelo de artrite induzida

522 por zimosan e na gotosa induzida por MSU. Tendo em vista essas informações, este trabalho  
523 avaliou o efeito e mecanismo de ação analgésico e anti-inflamatório do mediador lipídico pró-  
524 resolução 17(R)-Resolvina D1 no modelo de gota induzida por cristais de urato monossódico  
525 (MSU) e no modelo de artrite induzido por zimosan em camundongos.

526

## 527 2 OBJETIVOS

### 528 2.1 OBJETIVOS GERAIS

529 Avaliar os efeitos analgésico e anti-inflamatório e mecanismos de ação da  
530 17(R)-resolvina D1 em modelo de artrite induzida por zimosan e na artrite gotosa induzida por  
531 cristais de urato monossódico (MSU) em camundongos.

### 532 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

533 Avaliar o efeito do tratamento com a 17(R)-RvD1 no modelo de artrite induzida  
534 por zimosan, sobre os parâmetros:

- 535 • Hiperalgisia mecânica e térmica;
- 536 • Distribuição de peso entre as patas dos animais;
- 537 • Recrutamento leucocitário e sinovite na cavidade articular;
- 538 • Edema sinovial;
- 539 • Produção de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-10).

540 Avaliar o efeito do tratamento com a 17(R)-RvD1 no modelo de gota, sobre os  
541 parâmetros:

- 542 • Hiperalgisia mecânica e térmica;
- 543 • Recrutamento leucocitário e sinovite na cavidade articular;
- 544 • Edema sinovial;
- 545 • Produção de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6);
- 546 • Parâmetros de estresse oxidativo (GSH e TBARS);
- 547 • Ativação do fator de transcrição nuclear NF-kB;
- 548 • Toxicidade renal (Ureia e Creatinina), hepática (AST e ALT) e gástrica  
549 (atividade de MPO).

550

551

## 552 **3 MATERIAS E MÉTODOS**

### 553 **3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS**

554 Foram utilizados camundongos Swiss machos (20-25 g), provenientes do  
555 Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina (UEL), os quais foram mantidos no  
556 Biotério do Departamento de Ciências Patológicas da UEL pelo menos dois dias antes dos  
557 experimentos. No biotério, os animais permaneceram sob ciclo claro/escuro (12/12h) em  
558 ambiente climatizado com temperatura controlada (22–25 °C), com exaustão de ar e livre  
559 acesso à água e ração. Os animais foram divididos em gaiolas de polipropileno padrão  
560 medindo 41 X 34 X 16 CM (Insight®) de acordo com os grupos experimentais (n=6). Foram  
561 adaptados ao ambiente e condições experimentais por pelo menos 60 minutos e foram  
562 utilizados apenas uma vez. Os camundongos foram anestesiados com isoflurano à 5% (Abbot,  
563 Abbott Park, IL, EUA) por inalação e eutanizados por deslocamento de cervical seguida de  
564 decapitação. Este projeto foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais  
565 desta Universidade, pelo Ofício Circular n°103/2013, processo de número 1415.2018.99 e de  
566 acordo com as diretrizes da Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP). Todos os  
567 esforços foram feitos para minimizar o número de animais utilizados e o sofrimento.

### 568 **3.2 MODELO EXPERIMENTAL DE ARTRITE INDUZIDA POR ZIMOSAN**

569 A artrite inflamatória foi induzida em camundongos Swiss machos pela injeção  
570 i.a. (articulação fêmur-tibial direita) de 100 µg de zimosan em 10 µL de salina (controle  
571 positivo). Para cada teste, um grupo recebeu 10 µL de solução contendo apenas salina, como  
572 controle negativo. Para a administração de salina e zimosan, os animais foram anestesiados  
573 com isoflurano.

### 574 **3.3 MODELO EXPERIMENTAL DE DOR E INFLAMAÇÃO INDUZIDO POR CRISTAIS DE URATO** 575 **MONOSSÓDICO (MSU)**

576 A artrite gotosa foi induzida em camundongos Swiss machos pela injeção intra-  
577 articular (articulação fêmur-tibial direita) de 100 µg dos cristais de urato monossódico (MSU)  
578 em 10 µL de salina (controle positivo), conforme padronizado pelo nosso laboratório (RUIZ-  
579 MIYAZAWA, et al., 2018). Para cada teste, um grupo recebeu 10 µL de solução contendo  
580 apenas salina, como controle negativo. Para a administração de salina e MSU os animais  
581 foram anestesiados com isoflurano.

### 582 3.4 TRATAMENTO DOS ANIMAIS

583 Trinta minutos antes da injeção intra-articular de Zim ou MSU, os animais  
584 receberam um pré-tratamento, via intra-peritoneal (i.p.) com o mediador lipídico pró-resolução  
585 17(R)-Resolvina D1 nas doses de 0,03; 0,3 ou 3 ng/an (diluído em salina) ou veículo (salina).

### 586 3.5 AVALIAÇÃO DA HIPERALGESIA MECÂNICA PELO TESTE DE PRESSÃO CRESCENTE

587 O limiar nociceptivo dos animais foi avaliado pela versão eletrônica do método  
588 de von Frey, primeiramente descrito por von Frey (FREY, 1896) e modificado por CUNHA et  
589 al. (2004), com auxílio de um anestesiómetro eletrônico (Modelo 1601C, Life Science  
590 Instruments). Em uma sala silenciosa, com temperatura controlada, os camundongos serão  
591 acomodados em caixas de acrílico com piso de grade metálica, 30 min antes do início do  
592 teste. Este teste consiste na aplicação de pressão pontual crescente na pata posterior do  
593 animal com uma ponteira de polipropileno (diâmetro de 0.5 mm<sup>2</sup>) associada a um  
594 analgesímetro eletrônico (Insight®). A pressão necessária para evocar o movimento de  
595 retirada da pata pelo animal é registrada automaticamente em gramas (g). Essa reação é  
596 considerada nociceptiva, pois é modulada por analgésicos utilizados clinicamente em  
597 humanos (Verri et al., 2008). Os resultados obtidos foram calculados através da diferença  
598 entre a média de 2 medições após o estímulo com zimosan (100 µg/10 µL/an) nos intervalos  
599 de 1, 3, 5 e 7 h e com MSU (100 µg/10 µL/na), nos intervalos de 1, 3, 5, 7 e 15 h e a média  
600 de 2 medições antes do estímulo (valor basal). Após ser determinado o melhor tempo de pré-  
601 tratamento pela curva tempo-resposta, o tratamento com 17(R)-RvD1 foi realizado meia hora  
602 antes da injeção i.a de zimosan e MSU.

### 603 3.6 AVALIAÇÃO DAS MUDANÇAS NA DISTRIBUIÇÃO DO PESO DAS PATAS (SWB)

604 A inflamação periférica unilateral produz mudanças na distribuição do peso da  
605 pata em direção à pata não lesada [LABOUREYRAS et al., 2009]. Mudanças na distribuição  
606 do peso das patas foram avaliadas usando o aparelho SWB (modelo BIO-SWB-TOUCH-M,  
607 Bioseb, França). Em uma sala silenciosa e com temperatura controlada, os camundongos  
608 foram colocados em uma caixa de acrílico, onde são mantidos confortavelmente enquanto  
609 suas patas traseiras descansam em duas placas de sensores separadas. Os animais foram  
610 ambientados por pelo menos quatro dias consecutivos antes do teste comportamental. O  
611 animal estimulado ao se levantar, faz um ajuste natural ao grau de dor, adaptando a  
612 distribuição do peso na pata traseira não lesada, e o valor do peso aplicado em cada sensor  
613 é mostrado na tela LCD da unidade de controle. Os camundongos foram testados antes

614 (valores basais) e após o tratamento com 17(R)-RvD1 e estímulo com zimosan (100 µg/10  
615 µL/animal, i.a.). Os resultados são expressos pela razão da pata direita/esquerda, que foi  
616 calculada usando a média de duas medições em 0 (valor basal), 1, 3, 5 e 7 h após a injeção  
617 de Zim.

### 618 **3.7 AVALIAÇÃO DA HIPERALGESIA TÉRMICA**

619 Os camundongos foram colocados no aparelho de placa quente (EFF 361;  
620 Insight, Ribeirao Preto, SP, Brazil) mantida a 52°C (MAOLI et al., 2015). O primeiro reflexo  
621 ipsilateral de retirada da pata (comportamento nociceptivo) foi registrado anteriormente a  
622 injeção i.a. Após o pré-tratamento com 17(R)-RvD1, 30 min antes do estímulo com o zimosan  
623 (1, 3, 5 e 7 h) e MSU (1, 3, 5, 7 e 15 h), novas medidas foram realizadas após os estímulos.  
624 A latência máxima (cut-off) foi estabelecida em 20 segundos para evitar danos nos tecidos  
625 (LAVICH et al., 2005).

### 626 **3.8 AVALIAÇÃO DO EDEMA ARTICULAR**

627 As alterações no volume da articulação fêmur-tibial direita foram determinadas  
628 utilizando um paquímetro (medidor de espessura). A medida do volume da articulação do  
629 joelho dos animais foi avaliada antes do estímulo (tempo 0) inflamatório com zimosan (100  
630 µg/10 µL sal/an, i.a.) nos intervalos de 1, 3, 5 e 7h após o estímulo e com oMSU (100 µg/10  
631 µL sal/an, i.a.) em medidas únicas 1, 3, 5, 7 e 15h após o estímulo. Os resultados foram  
632 calculados através da diferença entre as medições após o estímulo e a medição antes do  
633 estímulo (basal) (CONTE et al., 2008).

### 634 **3.9 DETERMINAÇÃO DO RECRUTAMENTO E PERFIL LEUCOCITÁRIO NA CAVIDADE ARTICULAR** 635 **POR MICROSCOPIA**

636 As células presentes na articulação dos animais foram coletadas na 7<sup>o</sup> hora  
637 após estímulo com zimosan e na 15<sup>o</sup> h após o estímulo com MSU. Para avaliar a contagem  
638 de células total e diferencial, as cavidades articulares foram lavadas 3 vezes com 3,3 µL de  
639 solução salina com EDTA 1 mM. A contagem total de células foi realizada em câmara de  
640 Neubauer em solução de Turk (usada para lisar eritrócitos) e o diferencial (100 células por  
641 lâmina) em preparações de citocentrífuga, coradas pelo método panótipo rápido (Laborclin,  
642 Pinhais, PR, Brasil) com um microscópio óptico (Olympus CX31RTSF, Tóqui, Japão). Os  
643 resultados foram expressos como leucócitos totais, células polimorfonucleares e  
644 mononucleares (células x 104 / articulação fêmur-tibial).

### 645 **3.10 ANÁLISES HISTOLÓGICAS DAS ARTICULAÇÕES**

646 As amostras das articulações fêmur-tibiais obtidas de camundongos pré-  
647 tratados com 17(R)-RvD1 e estimulados intra-articularmente com zimosan e coletados 7h  
648 após o estímulo ou MSU e coletados 15 h após o estímulo, foram fixadas em formaldeído  
649 tamponado à 10%. Após descalcificação em solução à 4% de ácido etilenodiamino tetra-  
650 acético e ácido clorídrico por 4 semanas. As amostras foram processadas, coradas com  
651 hematoxilina – eosina (H & E) para análise posterior em microscópio óptico (Olympus OX31,  
652 Olympus, Japão; amplificação original, 40), conectadas a uma câmera digital (Lumenera  
653 Infinity1, Ottawa, Canada). Usando a ferramenta do software ImageJ 1.44 (domínio público:  
654 <http://rsb.info.nih.gov/ij/>), imagens histológicas RGB foram analisadas usando % células por  
655 área.

### 656 **3.11 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO PERIFÉRICA (LOCAL) DE CITOCINAS**

657 Após estímulo com zimosan e MSU, ambos nas concentrações 100 µg/10 µL  
658 sal/an, i.a, as amostras de tecido articular foram coletadas para a dosagem das citocinas,  
659 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10. As amostras foram trituradas e homogeneizadas em salina. Após a  
660 homogeneização, as amostras foram centrifugadas (3000 RPM, 4°C, 10') e o sobrenadante  
661 foi utilizado para avaliar os níveis das citocinas por kit comercial de ELISA (enzyme-linked  
662 immunosorbent assay). Placas de 96 poços foram incubadas overnight à 4°C com anticorpos  
663 contra as proteínas de interesse (10 µg/mL). No dia seguinte, as placas foram lavadas e  
664 incubadas por 2 horas com solução de bloqueio no intuito de evitar ligações inespecíficas.  
665 Após esse bloqueio e lavagem das placas, as curvas-padrão em várias diluições e as  
666 amostras foram adicionadas e incubadas à 4°C por 24 horas. As placas foram lavadas tampão  
667 e os anticorpos policlonais biotinilados adicionados (100 µL/poço). Após a incubação em  
668 temperatura ambiente por 1 hora, as placas foram lavadas e 50 µL de avidina-HRP  
669 adicionada. Em seguida (trinta minutos após), 50 µL do reagente colorido OPD (solução 0,4  
670 mg OPD – 0,4 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – 1 mL tampão) foi adicionado e as placas foram mantidas no escuro,  
671 em temperatura ambiente, por 15-20 min. A reação enzimática foi interrompida com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
672 (1 M, 50 µL poço<sup>-1</sup>) e as absorbâncias foram determinadas em 450 nM. Os resultados foram  
673 obtidos comparando a densidade óptica com as densidades das curvas padrões (TAKTAK &  
674 LEE, 1991). Os resultados foram expressos em picograma (pg) de citocina por miligrama (mg)  
675 de tecido.

### 676 **3.12 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO PELOS NÍVEIS DE GLUTATIONA REDUZIDA (GSH)**

677 Foram determinados os níveis de glutaciona reduzida (GSH) na articulação  
678 fêmur-tibial dos camundongos. O GSH faz parte do sistema antioxidante endógeno e seus  
679 níveis são um parâmetro de estresse oxidativo (CASAGRANDE et al., 2006). As articulações  
680 fêmur-tibiais foram coletadas após 15 horas do estímulo com MSU (100 µg / 10 µL salina /  
681 animal, i.a.) e os níveis de GSH foram determinados como descrito previamente  
682 (CASAGRANDE et al., 2006). Os homogenatos foram misturados com 25 µL de ácido  
683 tricloroacético à 50%, agitados 3 vezes durante 15 minutos e centrifugados (15 min, 1500g, 4  
684 ° C) e o sobrenadante resultante foi adicionado à 200 µL de tampão Tris (0,2 M; pH 8,2) e 10  
685 µL (0,01 M DTNB). Após 5 min de incubação à temperatura ambiente, a absorbância foi  
686 medida à 412 nm (RUIZ-MIYAZAWA et al., 2015). Foi utilizada uma curva padrão de GSH, e  
687 os resultados são expressos como GSH (nmol por mg de proteína).

### 688 **3.13 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO ATRAVÉS DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (TBARS)**

689 Os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS),  
690 principalmente malondialdeído (MDA), foram quantificados espectrofotometricamente  
691 conforme descrito anteriormente (FATTORI et al., 2017). Amostras de articulação fêmur-tibial  
692 direita foram coletadas após 15 horas do estímulo com MSU. Utilizou-se o ácido tricloroacético  
693 10% para precipitação das proteínas do homogenato, seguido de centrifugação (1000xg, 3',  
694 4°C). O sobrenadante livre das proteínas foi separado e o ácido tiobarbitúrico 0,67% foi  
695 adicionado. A mistura foi mantida em banho-maria a 100 °C por 15'. O (MDA), produto  
696 secundário da peroxidação lipídica foi determinado pela diferença entre as absorbâncias a  
697 535 e 572 nm utilizando espectrofotômetro de microplacas. Os resultados foram  
698 demonstrados como substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) nmol de MDA por  
699 miligrama de proteína (GUEDES et al., 2006).

### 700 **3.14 ENSAIO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA POR MICROSCOPIA CONFOCAL**

701 Lavados articulares dos animais foram coletados 15 h após a injeção de MSU  
702 (100 µg, i.a.) na articulação fêmur-tibial usando PBS 1X / 2 mM EDTA/ 0.5% BSA (50 µL). As  
703 células foram centrifugadas (5 min, 4 ° C, 300 g) e incubadas com tampão de bloqueio (PBS, 2  
704 % BSA, 0,1 % Triton) durante 1 h em gelo. Após a centrifugação, as células foram incubadas  
705 com os anticorpos primários anti-rat CD11b (1:200, Bio-Rad, #MCA711G) e anti-mouse  
706 phospho-NFκB (1:200, #sc-136, 548; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) por mais 1  
707 h em gelo. Após duas lavagens em PBS, as células foram ressuspensas em PBS e incubadas

708 com anticorpos secundários: Alexa Fluor 488 goat anti-rat (1:500, #A-11001; Thermo Fisher  
709 Scientific, Waltham, MA, USA) e Alexa Fluor 647 goat anti-rat (1:500, #A-21247; Thermo  
710 Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Hoechst 33342, trhydrochloride trihydrate (Thermo  
711 Fisher Scientific, 1:1000) foi usado para a coloração nuclear. As imagens representativas  
712 escolhidas e as análises quantitativas foram realizadas usando microscópio Confocal (SP8,  
713 Leica, Microsystems, Mannheim, Germany). A intensidade de fluorescência foi quantificada  
714 em campos selecionados aleatoriamente de diferentes grupos por um avaliador cego. Os  
715 resultados são apresentados como intensidade de fluorescência (pixels em tons de cinza)  
716 para a proteína alvo e como uma razão da intensidade de fluorescência por número de células  
717 de cada campo.

### 718 **3.15 MARCADORES DE LESÃO RENAL (UREIA / CREATININA)**

719 Amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca e adicionadas em  
720 microtubos 15 h após o estímulo com MSU, foram centrifugadas (200 xg, 10 min, 4 ° C). O  
721 soro resultante foi separado e, para avaliar os níveis de ureia e creatinina como indicadores  
722 de nefrotoxicidade, as amostras de soro foram processadas de acordo com as instruções do  
723 fabricante (Labtest Diagnóstico SA, Brasil), sendo apresentados como U/L de ureia e  
724 creatinina.

### 725 **3.16 MARCADORES ENZIMÁTICOS DE LESÃO HEPÁTICA (AST/ALT)**

726 As amostras de sangue coletadas por punção cardíaca e depositadas em  
727 microtubos 15h após o estímulo com MSU, foram centrifugadas (200 g, 10 min, 4 ° C) e o soro  
728 foi separado. Para determinar as atividades enzimáticas da AST e ALT, as amostras de soro  
729 foram processadas de acordo com as instruções do fabricante (Labtest Diagnóstico S.A.,  
730 Brasil). Os resultados foram apresentados como U/L.

### 731 **3.17 ENSAIO DE TOXICIDADE NO ESTÔMAGO (ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE [MPO])**

732 Amostras de estômagos dos animais foram coletados 15 h após a injeção de  
733 MSU (100 µg, i.a.) na articulação fêmur-tibial. O recrutamento de neutrófilos para o tecido do  
734 estômago foi avaliado pelo ensaio colorimétrico da cinética da MPO (enzima mieloperoxidase)  
735 (BRADLEY et al., 1982; CASAGRANDE et al., 2006). As amostras foram homogeneizadas  
736 em tampão K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> gelado (400 µL, 50 mM, pH 6,0) contendo HTAB (0,5% massa / volume),  
737 e os homogenatos foram centrifugados (16,100 g × 2' × 4 ° C). Os sobrenadantes (30 µL)  
738 foram misturados com tampão K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (200 µL, 50 mM, pH 6,0) contendo dicloridrato de o-

739 dianisidina (0,0167%, p / v) e peróxido de hidrogênio (0,015%, v / v). A absorvância foi  
740 determinada após 5' a 450 nm (espectrofotômetro de microplacas GO Multiskan, Thermo  
741 Scientific, Vantaa, Finlândia). Os resultados da atividade de MPO foram expressos como o  
742 número de neutrófilos por mg de tecido usando como comparação uma curva padrão de  
743 neutrófilos (400-196.000 células)

### 744 **3.18 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

745 Os resultados dos parâmetros hiperalgésicos estão apresentados como média  
746  $\pm$  EPM (erro padrão da média) de mensurações realizadas em 6 animais por grupo com 2  
747 repetições. Foi utilizado ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Tukey para comparar  
748 os grupos e doses em todos os tempos (curvas) quando as respostas hiperalgésicas foram  
749 mensuradas em diferentes tempos após a administração do estímulo. Para os demais ensaios  
750 foi utilizada ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Tukey para experimentos com  
751 tempos específicos. Foram consideradas significativas diferenças para  $P < 0,05$  para ambas  
752 as análises.

753

754 Referências do texto não ficam mais no final da metodologia?

## 755 4 ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO

756 Os resultados e discussões obtidos no mestrado em Ciências da Saúde, foram  
757 realizados no Laboratório de Dor, Inflamação, Neuropatia e Câncer (LADINC), da  
758 Universidade Estadual de Londrina e estão descritos em dois artigos científicos.

759

### 760 4.1 ARTIGO 1

761 O presente trabalho segue as normas da revista Life Sciences, com qualis-  
762 periódico A1 em Medicina 1 e fator de impacto de 3.647. Os resultados parciais estão descritos  
763 no artigo intitulado “17(R)-Resolvin D1 ameliorates zymosan-induced experimental arthritis in  
764 mice exerting anti-inflammatory and analgesic effects”.

765

766

767

768

769

770

771

772

773

774

775

776

777

778

779

780

781

782

783

784 **4.2 17(R)-RESOLVIN D1 AMELIORATES ZYMOSAN-INDUCED EXPERIMENTAL ARTHRITIS IN MICE EXERTING**  
 785 **ANTI-INFLAMMATORY AND ANALGESIC EFFECTS**

786 **Ketlem C. Andrade<sup>1</sup>, Fernanda C. Ambrosio<sup>1</sup>, Marília F. Manchope<sup>1</sup>, Telma S. Saraiva<sup>1</sup>, Anelise Franciosi<sup>1</sup>,**  
 787 **Tiago H. Zaninelli<sup>1</sup>, Ana P. L. Pereira<sup>1</sup>, Rubia Casagrande<sup>2</sup>, Waldiceu Ap. Verri Jr<sup>1,\*</sup>**

788

789 <sup>1</sup>Department of Pathology, Biological Science Center, Londrina State University, Rod. Celso Garcia Cid, PR 445,  
 790 Km 380, Londrina, Paraná State 86051-990, Brazil

791 <sup>2</sup>Department of Pharmaceutical Sciences, Health Science Center, Londrina State University, University Hospital,  
 792 Londrina, Paraná State 86039-440, Brazil\*Autor correspondente:

793 \* Correspondence: Waldiceu A. Verri Jr. Departamento de Ciências Patológicas, Universidade Estadual de  
 794 Londrina-UEL, Rod. Celso Garcia Cid, km 380, PR 445, 86057-970, Cx. Postal 10.011, Londrina, Paraná, Brazil.  
 795 Fax: +55 43 33714387, Tel: +55 43 33714979; waldiceujr@yahoo.com.br; [waverri@uel.br](mailto:waverri@uel.br).

796

797 **ABSTRACT**

798 **Aims:** Rheumatic diseases affect the life quality of thousands of people in the world, among the symptoms of  
 799 arthritis. Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune disease that causes synovitis in the joints, pain, stiffness,  
 800 destruction of cartilage, loss of function, and physical disability commonly occur. To allow the study of this joint  
 801 inflammatory phenomenon in mice, an experimental model induced by intra-articular injection of zymosan, a  
 802 polysaccharide derived from the cell wall of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, was used. Thus, inflammatory  
 803 parameters appear similar to the period of acute RA. 17(R)-Resolvin D1 (17(R)-RvD1) or Aspirin-triggered  
 804 Resolvin D1 (AT-RvD1) is a pro-resolution lipid mediator with anti-inflammatory and analgesic properties. This  
 805 study aimed to evaluate the effects and mechanisms of action of 17(R)-RvD1 in a model of zymosan-induced  
 806 arthritis in mice.

807 **Main methods:** Von frey was used to measure mechanical hyperalgesia, hot plate for thermal hyperalgesia, SWB  
 808 for the changes in paw weight distribution, caliper for joint edema, for the count of leukocyte infiltrate was  
 809 determined in a Neubauer chamber, the histopathological lesion stained with hematoxylin-eosin (H&E) for later  
 810 examination under an optical microscope cytokine determined by ELISA.

811 **Key findings:** Treatment with 17(R)-RvD1 reduced zymosan-induced mechanical hyperalgesia in a dose-  
 812 dependent manner. The dose of 3 ng per mouse (intraperitoneally) decreased thermal hyperalgesia, changes in paw  
 813 weight distribution, knee joint volume (edema), the histopathological lesion (synovitis), leukocyte recruitment,  
 814 and levels of cytokines (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-10).

815 **Significance:** Therefore, the data suggest that 17(R)-RvD1 have analgesic and anti-inflammatory properties, and  
 816 therefore might be a novel candidate for the treatment of rheumatoid arthritis.

817 **Chemical compounds:** 17(R)-RvD1 (PubChem CID: 16126783).

818

819 **Keywords:** Rheumatoid arthritis, Synovitis, Aspirin-triggered Resolvin D1, SPM

820

821 **1. Introduction**

822 Rheumatoid arthritis is a progressive autoimmune disease that damages the joints by promoting an  
823 inflammatory process in their synovial membranes (synovitis). Pain, stiffness, cartilage destruction, loss of  
824 functionality, and physical disability are among the symptoms associated with this disease, which directly impact  
825 the quality of life of the affected patients [1,2]. The proliferation of resident synoviocytes is accompanied by  
826 neovascularization, and the infiltration of macrophages, neutrophils, and other cells [3]. Recruitment of  
827 inflammatory cells, especially neutrophils is one of the major elements associated with joint tissue damage due to  
828 the production of pro-inflammatory mediators and reactive oxygen species (ROS) [4,5]. The first cytokines to  
829 reach the synovial fluid are IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ , which in turn induce several other cytokines in the pro-inflammatory  
830 cascade, in addition to leukocytes recruitment [6,7].

831 The animal model of zymosan-induced arthritis (ZIA) mimics the inflammatory phenomenon of the period  
832 of acute rheumatoid arthritis [7,8], withal on the overlapping mechanisms. The model consists of an intra-articular  
833 injection of zymosan (Zym), a polysaccharide derived from the cell wall of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.  
834 The administration of zymosan into the joint is also characterized by significant joint edema and infiltration of  
835 inflammatory cells, characterized by the early neutrophil influx, followed by mononuclear cells and hyperplasia  
836 [9]. The role of neutrophils in the pathogenesis of tissue lesions in arthritis has long been recognized [10]. In this  
837 model, joint hyperalgesia is activated by the TLR2 pathway that recruits the adapter protein MyD88. This signaling  
838 pathway leads to the activation of transcription factors, such as NF $\kappa$ B, which trigger the production of  
839 inflammatory mediators, including the cytokines TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6 [8,9]. Those cytokines also contribute to  
840 the chemotactic activity of neutrophils and the production of more cytokines [7,11,12].

841 Conventional clinical treatments used to treat rheumatic disease are based on non-steroidal anti-inflammatory  
842 drugs (NSAIDs), corticosteroids, antirheumatic drugs, such as methotrexate, and immunobiological agents alone  
843 or in combination. In the case of rheumatoid arthritis, there is a reduction in joint and extra-articular symptoms  
844 and inhibition of radiographic progression. However, not all patients respond to antirheumatic drugs and a large  
845 portion do not tolerate treatment [13]. Besides, these pharmacological approaches generally present significant  
846 inconveniences, such as the need for high doses, which is usually accompanied by high costs [13,14], and frequent  
847 potential unwanted side effects, such as renal, hepatic, and cardiac changes to which they are associated with their  
848 comorbidities [13].

849 Resolvin RvD1 [17(S)-resolvin D1] is produced from docosahexaenoic acid in the site of inflammation by  
850 leukocytes and endothelial cells [15,16]. Biosynthesis of RvD1 requires 5- and 15-lipoxygenases, whereas the final  
851 step in the production of its stable analog 17(R)-Resolvin D1 requires aspirin- acetylated COX2 [16], raising the  
852 name of aspirin-triggered Resolvin D1(AT-RvD1). Compelling evidence has shown that 17(R)-RvD1 has a potent  
853 anti-inflammatory action, it reduces inflammatory signs, including pain and edema (total leukocyte infiltration)  
854 with the effectiveness of low doses [17,18].

855 Since there are no data in the literature that demonstrate the effect of 17(R)-RvD1 on the inflammatory  
856 process induced by zymosan, the present study aimed to evaluate the effects and mechanisms of action of this  
857 specialized pro-resolving lipid mediator in the model of zymosan-induced arthritis in mice.

858

## 859 **2. Material and methods**

### 860 2.1 Experimental mice

861 In this study, Swiss mice (male 20 – 25 g) provided by the State University of Londrina (Parana, Brazil) were

862 used to perform all experiments. Mice were kept in standard plastic cages measuring 41x34x16 cm (Insight®),  
863 according to the experimental groups (n=6). All behavior testing was performed in a room with the temperature-  
864 controlled, light-dark cycle of 12/12 h, and had water and food *ad libitum*. All experiments with mice occurred  
865 between 9:00 AM and 5:00 PM. The animals were acclimatized in the testing room at least 1 h before the  
866 experiments and were used only once. Mice were anesthetized with isoflurane 5 % (Abbot, Abbott Park, IL, USA)  
867 by inhalation overdose, and terminally euthanized by cervical dislocation followed by decapitation at the end of  
868 experiments described in the following sections. All experiments with mice were performed following the  
869 guidelines of the International Association for Study of Pain (IASP) and the Brazilian Council on Animal  
870 Experimentation (CONCEA). All animals were used according to the study protocols approved and registered by  
871 the Ethics Committee on Animal Use of the State University of Londrina (CEUA-UEL process number:  
872 1415.2018.99). All efforts were made to use the minimum possible number of mice.

873

## 874 2.2 Knee joint inflammation and pharmacological treatment

875 Joint inflammation was induced by intra-articular (i.a.) injection of 100 µg/ cavity of zymosan from  
876 *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma, St. Louis, MO), in 10 µL of sterile saline into the right knee joint cavity [19].  
877 Control animals received an injection of an equal volume of sterile saline. Animals were pretreated with 0.03; 0.3;  
878 or 3 ng/ mouse (diluted in saline, intra-peritoneal, i.p.) of 17(R)-RvD1 (Cayman Chemicals Company, Michigan,  
879 USA) 30 minutes before zymosan injection.

880

## 881 2.3 Assessment of evaluation of knee joint hypersensitivity

882 The mechanical hypersensitivity of the femorotibial joint was evaluated using an electronic version of the  
883 von Frey apparatus (Insight instruments, Ribeirao Preto, SP, Brazil) [9,20], coupled to a digital analgesimeter  
884 [21,22]. In a quiet, temperature-controlled room, mice were placed in acrylic cages (12 cm × 10 cm × 17 cm) with  
885 wire grid floors, at least 30 min before the start of testing. Animals were habituated during four consecutive days  
886 in 60 minutes sessions before the behavioral testing. To exclude the subcutaneous effect for the evaluation of knee  
887 joint hypersensitivity, it used a large polypropylene tip (4.15 mm<sup>2</sup> area size). An increased perpendicular force  
888 was applied to the central area of the plantar surface of the hind paw to induce flexion of the femorotibial joint.  
889 The mechanical force was applied when the animals were quiet and with the four paws on the grid floor. The upper  
890 limit pressure was 15 g. The positive response was considered after the withdrawal of the hind paw. After  
891 withdrawal, the intensity of the pressure (grams) was automatically recorded, with the final response value being  
892 obtained by the average of two measurements. The test was performed for 1, 3, 5, and 7 h after ZIA. The  
893 investigators were blinded to the treatment. After determining the best pretreatment time by the time-response  
894 curve, treatment with 17(R)-RvD1 was carried out half an hour before intraarticular injection of zymosan.

895

## 896 2.4 Evaluation of changes in paw weight distribution

897 Unilateral peripheral inflammation produces changes in weight-bearing distribution, dislocating weight  
898 toward the non-injured paw [23]. Changes in rear member weight distribution were evaluated using the Static  
899 Weight Bearing (SWB) apparatus (model BIO-SWB-TOUCH-M, Bioseb, France). In a quiet, temperature-  
900 controlled room, mice were gently placed into an acrylic chamber, where the animal is comfortably maintained  
901 while their hind paws rest on two separate sensor plates. Mice were habituated for at least four consecutive days

902 before the behavioral testing. The animal stands and makes a natural adjustment to the degree of pain by adapting  
903 weight distribution on the non-injured rear paw, and the value of the weight applied on each sensor is displayed  
904 on an LCD screen of the control unit. Mice were tested before (baseline values) and after treatment and stimulus.  
905 Each measurement consists of the weighted average in each sensor in 10 seconds of acquisition. The results are  
906 expressed by the right/left paw ratio, which was calculated using the mean of two measurements at 0 (baseline  
907 value), 1, 5, and 7 h after zymosan injection. The investigators were blinded to the treatments or groups.

908

#### 909 2.5 Thermal hyperalgesia test

910 Animals were placed on a hot plate apparatus (Insight, Ribeirao Preto, SP, Brazil) at a constant temperature  
911 of  $\pm 1^\circ\text{C}$  [24]. The endpoint was characterized by the removal of the paw followed by flinching or licking the paw.  
912 The reaction time was registered when the following responses were observed: jumping, clear paw flinching, or  
913 paw licking. Maximum latency until end-point was set at 20 s to avoid tissue damage. The results are expressed  
914 by total withdrawal latency (in seconds) of measurements obtained 1, 3, 5, and 7 h after stimulus [25]. The  
915 investigators were blinded to the treatment.

916

#### 917 2.6 Knee joint edema measurements

918 Knee joint edema for each mouse was determined using an analog caliper (Digmatic Caliper, Mitutoyo  
919 Corporation, Kanagawa, Japan) by the difference between values before (basal), and 1, 3, 5, and 7 h after ZIA.  
920 The edema value is represented as mm/joint [26]. The investigators were blinded to the treatment.

921

#### 922 2.7 Histological analysis

923 Tibiofemoral samples obtained from zymosan-stimulated mice treated with 17(R)-RvD1 were collected 7 h  
924 after injection of zymosan (i.a.) and fixed in 10% buffered formaldehyde. After decalcification in 4%  
925 ethylenediaminetetraacetic acid solution and hydrochloric acid for 4 weeks the samples were processed, stained  
926 with hematoxylin-eosin (H&E) for later examination under an optical microscope (Olympus OX31, Olympus,  
927 Japan; original magnification, 40), connected to a digital camera (Lumenera Infinity1, Ottawa, Canada). Results  
928 are expressed as leukocytes infiltrate (cell/field) counted at the inflammatory foci using the 40 $\times$  objective. Using  
929 the threshold tool on ImageJ 1.44 software (public domain: <http://rsb.info.nih.gov/ij/>), histological RGB images  
930 were analyzed using % cell per area.

931

#### 932 2.8 In vivo leukocyte migration in the joint cavity by microscopy

933 In vivo leukocyte migration in the knee joint wash was collected 7 h after the injection of the inflammatory  
934 stimulus. Briefly, the articular cavities were washed 3 times with 3.3  $\mu\text{L}$  of saline solution with 1 mM EDTA [27],  
935 which was recovered to evaluate total and differential, cell counts. The total number of leukocytes was determined  
936 in a Neubauer chamber diluted in Turk's solution (used to lyse erythrocytes). Differential cell counts (100 cells per  
937 slice) were performed in slices stained with the panoptic kit (Laborclin, Pinhais, PR, Brazil) under a light  
938 microscope (Olympus CX31RTSF, Tokyo, Japan). Results were expressed as total leukocytes,  
939 polymorphonuclear, and mononuclear cells (cells  $\times 10^4$ /knee joint).

940

#### 941 2.9 Cytokine production

942 Peripheral cytokines dosage was performed in samples of femorotibial joints collected 7 h after zymosan  
943 injection. IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-10 levels were determined by ELISA using eBioscience kits (eBioscience,  
944 San Diego, CA, United States) accordingly with manufacturer instructions. Reading was performed at 450 nm  
945 (Multiskan GO Microplate Spectrophotometer, Thermo Scientific, Vantaa, Finland). The results were obtained by  
946 comparing the optical density with the densities of the standard curves [28] and are expressed as picograms (pg)  
947 of each cytokine/ 100 mg of tissue [29].

948

#### 949 2.10 Statistical Analysis

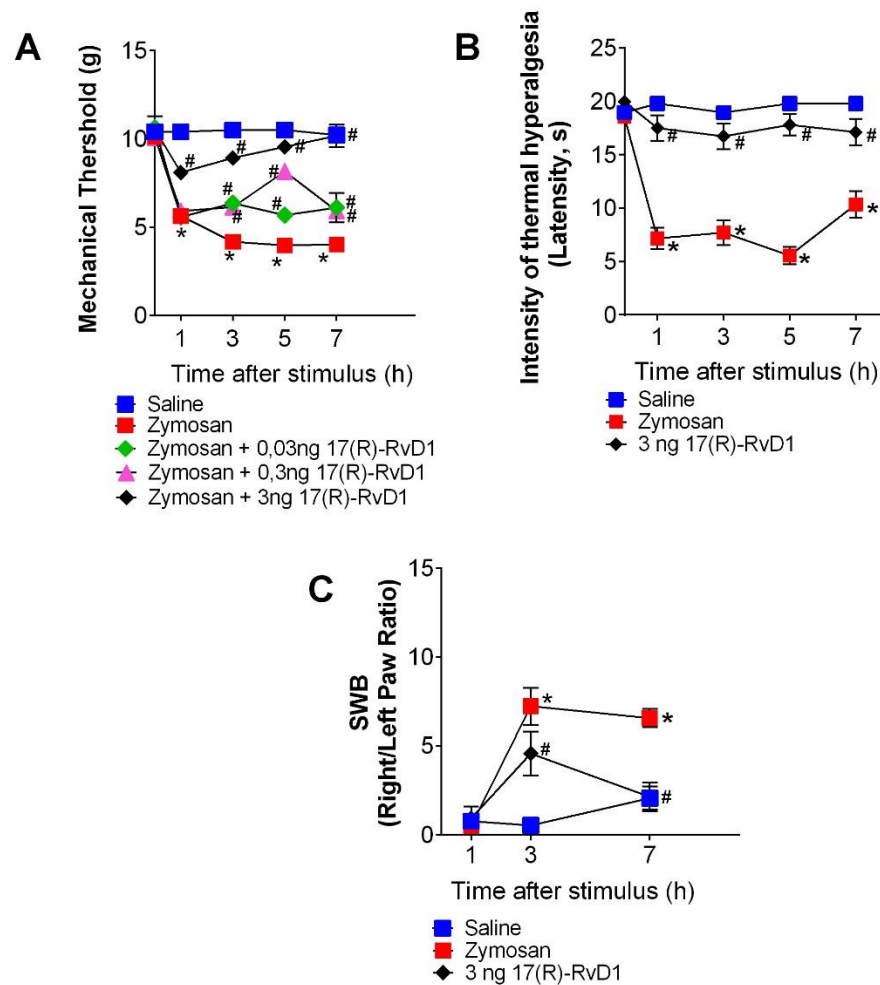
950 The results are presented as means  $\pm$  SEM (standard error of the mean) of measurements made of six mice  
951 in each group per experiment. Experiments were conducted twice. Experiments were conducted twice. Data were  
952 analyzed using the software GraphPad Prism 6.01. Two-way repeated-measures analysis of variance (ANOVA),  
953 followed by Tukey's post hoc, was used to compare all groups and doses when responses were measured at  
954 different time points after the stimulus injection. When an analysis was performed at a single time point, one-way  
955 ANOVA followed by Tukey's post hoc was used. Statistical differences were considered significant when  $P <$   
956 0.05.

957

### 958 3. Results

959 3.1. Treatment with 17(R)-RvD1 reduces in a dose-dependent manner the zymosan-induced mechanical  
960 hyperalgesia, thermal hyperalgesia, and change in rear member weight distribution

961 A dose-response curve was performed, evaluating the behavior of mechanical hyperalgesia using the digital  
962 analgesimeter (von Frey) at the intervals of 1, 3, 5, and 7 hours after the stimulus, in addition to the baseline  
963 measurement (time 0), for comparison purposes (Fig. 1A). Animals received treatment via intraperitoneal (i.p.)  
964 with 17(R)-RvD1, at doses of 0.03; 0.3; or 3 ng / mouse, 30 minutes before the injection with zymosan (100 $\mu$ g /  
965 10 $\mu$ l / intra-articular joint [i.a.]). The zymosan injection (i.a.) induces mechanical hyperalgesia at all times  
966 analyzed. The animals treated with 0.03 ng or 0.3 ng per mouse, significantly reduced mechanical hyperalgesia  
967 from the 3<sup>st</sup> to the 7<sup>th</sup> hour analyzed. However, treatment with dose at 3 ng/mouse, significantly reduced mechanical  
968 hyperalgesia at all times (1<sup>st</sup> to the 7<sup>th</sup> hour) analyzed. Therefore, the dose of 3 ng was chosen for the following  
969 experiments. Next, we evaluated the effects of 17(R)-RvD1 in thermal hyperalgesia and rear member weight  
970 distribution using a nonreflexive method (static weight-bearing). The animals were pretreated with 17(R)-RvD1  
971 (3 ng / mouse i.p.) 30 min before ZIA (100  $\mu$ g i.a.). The thermal threshold was measured 1, 3, 5, and 7 hours after  
972 the stimulus, and weight distribution in the time points of 1, 3, and 7 hours after Zym injection. Zymosan-induced  
973 a reduction in the thermal threshold (Fig. 1B) and changes in rear members weight-bearing (Fig. 1C). Importantly,  
974 the treatment with 3 ng per mice with 17(R)-RvD1 decreased thermal hyperalgesia (Fig. 1B) and restore static  
975 weight-bearing (Fig. 1C).



976

977

978

979

980

981

982

983

984

985

986

987

988

989

990

991

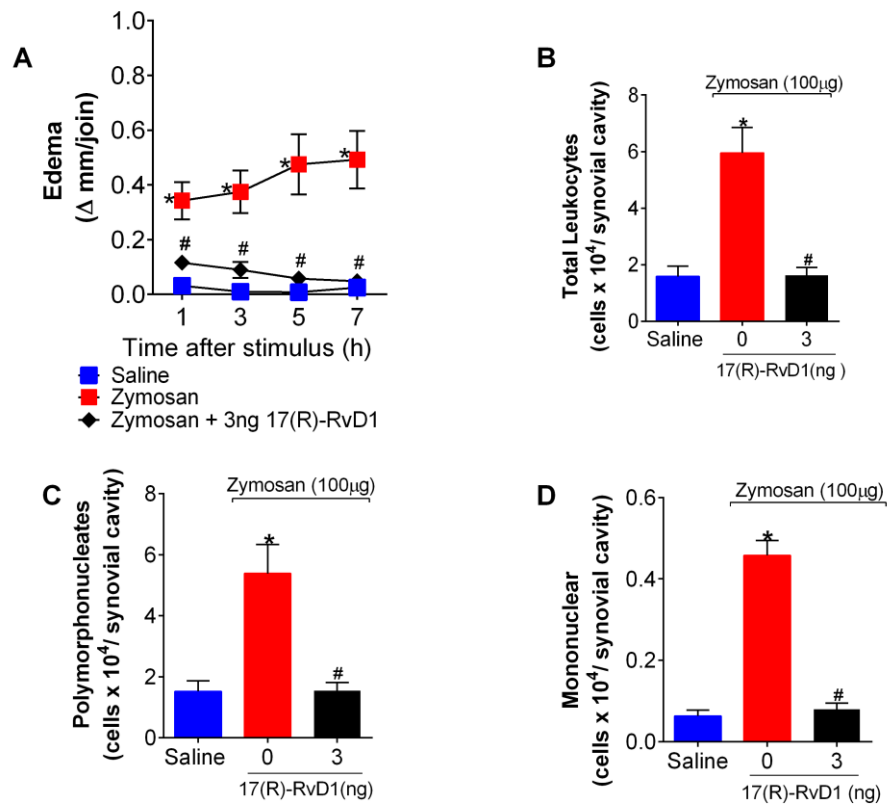
992

993

**Fig. 1.** 17(R)-RvD1 reduces zymosan-induced knee joint mechanical hyperalgesia in a dose-dependent manner, decreases heat thermal hyperalgesia, and restores rear member weight distribution. (A) Effect of 30 min pretreatment with different doses of 17(R)-RvD1 (0.03; 0.3, or 3 ng, i.p.) on mechanical hyperalgesia (von Frey) induced by ZIA (100  $\mu$ g/ 10  $\mu$ l sal/ cavity, i.a.). Mechanical hyperalgesia was assessed 1, 3, 5, and 7 h after treatment. The results are presented as mean  $\pm$  SEM of 6 animals per group \* $p$  < 0,05 compared to the saline group, #  $p$  < 0,05 compared to the zymosan group. (Two - way Anova and Tukey's t test). (B) Heat thermal hyperalgesia was evaluated in a hot plate apparatus (1, 3, 5, and 7 h after stimulus), and (C) rear member weight-bearing was evaluated in a static weight-bearing (SWB, 1, 3, and 7 h after stimulus). Results of thermal hyperalgesia and the weight ratio of left/right rear paw are presented as mean  $\pm$  SEM of 6 animals per group \* $p$  < 0.05 vs saline group; # $p$  < 0.05 vs zymosan group. (One - way Anova and Tukey's t test).

### 3.2. 17(R)-RvD1 reduces edema and articular leukocyte recruitment

We next evaluate the effect of 17(R)-RvD1 in reducing ZIA joint edema and leukocyte recruitment. Animals were pretreated with 17(R)-RvD1 (3 ng / i.p.) 30 min before injection with zymosan (100  $\mu$ g, i.a.). ZIA joint edema (Fig. 2A) and the number of recruited leukocytes (Fig. 2B - D). The other, 17(R)-RvD1 the reduction in edema (Fig. 2A), leukocyte recruitment was observed in total leukocytes (Fig. 2B), polymorphonuclear (Fig. 2C), and mononuclear (Fig. 2D) cells.



994

995

996

997

998

999

1000

1001

1002

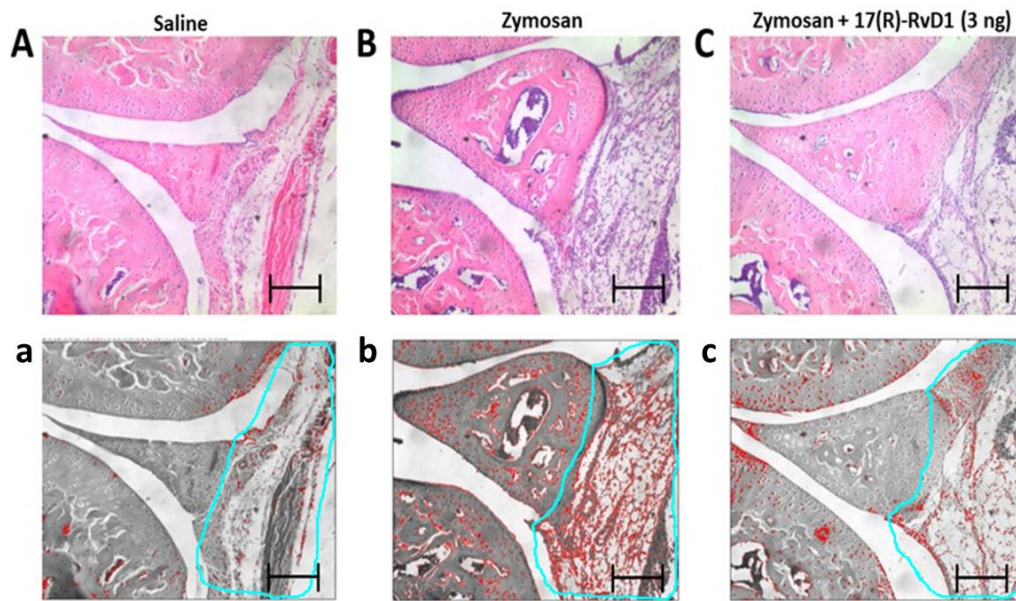
1003

1004

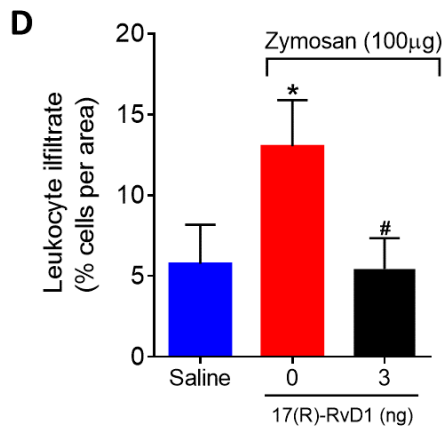
**Fig. 2.** 17(R)-RvD1 reduces edema and leukocyte recruitment. Effect of treatment with 17(R)-RvD1 (3 ng/ mouse, i.p.) 30 min before injection with ZIA (100  $\mu$ g, i.a.) in the formation of edema (A), recruitment of total leukocytes (B), polymorphonuclear (C), and mononuclear cells (D) in the synovial cavity. The results are presented as mean  $\pm$  SEM of 6 animals per group \*p < 0,05 compared to the saline group, # p < 0,05 compared to the zymosan group. (One-way Anova and Tukey's t test).

### 3.3. 17(R)-RvD1 reduces zymosan-induced synovitis

Mice were pre-treated with 17(R)-RvD1 (3 ng/ mouse, i.p.) 30 min before intra-articular injection with ZIA. Seven hours after the stimulus, the knee joint was sampled for H&E histological analysis. As observed in Fig. 4(A-D), 17(R)-RvD1 reduces ZIA inflammatory infiltrate and synovitis.



1005



1006

1007 **Fig. 3.** 17(R)-RvD1 reduces zymosan-induced synovitis. Animals were pretreated with 17(R)-RvD1 (3 ng/ mouse,  
 1008 i.p.) 30 min before injection of zymosan (100 µg / cavity, i.a.). Seven hours after the stimulus, the tibiofemoral  
 1009 joints were collected for H&E histological analysis. (A - C). 17(R)-RvD1 reduced inflammatory infiltrate and  
 1010 synovitis. ImageJ software was used to perform the image analyses (% cell per area, area highlighted in red in (a  
 1011 - c) (Original magnification 400x) by a total score of inflammatory cells per field (D). Results are presented as  
 1012 mean ± SEM of 6 animals per group \*p < 0.05 versus saline group; #p < 0.05 versus zymosan group. (One-way  
 1013 ANOVA followed by Tukey's t test).

1014

### 1015 3.4. 17(R)-RvD1 modulates the production of IL-1β, TNF-α, IL-6, and IL-10

1016

1017

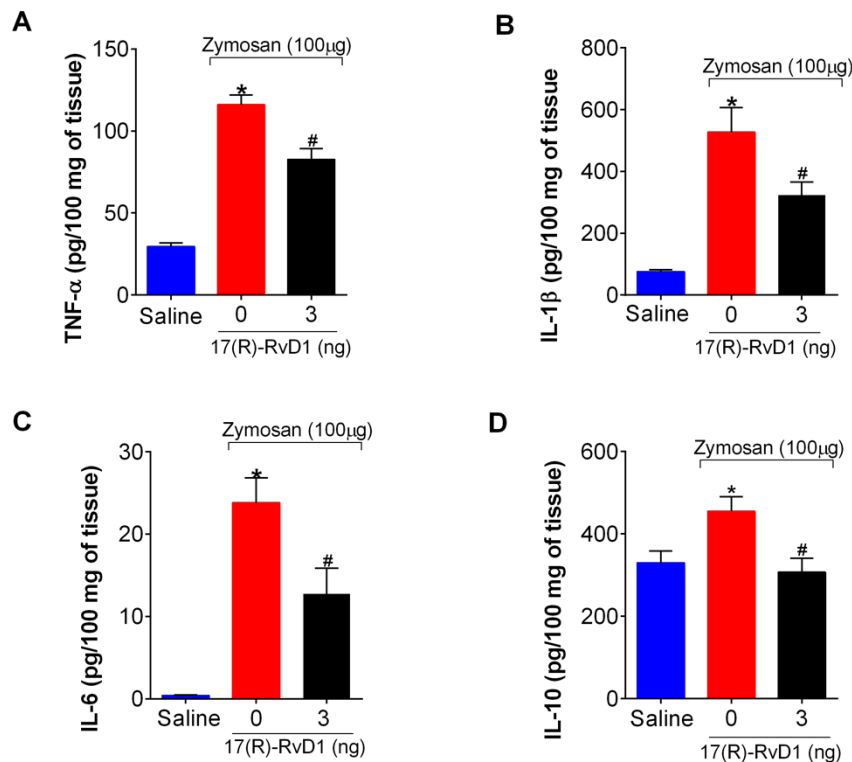
1018

1019

1020

1021

We next evaluate the effects of 17(R)-RvD1 in the production of the pro-inflammatory cytokines IL-1β, TNF-α, IL-6, and anti-inflammatory cytokine IL-10. The levels of cytokines were evaluated using ELISA commercial kits (Fig. 5). Animals stimulated with zymosan (100 µg / 10 µL sal/ mouse, i.a.) and vehicle showed a significant increase in IL-1β (Fig. 5A), TNF-α (Fig. 5B), IL-6 (Fig. 5C), and IL-10 (Fig. 5D) when compared to the saline-injected group. On the other hand, animals treated with 3 ng of 17(R)-RvD1 have reduced the levels of IL-1β (Fig. 5A), TNF-α (Fig. 5B), IL-6 (Fig. 5C), and IL-10 (Fig. 5D), when compared to the stimulated group.



1022

1023

1024

1025

1026

1027

1028

1029

**Fig. 4.** 17(R)-RvD1 reduces peripheral production of zymosan-induced cytokines. Effect of treatment with 17(R)-RvD1 (3 ng /mouse i.p.) 30 min before the stimulus with Zym (100 µg / 10 µL sal/ mouse, i.a.) on the levels of (A) IL-1β, (B) TNF-α, (C) IL-6, and (D) IL-10 per mg of tissue. Samples of the femorotibial joint were collected after 7 hours of stimulation. The results are expressed as mean ± EPM of 6 animals per group \* p < 0.05 compared to the saline group, # p < 0.05 compared to the zymosan group. (Anova One-way and Tukey's t test).

1030

1031

1032

1033

1034

1035

1036

1037

1038

1039

1040

1041

1042

1043

1044

1045

#### 4. Discussion

In the present study, the effects of 17(R)-Resolvin D1 were evaluated in a model of zymosan-induced arthritis. Compelling evidence demonstrates that the available pharmacological therapies for rheumatic diseases are usually accompanied by unwanted side effects and long-term usage-associated toxicity. Therefore, in the pharmacological field, there is a constant effort in the develop novel therapies capable of controlling symptoms and did not offer major side effects. In this study, we aimed to demonstrate the potential of 17(R)-RvD1 to the treatment of acute arthritis induced by zymosan.

The zymosan-induced arthritis animal model is important for the development of new anti-inflammatory and analgesic drugs. Intra-articular zymosan stimulation induces hyperalgesia, joint edema, leukocyte recruitment into the tissue, synovitis, and release of pro-inflammatory cytokines TNF-α and, IL-1β [7]. Thus, the first step of this study was to assess whether the 17(R)-RvD1 lipid mediator has an analgesic effect in an animal model of zymosan-induced arthritis. Additionally, different doses of the molecule were tested to determine the dose capable of reducing mechanical hyperalgesia more effectively. The results obtained, demonstrate that the treatment with 17(R)-RvD1 reduced the mechanical hyperalgesia induced by zymosan, and the dose of 3 ng per mouse being considered the most effective and, therefore, chosen for the other experiments. In addition to corroborating with data in the literature on the anti-hyperalgesic actions of this mediator [18].

Through the production and release of various pro-inflammatory mediators such as ET-1, eicosanoids,

1046 cytokines, metalloproteinases, and reactive oxygen and nitrogen species, the presence of neutrophils contributes  
1047 to tissue damage in rheumatoid arthritis [30,31]. Recruited neutrophils also participate in hyperalgesia induced by  
1048 zymosan releasing hyperalgesic molecules [11,32–35]. 17(R)-RvD1 reduced zymosan-induced arthritis as  
1049 observed by an increase in the mechanical and thermal threshold and right/left rear paw ratio on SWB. Here, we  
1050 interrogated pain by using an electronic analgesimeter, a reflexive (hot plate), and nonreflexive (SWB) methods  
1051 of pain measurements that most likely will result in the development of better analgesic drugs [36,37].

1052 This study showed that pretreatment with 17(R)-RvD1 at a dose of 3 ng/mouse reduces joint edema, a  
1053 leukocyte migration to the inflammatory focus, and histopathological damage to the joint. Therefore, inhibition of  
1054 leukocyte recruitment to the inflammatory focus by 17(R)-RvD1 may be a mechanism that contributes to the  
1055 reduction of mechanical hyperalgesia and inflammation induced by zymosan. Leukocyte recruitment induced by  
1056 zymosan was evaluated directly in the joint lavage. These results are in line with previous studies that relate the  
1057 protective potential of 17(R)-RvD1 to attenuated leukocyte recruitment (neutrophil alveolar infiltration) in a  
1058 bleomycin-induced pulmonary fibrosis model [38].

1059 The ability to reduce joint edema because of diminution leukocyte infiltration is similar to that found by Cox  
1060 Jr et al. They found in the model of acute hyperoxic lung injury treatment with 17(R)-RvD1 decreases pulmonary  
1061 edema (lung wet/dry ratio) and regulates enhances the resolution of hyperoxia-induced tissue inflammation which  
1062 contributed to histological damage to the lung [39]. In a murine experimental model of asthma, the pro-resolving  
1063 actions of 17(R)-RvD1 reduces for airway leukocytes infiltration and, improves airway mucus metaplasia, both  
1064 responsible for histopathological changes and damage to the lungs [40]. Besides, one of the mechanisms already  
1065 demonstrated for 17(R)-RvD1 is the specific TRPV3 block, leading to analgesia [41], once that activation of the  
1066 peripheral ion channel TRPV3 contributes to the sensation of pain thermal and chemical [42–44]. With this in  
1067 mind, the thermal hyperalgesia induced by zymosan was evaluated and its reduction was observed after treatment  
1068 with a lipid mediator.

1069 Another relevant result demonstrated in our study was that treatment reduces the production of anti and pro-  
1070 inflammatory cytokines. Cytokines are synthesized by different cells in response to a variety of stimuli and are  
1071 related to cartilage destruction and the course of arthritis, as mentioned earlier. Some of these mediators are  
1072 responsible for the progression and chronicity of the disease [45,46]. The first cytokine released in inflammation  
1073 is TNF- $\alpha$ , which triggers the release of IL-6 and IL-1 $\beta$ . Therefore, it is important to control pro-inflammatory  
1074 cytokines during the inflammatory process [45].

1075 In summary, in this study was demonstrated that treatment with 17(R)-RvD1 decreased the production of  
1076 these three specific mediators and, also, there was a reduction in the anti-inflammatory cytokine IL-10. The release  
1077 of IL-10 shows that the beneficial effects of 17(R)-RvD1 do not appear to depend on IL-10 anti-inflammatory  
1078 properties. This result can be related to previous reports that showed that the treatment with RvD2 leads to a  
1079 reduction in IL-10 protein levels in the cecal ligation and puncture model, showing that the IL-10 elevation is not  
1080 a general feature for resolvins and can be an organ and tissue-dependent [47]. Thus, the effects here observed  
1081 corroborate with mechanisms of action of other SPMs also derived from DHA. Zambalde and collaborators also  
1082 demonstrated the anti-inflammatory and pro-resolving effects of 17(R)-RvD1 in a cell model of patients with  
1083 severe asthma, showing significant results in reducing the cytokines TNF- $\alpha$  and IL-10 [48].

1084 In this study, we demonstrated that 17(R)-RvD1 improves the inflammatory pain induced by Zymosan. It  
1085 inhibited hyperalgesia mechanical and thermal, the formation of joint edema, leukocyte recruitment, and presented

1086 anti-inflammatory action in a murine model of zymosan arthritis, presenting a preclinical profile for the control of  
1087 this disease.

1088

## 1089 **5. Conclusion**

1090 The present study shows that the n-3 PUFA-derived mediators 17(R)-Resolvin D1 are effective in  
1091 attenuate zymosan-induced arthritis in mice. Our results showed that their beneficial actions were mainly  
1092 associated with their ability to inhibit PMN infiltration, synovitis, and reduce proinflammatory cytokines. Taken  
1093 together, our findings strongly suggest that the precursor of resolvins of the D series, 17(R)-RvD1 possesses  
1094 analgesic and anti-inflammatory properties and it could be useful as therapeutic agents for inflammatory pain  
1095 control in arthritis.

1096

### 1097 **Credit authorship contribution statement**

1098 K.C.A., T.H.Z., T.S.S., M.F.M., A.F., A.P.L.P., and A.C.R. performed experiments. K.C.A., T.H.Z., T.S.S.,  
1099 M.F.M., A.F., A.P.L.P., A.C.R., R.C., and W.A.V.J. analyzed and interpreted data. R.C. and W.A.V.J. were  
1100 responsible for the conception and design of the study. K.C.A., T.H.Z., T.S.S., M.F.M., A.F., A.P.L.P., and A.C.R.  
1101 organized the database. R.C. and W.A.V.J. provided research mentorship, supervision, received grants and  
1102 provided essential reagents. K.C.A., R.C. and W.A.V.J. wrote the manuscript. All authors contributed to  
1103 manuscript revision, read and approved the final version. All authors have read and agreed to the published version  
1104 of the manuscript.

1105

### 1106 **Declaration of competing interest**

1107 Authors declare no conflict of interest.

1108

### 1109 **Acknowledgments**

1110 K.C.A., F.C.A., M.F.M., T.S.S., A.F., T.H.Z., and A.P.L.P. acknowledge Masters and PhD scholarship from  
1111 CAPES (finance code 001). A.C.R. received CNPq and CAPES post-doc fellowships at different periods. R.C.  
1112 and W.A.V.J. thank the Research Fellowship from CNPq. Authors also acknowledge the PPSUS grant funded by  
1113 Decit/SCTIE/MS intermediated by CNPq with support of Fundação Araucária and SESA-PR (agreement  
1114 041/2017); and PRONEX grant (Programa de Apoio a Grupos de Excelência) supported by SETI/Fundação  
1115 Araucária and MCTI/CNPq, and Governo do Estado do Paraná (agreement 014/2017). We thank the facility  
1116 Laboratório de Análise de Materiais e Moléculas (LAMM) under the funding of FINEP (December 01, 0294.00  
1117 and 01.13.0049.00).

1118

### 1119 **References**

- 1120 [1] D.L. Asquith, A.M. Miller, I.B. McInnes, F.Y. Liew, Animal models of rheumatoid arthritis, *Eur. J.*  
1121 *Immunol.* 39 (2009) 2040–2044. <https://doi.org/10.1002/eji.200939578>.
- 1122 [2] S. Safiri, A.A. Kolahi, D. Hoy, E. Smith, D. Bettampadi, M.A. Mansournia, A. Almasi-Hashiani, A.  
1123 Ashrafi-Asgarabad, M. Moradi-Lakeh, M. Qorbani, G. Collins, A.D. Woolf, L. March, M. Cross, Global,  
1124 regional and national burden of rheumatoid arthritis 1990–2017: a systematic analysis of the Global Burden  
1125 of Disease study 2017, *Ann. Rheum. Dis.* 78 (2019) 1463–1471. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis->

- 1126 2019-215920.
- 1127 [3] J.J. Goronzy, C.M. Weyand, Rheumatoid arthritis, *Immunol. Rev.* 204 (2005) 55–73.
- 1128 <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2005.00245.x>.
- 1129 [4] A.J. Farrell, D.R. Blake, R.M.J. Palmer, S. Moncada, Increased concentrations of nitrite in synovial fluid
- 1130 and serum samples suggest increased nitric oxide synthesis in rheumatic diseases, *Ann. Rheum. Dis.* 51
- 1131 (1992) 1219–1222. <https://doi.org/10.1136/ard.51.11.1219>.
- 1132 [5] G.W. Cannon, S.J. Openshaw, J.B. Hibbs, J.R. Hoidal, T.P. Huecksteadt, M.M. Griffiths, Nitric oxide
- 1133 production during adjuvant-induced and collagen-induced arthritis, *Arthritis Rheum.* 39 (1996) 1677–
- 1134 1684. <https://doi.org/10.1002/art.1780391010>.
- 1135 [6] S. Siebert, A. Tsoukas, J. Robertson, I. McInnes, Cytokines as therapeutic targets in rheumatoid arthritis
- 1136 and other inflammatory diseases, *Pharmacol. Rev.* 67 (2015) 280–309.
- 1137 <https://doi.org/10.1124/pr.114.009639>.
- 1138 [7] C.F.S. Guazelli, L. Staurengo-Ferrari, A.C. Zarpelon, F.A. Pinho-Ribeiro, K.W. Ruiz-Miyazawa,
- 1139 F.T.M.C. Vicentini, J.A. Vignoli, D. Camilios-Neto, S.R. Georgetti, M.M. Baracat, R. Casagrande, W.A.
- 1140 Verri, Quercetin attenuates zymosan-induced arthritis in mice, *Biomed. Pharmacother.* 102 (2018) 175–
- 1141 184. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.03.057>.
- 1142 [8] S. Akira, K. Takeda, Toll-like receptor signalling, *Nat. Rev. Immunol.* 4 (2004) 499–511.
- 1143 <https://doi.org/10.1038/nri1391>.
- 1144 [9] A.T.G. Guerrero, W.A. Verri, T.M. Cunha, T.A. Silva, F.A.C. Rocha, S.H. Ferreira, F.Q. Cunha, C.A.
- 1145 Parada, Hypernociception elicited by tibio-tarsal joint flexion in mice: A novel experimental arthritis
- 1146 model for pharmacological screening, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 84 (2006) 244–251.
- 1147 <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2006.05.008>.
- 1148 [10] H. Jonsson, P. Allen, S.L. Peng, Inflammatory arthritis requires Foxo3a to prevent Fas ligand-induced
- 1149 neutrophil apoptosis, *Nat. Med.* 11 (2005) 666–671. <https://doi.org/10.1038/nm1248>.
- 1150 [11] A.T.G. Guerrero, W.A. Verri, T.M. Cunha, T.A. Silva, I.R.S. Schivo, D. Dal-Secco, C. Canetti, F.A.C.
- 1151 Rocha, C.A. Parada, F.Q. Cunha, S.H. Ferreira, Involvement of LTB<sub>4</sub> in zymosan-induced joint
- 1152 nociception in mice: participation of neutrophils and PGE<sub>2</sub>, *J. Leukoc. Biol.* 83 (2008) 122–130.
- 1153 <https://doi.org/10.1189/jlb.0207123>.
- 1154 [12] A.T.G. Guerrero, T.M. Cunha, W.A. Verri, R.T. Gazzinelli, M.M. Teixeira, F.Q. Cunha, S.H. Ferreira,
- 1155 Toll-like receptor 2/MyD88 signaling mediates zymosan-induced joint hypernociception in mice:
- 1156 Participation of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and CXCL1/KC, *Eur. J. Pharmacol.* 674 (2011) 51–57.
- 1157 <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.10.023>.
- 1158 [13] S.S. Laev, N.F. Salakhutdinov, Anti-arthritis agents: Progress and potential, *Bioorganic Med. Chem.* 23
- 1159 (2015) 3059–3080. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.05.010>.
- 1160 [14] A.S. Kesselheim, J. Avorn, A. Sarpatwari, The high cost of prescription drugs in the United States origins
- 1161 and prospects for reform, *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* 316 (2016) 858–871.
- 1162 <https://doi.org/10.1001/jama.2016.11237>.
- 1163 [15] S. Hong, K. Gronert, P.R. Devchand, R.L. Moussignac, C.N. Serhan, Novel docosatrienes and 17S-
- 1164 resolvins generated from docosahexaenoic acid in murine brain, human blood, and glial cells: Autacoids
- 1165 in anti-inflammation, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 14677–14687. <https://doi.org/10.1074/jbc.M300218200>.

- 1166 [16] C.N. Serhan, S. Hong, K. Gronert, S.P. Colgan, P.R. Devchand, G. Mirick, R.L. Moussignac, Resolvins:  
1167 A family of bioactive products of omega-3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment  
1168 that counter proinflammation signals, *J. Exp. Med.* 196 (2002) 1025–1037.  
1169 <https://doi.org/10.1084/jem.20020760>.
- 1170 [17] A.F. Bento, R.F. Claudino, R.C. Dutra, R. Marcon, J.B. Calixto, Omega-3 Fatty Acid-Derived Mediators  
1171 17( R )-Hydroxy Docosahexaenoic Acid, Aspirin-Triggered Resolvin D1 and Resolvin D2 Prevent  
1172 Experimental Colitis in Mice, *J. Immunol.* 187 (2011) 1957–1969.  
1173 <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101305>.
- 1174 [18] J. Lima-Garcia, R. Dutra, K. da Silva, E. Motta, M. Campos, J. Calixto, The precursor of resolvin D series  
1175 and aspirin-triggered resolvin D1 display anti-hyperalgesic properties in adjuvant-induced arthritis in rats,  
1176 *Br. J. Pharmacol.* 164 (2011) 278–293. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01345.x>.
- 1177 [19] F.A.C. Rocha, A.K.R.M. Leite, M.M.L. Pompeu, T.M. Cunha, W.A. Verri, F.M. Soares, R.R. Castro, F.Q.  
1178 Cunha, Protective effect of an extract from *Ascaris suum* in experimental arthritis models, *Infect. Immun.*  
1179 76 (2008) 2736–2745. <https://doi.org/10.1128/IAI.01085-07>.
- 1180 [20] L.G. Pinto, T.M. Cunha, S.M. Vieira, H.P. Lemos, W.A. Verri, F.Q. Cunha, S.H. Ferreira, IL-17 mediates  
1181 articular hypernociception in antigen-induced arthritis in mice, *Pain.* 148 (2010) 247–256.  
1182 <https://doi.org/10.1016/j.pain.2009.11.006>.
- 1183 [21] T.M. Cunha, W.A. Verri, G.G. Vivancos, I.F. Moreira, S. Reis, C.A. Parada, F.Q. Cunha, S.H. Ferreira,  
1184 An electronic pressure-meter nociception paw test for mice, *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 37 (2004) 401–  
1185 407. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2004000300018>.
- 1186 [22] S.H. Ferreira, B.B. Lorenzetti, F.M.A. Corrêa, Central and peripheral antialgesic action of aspirin-like  
1187 drugs, *Eur. J. Pharmacol.* 53 (1978) 39–48. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(78\)90265-0](https://doi.org/10.1016/0014-2999(78)90265-0).
- 1188 [23] E. Laboureyras, J. Chateauraynaud, P. Richebé, G. Simonnet, Long-Term Pain Vulnerability After Surgery  
1189 in Rats: Prevention by Nefopam, an Analgesic with Antihyperalgesic Properties, *Anesth. Analg.* 109  
1190 (2009) 623–631. <https://doi.org/10.1213/ane.0b013e3181aa956b>.
- 1191 [24] N.A. Maioli, A.C. Zarpelon, S.S. Mizokami, C. Calixto-Campos, C.F.S. Guazelli, M.S.N. Hohmann, F.A.  
1192 Pinho-Ribeiro, T.T. Carvalho, M.F. Manchope, C.R. Ferraz, R. Casagrande, W.A. Verri, The superoxide  
1193 anion donor, potassium superoxide, induces pain and inflammation in mice through production of reactive  
1194 oxygen species and cyclooxygenase-2, *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 48 (2015) 321–331.  
1195 <https://doi.org/10.1590/1414-431X20144187>.
- 1196 [25] T.R. Lavich, R.S.B. Cordeiro, P.M.R. Silva, M.A. Martins, A novel hot-plate test sensitive to hyperalgesic  
1197 stimuli and non-opioid analgesics, *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 38 (2005) 445–451.  
1198 <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2005000300016>.
- 1199 [26] F. Conte, O. Menezes-de-Lima, W. Verri, F. Cunha, C. Penido, M. Henriques, Lipoxin A4 attenuates  
1200 zymosan-induced arthritis by modulating endothelin-1 and its effects, *Br. J. Pharmacol.* 161 (2010) 911–  
1201 924. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00950.x>.
- 1202 [27] H.P. Lemos, R. Grespan, S.M. Vieira, T.M. Cunha, W.A. Verri, K.S.S. Fernandes, F.O. Souto, I.B.  
1203 McInnes, S.H. Ferreira, F.Y. Liew, F.Q. Cunha, Prostaglandin mediates IL-23/IL-17-induced neutrophil  
1204 migration in inflammation by inhibiting IL-12 and IFN $\gamma$  production, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106  
1205 (2009) 5954–5959. <https://doi.org/10.1073/pnas.0812782106>.

- 1206 [28] Y.S. Taktak, M. Lee, A solid phase enzyme immunoassay for serum amyloid A (SAA) protein. *Clinical*  
1207 *evaluation, J. Immunol. Methods.* 136 (1991) 11–16. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(91\)90243-9](https://doi.org/10.1016/0022-1759(91)90243-9).
- 1208 [29] T.M. Cunha, W.A. Verri, S.Y. Fukada, A.T.G. Guerrero, T. Santodomingo-Garzón, S. Poole, C.A. Parada,  
1209 S.H. Ferreira, F.Q. Cunha, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  mediate inflammatory hypernociception in mice triggered by  
1210 B1 but not B2 kinin receptor, *Eur. J. Pharmacol.* 573 (2007) 221–229.  
1211 <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.07.007>.
- 1212 [30] M.M. Bezerra, S.D. Brain, V.C.C. Girão, S. Greenacre, J. Keeble, F.A.C. Rocha, Neutrophils-derived  
1213 peroxynitrite contributes to acute hyperalgesia and cell influx in zymosan arthritis, *Naunyn.*  
1214 *Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* 374 (2007) 265–273. <https://doi.org/10.1007/s00210-006-0123-9>.
- 1215 [31] F. Conte, F. Ferraris, T. Costa, P. Pacheco, L. Seito, W. Verri, F. Cunha, C. Penido, M. Henriques, Effect  
1216 of Gedunin on Acute Articular Inflammation and Hypernociception in Mice, *Molecules.* 20 (2015) 2636–  
1217 2657. <https://doi.org/10.3390/molecules20022636>.
- 1218 [32] T.M. Cunha, W.A. Verri, I.R. Schivo, M.H. Napimoga, C.A. Parada, S. Poole, M.M. Teixeira, S.H.  
1219 Ferreira, F.Q. Cunha, Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory  
1220 hypernociception, *J. Leukoc. Biol.* 83 (2008) 824–832. <https://doi.org/10.1189/jlb.0907654>.
- 1221 [33] E. Ting, A.T.G. Guerrero, T.M. Cunha, W.A. Verri, S.M. Taylor, T.M. Woodruff, F.Q. Cunha, S.H.  
1222 Ferreira, Role of complement C5a in mechanical inflammatory hypernociception: potential use of C5a  
1223 receptor antagonists to control inflammatory pain, *Br. J. Pharmacol.* 153 (2008) 1043–1053.  
1224 <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707640>.
- 1225 [34] W.A. Verri, T.M. Cunha, D.A. Magro, A.T.G. Guerrero, S.M. Vieira, V. Carregaro, G.R. Souza,  
1226 M.D.G.M.O. Henriques, S.H. Ferreira, F.Q. Cunha, Targeting endothelin ETA and ETB receptors inhibits  
1227 antigen-induced neutrophil migration and mechanical hypernociception in mice, *Naunyn. Schmiedebergs.*  
1228 *Arch. Pharmacol.* 379 (2009) 271–279. <https://doi.org/10.1007/s00210-008-0360-1>.
- 1229 [35] V. Fattori, F.A. Amaral, W.A. Verri, Neutrophils and arthritis: Role in disease and pharmacological  
1230 perspectives, *Pharmacol. Res.* 112 (2016) 84–98. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.01.027>.
- 1231 [36] N.A. Andrews, A. Latrémolière, A.I. Basbaum, J.S. Mogil, F. Porreca, A.S.C. Rice, C.J. Woolf, G.L.  
1232 Currie, R.H. Dworkin, J.C. Eisenach, S. Evans, J.S. Gewandter, T.D. Gover, H. Handwerker, W. Huang,  
1233 S. Iyengar, M.P. Jensen, J.D. Kennedy, N. Lee, J. Levine, K. Lidster, I. Machin, M.P. McDermott, S.B.  
1234 McMahon, T.J. Price, S.E. Ross, G. Scherrer, R.P. Seal, E.S. Sena, E. Silva, L. Stone, C.I. Svensson, D.C.  
1235 Turk, G. Whiteside, Ensuring transparency and minimization of methodologic bias in preclinical pain  
1236 research, *Pain.* 157 (2016) 901–909. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000458>.
- 1237 [37] C.J. Woolf, Overcoming obstacles to developing new analgesics, *Nat. Med.* 16 (2010) 1241–1247.  
1238 <https://doi.org/10.1038/nm.2230>.
- 1239 [38] M. Yatomi, T. Hisada, T. Ishizuka, Y. Koga, A. Ono, Y. Kamide, K. Seki, H. Aoki-Saito, H. Tsurumaki,  
1240 N. Sunaga, K. Kaira, K. Dobashi, M. Yamada, F. Okajima, 17(R)-resolvin D1 ameliorates bleomycin-  
1241 induced pulmonary fibrosis in mice, *Physiol. Rep.* 3 (2015) e12628. <https://doi.org/10.14814/phy2.12628>.
- 1242 [39] R. Cox, O. Phillips, J. Fukumoto, I. Fukumoto, P.T. Parthasarathy, S. Arias, Y. Cho, R.F. Lockey, N.  
1243 Kolliputi, Enhanced resolution of hyperoxic acute lung injury as a result of aspirin triggered resolvin D1  
1244 treatment, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 53 (2015) 422–435. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2014-0339OC>.
- 1245 [40] A.P. Rogerio, O. Haworth, R. Croze, S.F. Oh, M. Uddin, T. Carlo, M.A. Pfeffer, R. Priluck, C.N. Serhan,

- 1246 B.D. Levy, Resolvin D1 and Aspirin-Triggered Resolvin D1 Promote Resolution of Allergic Airways  
1247 Responses, *J. Immunol.* 189 (2012) 1983–1991. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101665>.
- 1248 [41] S. Bang, S. Yoo, T. Yang, H. Cho, S. Hwang, 17(R)-resolvin D1 specifically inhibits transient receptor  
1249 potential ion channel vanilloid 3 leading to peripheral antinociception, *Br. J. Pharmacol.* 165 (2012) 683–  
1250 692. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01568.x>.
- 1251 [42] A. Moqrich, S.W. Hwang, T.J. Earley, M.J. Petrus, A.N. Murray, K.S.R. Spencer, M. Andahazy, G.M.  
1252 Story, A. Patapoutian, Impaired thermosensation in mice lacking TRPV3, a heat and camphor sensor in  
1253 the skin, *Science* (80-. ). 307 (2005) 1468–1472. <https://doi.org/10.1126/science.1108609>.
- 1254 [43] S.M. Huang, H. Lee, M.K. Chung, U. Park, Y.Y. Yin, H.B. Bradshaw, P.A. Coulombe, J.M. Walker, M.J.  
1255 Caterina, Overexpressed transient receptor potential vanilloid 3 ion channels in skin keratinocytes  
1256 modulate pain sensitivity via prostaglandin E2, *J. Neurosci.* 28 (2008) 13727–13737.  
1257 <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5741-07.2008>.
- 1258 [44] S. Bang, S. Yoo, T.J. Yang, H. Cho, S.W. Hwang, Farnesyl pyrophosphate is a novel pain-producing  
1259 molecule via specific activation of TRPV3, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 19362–19371.  
1260 <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.087742>.
- 1261 [45] T.M. Cunha, W.A. Verri, J.S. Silva, S. Poole, F.Q. Cunha, S.H. Ferreira, A cascade of cytokines mediates  
1262 mechanical inflammatory hypernociception in mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (2005) 1755–  
1263 1760. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409225102>.
- 1264 [46] F.P. Carlos, M. De Paula Alves Da Silva, E. De Lemos Vasconcelos Silva Melo, M.S. Costa, S.R.  
1265 Zamuner, Protective effect of low-level laser therapy (LLLT) on acute zymosan-induced arthritis, *Lasers*  
1266 *Med. Sci.* 29 (2014) 757–763. <https://doi.org/10.1007/s10103-013-1413-3>.
- 1267 [47] M. Spite, L. V. Norling, L. Summers, R. Yang, D. Cooper, N.A. Petasis, R.J. Flower, M. Perretti, C.N.  
1268 Serhan, Resolvin D2 is a potent regulator of leukocytes and controls microbial sepsis, *Nature.* 461 (2009)  
1269 1287–1291. <https://doi.org/10.1038/nature08541>.
- 1270 [48] É.P. Zambalde, M.M. Teixeira, D.C. Favarin, J.R. De Oliveira, M.L. Magalhães, M.M. Cunha, W.C. Silva,  
1271 C.H. Okuma, V. Rodrigues, B.D. Levy, A.D.P. Rogerio, The anti-inflammatory and pro-resolution effects  
1272 of aspirin-triggered RvD1 (AT-RvD1) on peripheral blood mononuclear cells from patients with severe  
1273 asthma, *Int. Immunopharmacol.* 35 (2016) 142–148. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2016.03.014>.
- 1274  
1275  
1276  
1277  
1278  
1279  
1280  
1281  
1282  
1283  
1284  
1285

**1286 4.3 ARTIGO 2**

1287 O presente trabalho segue as normas da revista International  
1288 Immunopharmacology, com qualis-periódico B1 em Medicina 1 e fator de impacto de 3.943.  
1289 Os resultados estão descritos no artigo intitulado “The pro-resolving lipid mediator Aspirin-  
1290 triggered Resolvin D1 attenuates gouty arthritis in mice via inhibition of NF- $\kappa$ B activation in  
1291 CD11b<sup>+</sup> cells”.

1292  
1293  
1294  
1295  
1296  
1297  
1298  
1299  
1300  
1301  
1302  
1303  
1304  
1305  
1306  
1307  
1308  
1309  
1310  
1311  
1312  
1313  
1314  
1315  
1316  
1317  
1318  
1319  
1320  
1321  
1322  
1323  
1324  
1325  
1326  
1327  
1328  
1329  
1330  
1331  
1332

1333 **4.4 THE PRO-RESOLVING LIPID MEDIATOR ASPIRIN-TRIGGERED RESOLVIN D1 ATTENUATES GOUTY**  
 1334 **ARTHRITIS IN MICE VIA INHIBITION OF NF- $\kappa$ B ACTIVATION IN CD11b<sup>+</sup> CELLS**

1335 Ketlem C. Andrade<sup>1</sup>, Tiago H. Zaninelli<sup>1</sup>, Telma Saraiva-Santos<sup>1</sup>, Marília F. Manchope<sup>1</sup>, Anelise Franciosi<sup>1</sup>, Ana  
 1336 P. L. Pereira<sup>1</sup>, Ana C. Rossaneis<sup>1</sup>, Rubia Casagrande<sup>2</sup>, Waldiceu A. Verri Jr<sup>1,\*</sup>

1337

1338 <sup>1</sup>Department of Pathology, Biological Science Center, Londrina State University, Rod. Celso Garcia Cid, PR 445,  
 1339 Km 380, Londrina, Paraná State 86051-990, Brazil

1340 <sup>2</sup>Department of Pharmaceutical Sciences, Health Science Center, Londrina State University, University Hospital,  
 1341 Londrina, Paraná State 86039-440, Brazil

1342 \* Correspondence: Waldiceu A. Verri Jr. Departamento de Ciências Patológicas, Universidade Estadual de  
 1343 Londrina-UEL, Rod. Celso Garcia Cid, km 380, PR 445, 86057-970, Cx. Postal 10.011, Londrina, Paraná, Brazil.  
 1344 Fax: +55 43 33714387, Tel: +55 43 33714979; waldiceujr@yahoo.com.br; waverri@uel.br.

1345

1346 **Abstract**

1347 The contemporary understanding of the inflammation resolution process shed light on the role of specialized pro-  
 1348 resolving lipid mediators. Those omega-3 polyunsaturated fatty acids-derivates orchestrate the process, and  
 1349 actively reestablish tissue homeostasis. Aspirin-triggered Resolvin D1 (AT-RvD1) or 17(R)-Resolvin D1 is a  
 1350 docosahexaenoic acid-derivate, which has been pointed to have anti-inflammatory and analgesic properties. AT-  
 1351 RvD1 has been shown to reduced inflammation, leukocyte recruitment, and NF- $\kappa$ B activity in models of  
 1352 inflammatory pain, its effect was not yet evaluated in the context of gouty arthritis. Therefore, in this study, we  
 1353 evaluate the action of AT-RvD1 on pain and inflammation induced by intra-articular injection of monosodium  
 1354 urate crystals (MSU) in a mouse model of gouty arthritis. Mice were treated with AT-RvD1 (0.03; 0.3; or 3 ng/  
 1355 mouse/intra-peritoneal [i.p.]) 30 minutes before an intra-articular (i.a.) injection of MSU (100 $\mu$ g/10 $\mu$ L of  
 1356 salina/cavity). The painful and inflammatory phenotype of the disease, expression of cytokines, stress oxidative  
 1357 parameters, and toxicity was evaluated 15 hours after the stimulus. Treatment with AT-RvD1 reduced MSU-  
 1358 induced mechanical hyperalgesia in a dose- and time-dependent manner. Moreover, the treatment also reduced  
 1359 thermal hyperalgesia, knee joint edema, histopathological lesion, leukocyte recruitment (total cells,  
 1360 polymorphonuclear cells and, mononuclear cells), pro-inflammatory cytokine production (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and, IL-  
 1361 6), oxidative stress (GSH, TBARs), and the NF- $\kappa$ B activation in CD11b<sup>+</sup> cells (phospho-NF- $\kappa$ B p65 fluorescence  
 1362 intensity, phospho-NF- $\kappa$ B p65 % positive cells and, CD11b fluorescence intensity). Importantly, no gastric,  
 1363 hepatic, or renal toxicity was observed. Thus, we demonstrate that AT-RvD1 has analgesic, antioxidant, and, anti-  
 1364 inflammatory properties in the animal model, without demonstrate any toxicity. Therefore, our data suggest that  
 1365 this molecule may be a novel candidate for the treatment of gouty arthritis.

1366

1367 **Keywords:** 17(R)-Resolvin D1, Gout, SPMs, Inflammation, MSU

1368

1369 **1. Introduction**

1370 Arthritis is a general term to refer to diseases with inflammatory characteristics that affect primarily joints and  
 1371 periarticular tissues. As inflammatory diseases, arthritis induces pain, edema, and joint stiffness mediated by the  
 1372 inflammation[1]. Stimulus with varied natures causes arthritis. In the case of gouty arthritis, monosodium urate

1373 crystals (MSU) are the cause of inflammation. Gouty arthritis is a prototypical inflammatory disease, as it induces  
1374 intermittent non-inflammatory and inflammatory periods. Gout arthritis is clinically characterized in the acute  
1375 flares of joint inflammation, which self-resolve in an interval of up to 7-10 days [2]. Gouty flares are described as  
1376 one of the most painful acute conditions experienced by human beings [3,4]. Gouty arthritis is initiated by an  
1377 accumulation of MSU crystals in the joints and periarticular tissues. Since the synovial fluid is an ultrafiltrate of  
1378 the plasma in the joints, which present lower temperature than the core of the body, allows MSU crystals formation  
1379 and precipitation [5,6]. MSU crystals are formed upon high blood levels of uric acid, in general, >7mg/dL [7].  
1380 Imbalances in uric acid metabolism include known and unknown genetic causes, eating habits, and consumption  
1381 of alcoholic beverages [8–10].

1382       Once formed, MSU crystals undergo phagocytosis by resident macrophages and the rupture of  
1383 phagolysosomes release cathepsins that activate the NLRP3 (NACHT, LRR, and PYD domains-containing protein  
1384 3) machinery [11,12]. Upon activation, NLRP3 complex with the accessory molecule ASC, and pro-caspase-1,  
1385 which is a cleavage in the active form, caspase-1. Activated caspase-1, cleaves pro-IL-1 $\beta$  into the mature for IL-  
1386 1 $\beta$  [11,12]. The mature IL-1 $\beta$  amplifies the inflammation by recruiting additional leukocytes, such as monocytes  
1387 and neutrophils. In gouty arthritis, neutrophils play an important role in the joint lesion and pain signaling.  
1388 Recruited and resident cells upon crystals phagocytosis, produce a series of pro-inflammatory mediators, such as  
1389 cytokines (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ), reactive oxygen (ROS), and nitrogen (RNS) species, among others [13–16]. The  
1390 production of IL-1 $\beta$  for instance activates the transcription factor NF- $\kappa$ B [5,11,17,18].

1391       This activity is reciprocal because NF- $\kappa$ B signaling stimulates the expression of more pro-IL-1 $\beta$ , as well as  
1392 inflammasome components NLRP3/ASC/pro-caspase-1 [13,19]. In turn, NF- $\kappa$ B enhances the expression of other  
1393 cytokines such as TNF- $\alpha$  and IL-6. Cytokines (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6) are involved in the recruitment of neutrophils,  
1394 edema formation, and increase the sensitivity of nociceptor sensory neurons, causing pain, which might be  
1395 described as mechanical and thermal hyperalgesia [20,21]. ROS also activates the translocation of NF- $\kappa$ B,  
1396 increasing inflammation [5,11,22]. Moreover, ROS can directly sensitize nociceptor neurons and contribute to the  
1397 development of inflammatory hyperalgesia [17]. Importantly, both ROS and MSU are well-known activators [11]  
1398 NLRP3 inflammasome [5,11,22].

1399       Specialized pro-resolving lipid mediators (SPMs) have essential endogenous roles in the resolution of  
1400 inflammatory processes through engagement, at nanomolar concentrations, of cognate G- protein-coupled  
1401 receptors [23]. SPMs are synthesized from arachidonic acid (a polyunsaturated omega-6 fatty acid), and the  
1402 metabolites of omega-3 fatty acids eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA). Arachidonic  
1403 acid, EPA, and DHA undergo metabolization by lipoxygenases and hydrolases originating the four main classes  
1404 of SPMs: lipoxins, resolvins, protectins, and maresins [24,25]. SPMs were identified in the resolution phase of the  
1405 inflammatory process acting in the induction of non-phlogistic macrophages - that phagocyte neutrophil apoptotic  
1406 bodies, reducing pro-inflammatory cytokines and removing inflammatory and infectious debris. In addition to pro-  
1407 resolution effects, SPMs have roles in host defense, pain, and tissue remodeling [24]. Importantly, despite  
1408 orchestrating the inflammation resolution process, SPMs do not have immunosuppressive activity [24]. Further,  
1409 SPMs show a long-lasting biological effect [26], contrasting with their short half-life, in the range of seconds in

1410 an aqueous medium [27]. Furthermore, the action of SPMs seems to be associate with the modulation of cellular  
1411 function and profile, therefore is a rationale that not all their effects are immediate.

1412         Resolvins constitute a family of SPMs derived from EPA, E-serie (RvE), and DHA, D-serie resolvins (RvD)  
1413 [27,28]. The DHA metabolization pathway gives origin to the 17S and 17(R)-RvD [28,29]. Importantly, treatment  
1414 with aspirin leads to changes in COX-2 acetylation, which yields substrate to lipoxygenase activity [28]. Aspirin  
1415 triggers the metabolization of DHA into 17R-hydroxy-DHA, which in subsequent oxygenation by 5-LOX results  
1416 in the production of Aspirin-triggered RvD1 or 17(R)-RvD1 [28,29]. This molecule can also be produced  
1417 endogenously in the absence of aspirin by alternative pathways involving cytochrome P450 enzymes [24].

1418         Among the anti-inflammatory and analgesic effects already described in the literature for exogenous  
1419 treatment AT-RvD1, we can mention the reduction in leukocyte recruitment, COX-2 expression, NF- $\kappa$ B activation,  
1420 pro-inflammatory cytokine production (*e.g.*, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ ), and mechanical and thermal hyperalgesia in a  
1421 model of inflammatory pain induced by Complete Freund's Adjuvant (CFA) [27–33]. This strong evidence  
1422 highlights the anti-inflammatory and analgesic properties of AT-RvD1 and instigates the evaluation of these  
1423 molecules in disease settings. Therefore, the present study aim in unveiling the analgesic and anti-inflammatory  
1424 effects, and suitable mechanisms of action of AT-RvD1 in an animal model of gouty arthritis.

1425

## 1426 **2. Materials and methods**

### 1427 2.1 Animals

1428         The experiments were performed on male Swiss mice (20-25 g) from Londrina State University, Parana,  
1429 Brazil. Animals were housed in standard clear plastic cages measuring 41×34×16 cm (Insight®), according to the  
1430 experimental groups (n=6), and received food and water *ad libitum* in temperature-controlled rooms (22–25 °C)  
1431 and a light/dark cycle of 12:12 h. All behavior testing was performed between 9 a.m. and 5 p.m. in a temperature-  
1432 controlled room. Animals were acclimatized in the testing room at least 1 h before the experiments and were used  
1433 only once. Mice were anesthetized with isoflurane 5% (Abbot, Abbott Park, IL, USA) by inhalation overdose, and  
1434 terminally euthanized by cervical dislocation followed by decapitation at the end of the experiments as described  
1435 in the following sections. Animal care and handling are in accordance with the International Association for Study  
1436 of Pain (IASP) and was approved by the Animal Ethics Committee of the Universidade Estadual de Londrina  
1437 (CEUA-UEL process number: 1415.2018.99). All efforts were made to minimize the number of animals used and  
1438 their suffering. Investigators were blinded to the treatments.

1439

### 1440 2.2 Evaluation of articular mechanical hyperalgesia

1441         Femoral-tibial joint mechanical hyperalgesia was evaluated with an electronic analgesimeter (Insight®  
1442 instruments, Ribeirão Preto, SP, Brazil) [34,35]. This apparatus consists of a force transducer adapted to a digital  
1443 counter that expresses the applied force in grams (g). Mice were accommodated in acrylic cages (12×10×17 cm)  
1444 with a metallic grid floor, 1h before the start of the test. Using a disposable polypropylene tip (4.15 mm<sup>2</sup>) the test  
1445 consists of the application of perpendicular force on the central area of the hind paw to induce a flexion movement  
1446 of the right femoral-tibial joint, followed by paw withdrawal, as previously described (GUERRERO et al., 2006;  
1447 PINTO et al., 2010). This response is considered nociceptive since it is modulated by clinically used analgesics  
1448 drugs [38]. The results obtained were calculated through the difference between the average of 2 measurements

1449 after the stimulus (in the intervals of 1, 3, 5, 7, and 15 h) and the average of 2 measurements before the stimulus  
1450 (baseline). Therefore, the dose of 3 ng/mouse was chosen to perform the next experiments.

1451

### 1452 2.3 Thermal hyperalgesia

1453 Heat thermal hyperalgesia was performed using a hot plate at  $52 \pm 1^\circ\text{C}$  [39]. The endpoint was characterized  
1454 by the removal of the paw followed by clear hind paw flinching or licking movements. The reaction time was  
1455 registered when the following responses were observed: jumping, clear paw flinching, or paw licking. The results  
1456 are expressed as withdrawal latency (in seconds). A cutoff of 20s was set to avoid tissue damage.

1457

### 1458 2.4 Articular edema

1459 The transverse diameters of the right femoral-tibial joint were measured using an analog caliper (Digimatic  
1460 Caliper, Mitutoyo Corporation, Kanagawa, Japan) to determine articular edema. The volume of the animal joints  
1461 was evaluated before the inflammatory stimulus (time 0) and 1, 3, 5, 7, and 15h after MSU injection. Results are  
1462 expressed as the difference between the measurements after and before the stimulus (baseline) [40].

1463

### 1464 2.5 Histological analysis

1465 Femoral-tibial joint samples were collected 15h after intra-articular administration of MSU and fixed in 10%  
1466 buffered formaldehyde. After decalcification in 4% ethylenediaminetetraacetic acid solution for 4 weeks, the  
1467 samples were paraffin-embedded, sectioned, and stained with hematoxylin-eosin (H&E) for later examination  
1468 under an optical microscope (Olympus OX31, Olympus, Japan; original magnification, 40), connected to a digital  
1469 camera (Lumenera Infinity1, Ottawa, Canada). Results are expressed as leukocytes infiltrate (cell/field) counted at  
1470 the inflammatory foci using the 40 $\times$  objective. Using the threshold tool on ImageJ 1.44 software (public domain:  
1471 <http://rsb.info.nih.gov/ij/>), histological RGB images were analyzed using % cell per area.

1472

### 1473 2.6 Leukocyte recruitment profile

1474 The recruitment of leukocytes to the femoral-tibial joint was determined 15h after MSU injection. The  
1475 articular cavity was washed 3 times with 3.3  $\mu\text{L}$  of saline solution with 1mM EDTA [41]. The total number of  
1476 leukocytes was determined in a Neubauer chamber diluted in Turk's solution (used to lyse erythrocytes), followed  
1477 by differential cell counts (100 cells per slide) in slices stained with the panoptic kit (Laborclin, Pinhais, PR, Brazil)  
1478 under a light microscope (Olympus CX31RTSF, Tokyo, Japan). Results are expressed as the number of total  
1479 leukocytes, polymorphonuclear, and mononuclear cells (cells $\times 10^4$ /knee joint cavity).

1480

### 1481 2.7 Cytokine levels

1482 After stimulation with MSU, articular tissue samples were collected for the measurement of proinflammatory  
1483 cytokines, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and IL-6. The samples were homogenized in saline containing proteases inhibitors,  
1484 centrifuged (3000 RPM, 4 $^\circ\text{C}$ , 10 minutes), and the supernatant was used to assess cytokine levels by commercial  
1485 ELISA kit (enzyme-linked immunosorbent assay), following manufactures' instructions. The results are expressed  
1486 in picograms (pg) of cytokine/100 milligram (mg) of tissue [42].

1487

### 1488 2.8 Lipid peroxidation

1489 The levels of thiobarbituric acid (TBA)-reactive substances (TBARS), primarily malondialdehyde (MDA),  
1490 were quantified spectrophotometrically as previously described [43]. Briefly, the tissue homogenate was reacted  
1491 with TBA (0.67%) to form MDA-(TBA)<sub>2</sub> complexes, and the proteins were precipitated with trichloroacetic acid  
1492 (TCA, 10%). The samples were incubated for 15min, 100°C in a boiling water bath, and transferred to an ice bath.  
1493 MDA, an intermediate product of lipid peroxidation, was determined by the difference between absorbance at 535  
1494 and 572 nm using a microplate spectrophotometer reader (Multiskan GO microplate spectrophotometer, Thermo  
1495 Scientific, Vantaa, Finland). Results are expressed as lipid peroxidation ( $\Delta$ OD A535-A572) per mg of protein [44].

1496

#### 1497 2.9 Reduced glutathione (GSH) levels

1498 For determination of GSH levels, knee joint samples were dissected 15h after intraarticular injection of MSU  
1499 (100  $\mu$ g, i.a.). Homogenates were mixed with 25  $\mu$ L of 50% trichloroacetic acid, vortexed three times for 15 min,  
1500 centrifuged (15min, 1500g, 4°C), and the resulting supernatant was added to 200  $\mu$ L of 0.2 M Tris buffer, pH 8.2,  
1501 and 10  $\mu$ L of 0.01 M DTNB. After 5 min of incubation at room temperature, the absorbance was measured at 412  
1502 nm. A standard curve of GSH was used, and the results are expressed as nmol GSH per mg of protein [45,46].

1503

#### 1504 2.10 Immunofluorescence assay

1505 Articular washes of mice were collected 15h after MSU i.a. injection into the knee joint using a solution of  
1506 PBS 1x/2mM EDTA/0.5% BSA (50 $\mu$ L). Cells were then cytocentrifuge (5min, 4°C, 300g) on sterile slides, and  
1507 let to dry out at room temperature overnight. Slides were fixed using a solution of paraformaldehyde 4%. After  
1508 that, was incubated with a blocking buffer (PBS, 2% BSA, 0.3% Triton) for 1h. Cells were incubated overnight  
1509 with primary antibodies anti-rat CD11b (1:200, #MCA711G, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and anti-mouse  
1510 Phospho-NF- $\kappa$ B p65 (1:200, #sc-136548; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA). The secondary antibodies  
1511 used were: Alexa Fluor 488 goat anti-mouse (1:500, #A-11001; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)  
1512 and Alexa Fluor 647 goat anti-rat (1:500, #A-21247; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Hoechst  
1513 33342, trihydrochloride trihydrate (1:500, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) was used for nuclear  
1514 staining. The chosen representative images and quantitative analysis were performed using a confocal microscope  
1515 (SP8, Leica, Microsystems, Mannheim, Germany). The intensity of fluorescence was quantified in randomly  
1516 selected fields of different groups by a blind evaluator.

1517

#### 1518 2.11 Liver, kidney, and stomach toxicity

1519 Blood samples were collected by cardiac puncture and deposited in microtubes 15h after the stimulus with  
1520 MSU. Samples were then centrifuged (200g, 10min, 4°C) and the serum was separated. The serum was used to  
1521 determine nephrotoxicity through the levels of urea and creatinine, and Diclofenac was used as a positive control  
1522 to kidney damage (200 mg/kg, orally, diluted in sterile saline, once). Serum samples were also used to determine  
1523 the enzymatic activities of AST and ALT, indicators of hepatotoxicity, and acetaminophen was used as a positive  
1524 control (650mg/kg, intraperitoneal [i.p.], diluted in sterile saline, once). Urea, creatinine, and liver enzymes activity  
1525 were determined using commercially available kits according to the manufacturer's instructions (Labtest  
1526 Diagnostic S.A., Brazil). The results are presented as U/L of serum.

1527

1528 To determine whether or not AT-RvD1 may induce gastric damage, stomach myeloperoxidase (MPO)

1529 inflammatory drugs [47]. The recruitment of neutrophils to the stomach tissue was evaluated by the colorimetric  
1530 assay of MPO kinetics. The samples of the stomach were homogenized in cold  $K_2HPO_4$  buffer (400 $\mu$ L, 50mM,  
1531 pH 6.0) containing HTAB (0.5% mass/volume), the homogenates were centrifuged (16,100 g $\times$ 2min $\times$ 4 $^\circ$ C), and the  
1532 resulting supernatant was assayed using a spectrophotometer (Multiskan GO Microplate Spectrophotometer,  
1533 ThermoScientific, Vantaa, Finland) for MPO activity determination at 450nm. The MPO activity of samples was  
1534 compared to a standard curve of neutrophils. Briefly, 15 $\mu$ L of the sample was mixed with 200 $\mu$ L of 50mM  
1535 phosphate buffer (pH 6.0), containing 0.167mg/mL O-dianisidine dihydrochloride and 0.0005% hydrogen  
1536 peroxide. Indomethacin (2.5 mg/kg, i.p., diluted in tris/HCl buffer, for 7 days) was used as positive drug control  
1537 for stomach damage. The results were presented as MPO activity (number of neutrophils  $\times$  10<sup>4</sup>/mg of tissue).  
1538

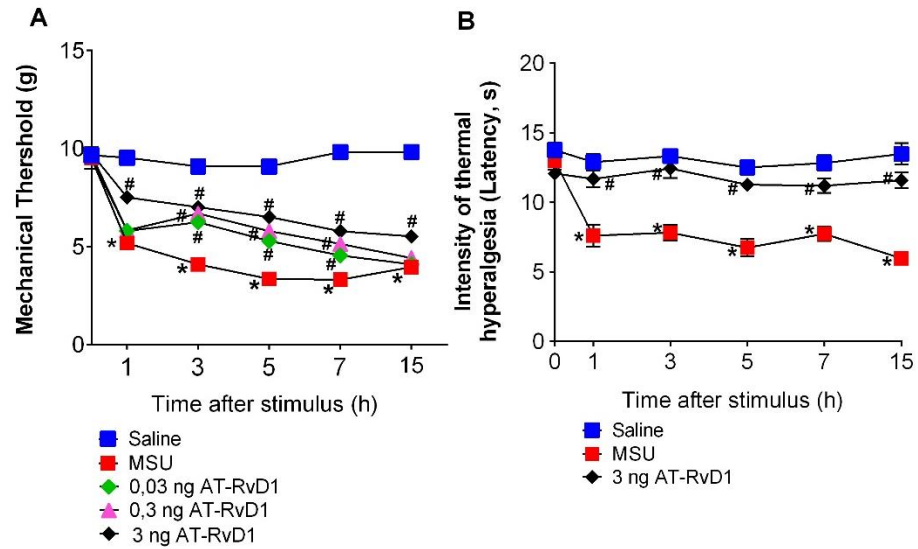
## 1539 2.12 Statistical Analysis

1540 The results are presented as means  $\pm$  SEM (standard error of the mean) of measurements made on six mice  
1541 in each group per experiment and are representative of two separate experiments. Two-way repeated-measures  
1542 analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post hoc was used to compare all groups and doses at all  
1543 times when responses were measured at different times after the stimulus injection. Differences between responses  
1544 were evaluated by one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc for data of single time point. Statistical  
1545 differences were considered significant when  $p < 0.05$  for both analyzes.  
1546

## 1547 3. Results

1548 3.1 Treatment with AT-RvD1 reduces in a dose-dependent manner the MSU-induced mechanical hyperalgesia,  
1549 and thermal hyperalgesia.

1550 A dose-response curve was performed evaluating the analgesic effect of AT-RvD1 (0.03; 0.3; or 3 ng/ mouse,  
1551 i.p.), 1, 3, 5, 7, and 15 hours after the i.a. stimulus with MSU (100 $\mu$ g/10 $\mu$ L sal/cavity) (Fig. 1A). Baseline values  
1552 were determined at the time point zero. The intensity of mechanical hyperalgesia (g) measured in the saline group  
1553 did not change significantly between different times. The injection of MSU induced mechanical hyperalgesia at  
1554 all analyzed times compared to the saline group. The groups that received treatment with doses of 0.03 and 0.3  
1555 ng/mouse of AT-RvD1 showed a reduction in mechanical hyperalgesia from the 3<sup>st</sup> h to the 7<sup>th</sup> h after the stimulus.  
1556 Treatment with the dose of 3 ng/mouse significantly reduced the mechanical hyperalgesia at all times (1<sup>st</sup> h to the  
1557 15<sup>th</sup>) analyzed after MSU injection. Therefore, the dose of 3 ng/mouse was chosen to perform the next experiments.  
1558 Thermal hyperalgesia was evaluated using the hot plate test. Mice were treated with AT-RvD1 (3 ng/mouse/i.p. 30  
1559 min) before the i.a. injection of MSU (100 $\mu$ g/cavity). MSU reduced the thermal threshold and the treatment with  
1560 AT-RvD1 decreased this parameter (Fig. 1B).



1561

1562

1563

1564

1565

1566

1567

1568

1569

1570

1571

1572

1573

1574

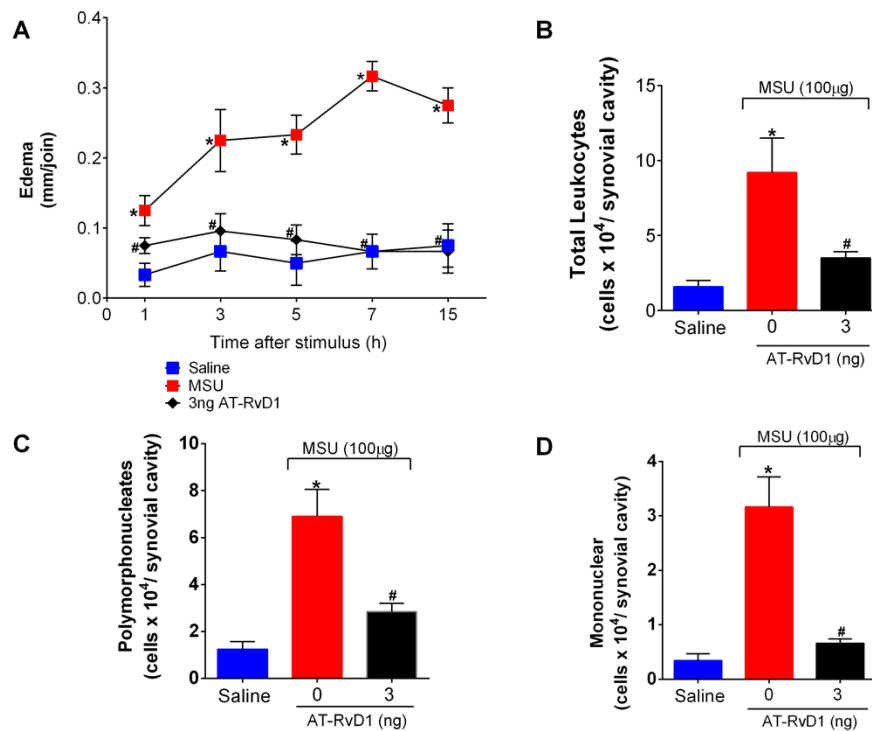
1575

1576

**Fig. 1.** AT-RvD1 reduces gouty arthritis mechanical hyperalgesia in a dose-dependent manner and thermal hyperalgesia. Effect of 30 min pretreatment with treated doses of AT-RvD1 (0.03; 0.3; or 3 ng/mouse/i.p.) over mechanical hyperalgesia induced by i.a MSU injection (100 $\mu$ g/10 $\mu$ L sal/cavity) (A). The effect over thermal hyperalgesia induced by the injection of MSU (B). Mechanical and thermal hyperalgesia was assessed 1, 3, 5, 7, and 15 h after treatment. The results are presented as mean  $\pm$  SEM of 6 animals per group \* $p$ <0.05 compared to the saline group, # $p$ <0.05 compared to the MSU group. (Two-way Anova and Tukey's t test).

### 3.2 Treatment with AT-RvD1 reduces gouty arthritis joint edema and leukocyte recruitment

The potential of AT-RvD1 in reducing MSU-induced edema and leukocyte recruitment was evaluated. Animals were pretreated with AT-RvD1 (3ng/mouse/i.p., 30 min) before injection with MSU (100 $\mu$ g/10 $\mu$ l sal/i.a./cavity). Edema is one of the inflammation hallmarks (GUERRERO et al., 2006), our data demonstrate that MSU-induced joint edema, increasing in the joint thickness (Fig. 2A). Importantly, AT-RvD1 decreases MSU-induced edema at all time points. MUS stimulus-induced leukocyte recruitment to the knee joint cavity (Fig. 2B - D), and the number of total leukocytes (Fig. 3B), polymorphonuclear cells (Fig. 3C), and mononuclear cells (Fig. 3D) are reduced in mice treated with AT-RvD1 at 3 ng/mouse.



1577

1578

1579

1580

1581

1582

1583

1584

**Fig. 2.** Treatment with AT-RvD1 reduces the joint edema and leukocyte recruitment triggered by MSU. Effect of treatment with AT-RvD1 (3ng/mouse/i.p.) 30 min before injection with MSU (100µg/10µl sal/i.a./cavity) in joint edema development (A), and recruitment of total leukocytes (B), polymorphonuclear (C) and mononuclear (D) cells into the synovial cavity. The results are presented as mean ± SEM of 6 animals per group \*p<0.05 compared to the saline group, # p<0.05 compared to the MSU group. (One-way Anova and Tukey's t test).

### 3.3 Treatment with AT-RvD1 reduces MSU-induced synovitis

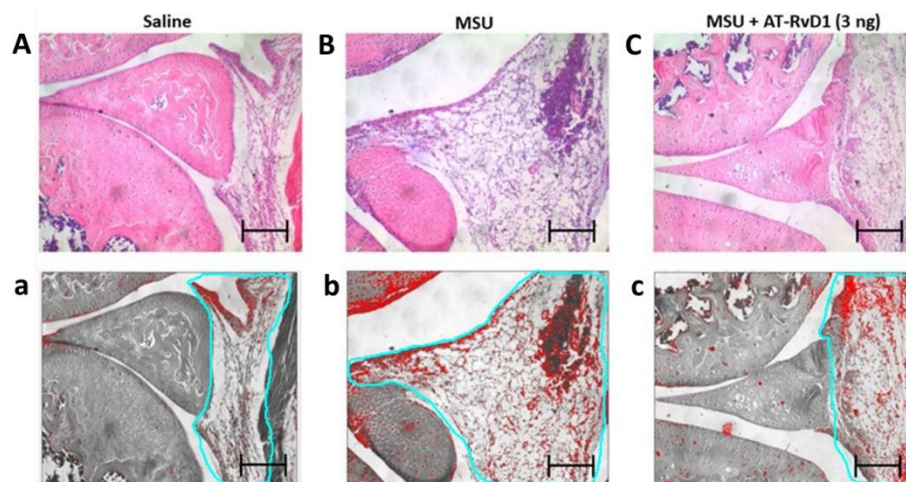
1585

1586

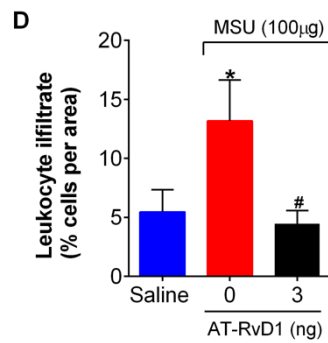
1587

1588

Animals were pretreated with AT-RvD1 (3ng/mouse/i.p.) 30 min before injection of MSU injection (100µg/10µl sal/i.a./cavity). At 15 h after the stimulus, the knee joint was collected for H&E histolog evaluation (Fig. 3A-D). AT-RvD1 inhibited MSU-induced inflammatory infiltrate and synovitis as observed in the histological index analyses (Fig. 3A-D).



1589



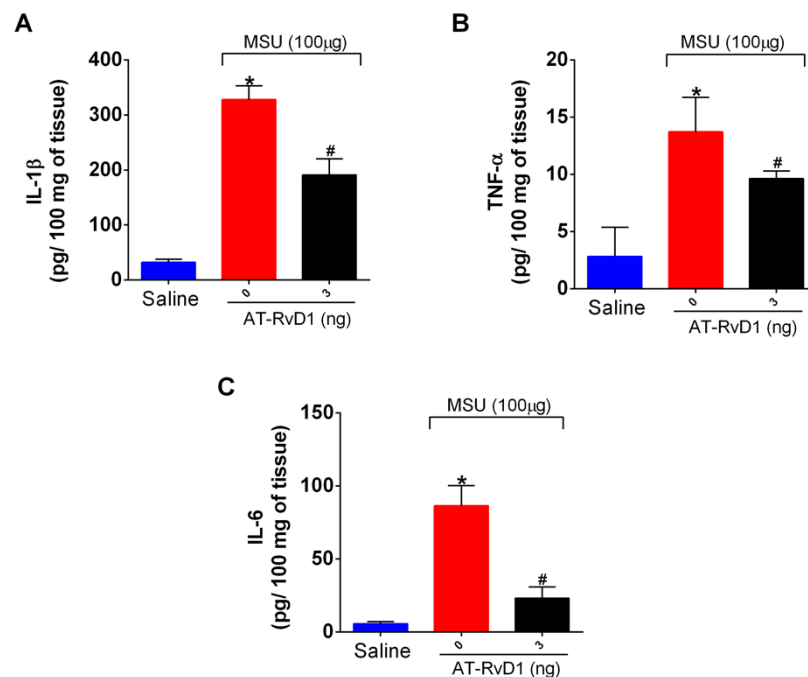
1590

1591 **Fig. 3.** AT-RvD1 reduces MSU-induced synovitis. Animals were pretreated with AT-RvD1 (3ng/mouse/i.p.) 30  
 1592 min before injection of MSU (100µg/10µl sal/i.a./cavity). At 15 h after the stimulus, the femoral-tibial joints were  
 1593 collected for histological analysis stained with H&E (Fig. 3). AT-RvD1 reduced inflammatory infiltrate as  
 1594 observed in the histological analysis as indicative of synovitis is presented in panel (A - C). ImageJ software was  
 1595 used to perform the image analyses (% cells per area, area highlighted in red in (a - c) by a total score of  
 1596 inflammatory cells per field (D). Results are presented as mean ± SEM of 6 animals per group \*p<0.05 versus  
 1597 saline group; #p<0.05 versus MSU group. (One-way ANOVA followed by Tukey's t test).

1598

1599 3.4 Treatment with AT-RvD1 diminishes knee joint levels of IL-1β, TNF-α, and IL-6 cytokines

1600 The potential effect of AT-RvD1 in altering the production of pro-inflammatory cytokines such as IL-1β,  
 1601 TNF-α, and IL-6 were evaluated using the ELISA method (Fig. 4). Mice were stimulated with MSU (100µg/10µl  
 1602 sal/i.a./cavity) and treated with vehicle or AT-RvD1. The group stimulated with MSU presented a significant  
 1603 increase in IL-1β (Fig. 4A), TNF-α (Fig. 4B), and IL-6 (Fig. 4C) levels compared to the saline group. In the group  
 1604 treated with AT-RvD1 it was observed a reduction of IL-1β (Fig. 4A), TNF-α (Fig. 4B), and IL-6 (Fig. 4C) levels  
 1605 in comparison to the stimulated group.



1606

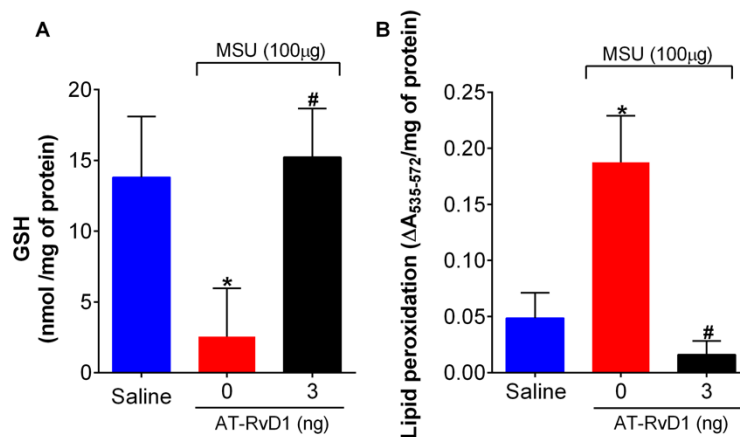
1607 **Fig. 4.** Treatment with AT-RvD1 reduces knee joint levels of cytokines in gouty arthritis. Mice were treated with

1608 AT-RvD1 (3ng/mouse/i.p.) 30 min before the stimulus with MSU (100 $\mu$ g/10 $\mu$ l sal/i.a./cavity) and knee joint levels  
 1609 of IL-1 $\beta$  (A), TNF- $\alpha$  (B), and IL-6 (C) per mg of tissue were analyzed by ELISA. Samples of the femoral-tibial  
 1610 joint were collected after 15 hours of stimulation. The results are expressed as mean  $\pm$  SEM of 6 animals per group  
 1611 \* p<0.05 compared to the saline group, # p<0.05 compared to the MSU group. (Anova One-way and Tukey's t  
 1612 test).

1613

### 1614 3.5 Treatment with AT-RvD1 inhibits MSU-induced oxidative stress

1615 Animals were treated and knee joint samples were collected 15h after the stimulus to evaluate the effect of  
 1616 AT-RvD1 (3ng/mouse/i.p.) on MSU-induced oxidative stress. The stimulus with MSU diminished the levels of  
 1617 reduced glutathione (GSH) in the joint tissue [Fig. 5A] and treatment with AT-RvD1 restored the levels [Fig. 5A].  
 1618 In addition to the endogenous antioxidant GSH, we also evaluated the levels of lipid peroxidation products using  
 1619 TBARS assay. MSU enhanced the levels of lipid peroxidation and AT-RvD1 inhibited this parameter [Fig. 5B].



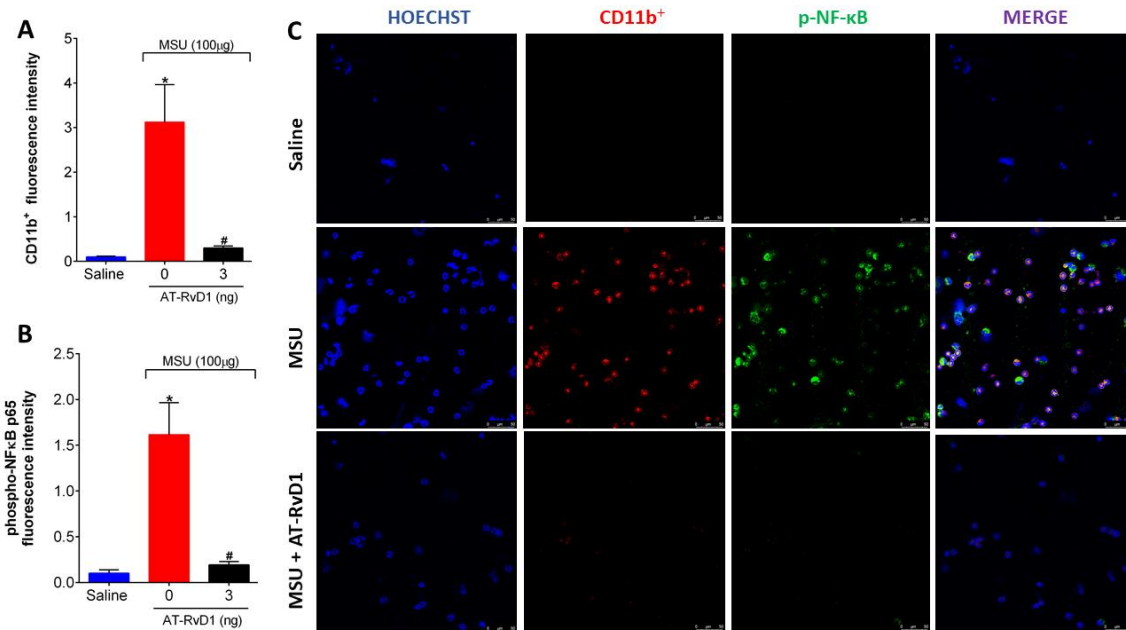
1620

1621 **Fig. 5.** AT-RvD1 decreases oxidative stress caused induced by i.a. injection of MSU. Effect of treatment with AT-  
 1622 RvD1 (3ng/mouse/i.p., 30min) suppressed reduced glutathione depletion (A) and reduced lipid peroxidation (B).  
 1623 The results are expressed as mean  $\pm$  SEM of 6 animals per group \* p<0.05 compared to the saline group, # p<0.05  
 1624 compared to the MSU group. (Anova One-way and Tukey's t test).

1625

### 1626 3.6 AT-RvD1 treatment reduces NF- $\kappa$ B activation and recruitment of CD11b<sup>+</sup> cells to the knee joint cavity

1627 Mice were treated with AT-RvD1 (3ng/mouse, i.p., 30min), knee joint synovial fluid was collected 15 h after  
 1628 the stimulus, and cells were stained for CD11b<sup>+</sup> and phosphorylated (p)-NF- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B activation) [Fig. 6].  
 1629 Immunofluorescence analysis showed that MSU increased the number of CD11b<sup>+</sup> and p-NF- $\kappa$ B activation staining  
 1630 which were inhibited with AT-RvD1 treatment [Fig.6A - C]. Representative images are shown in Fig. 6C.



1631

1632

1633

1634

1635

1636

1637

1638

1639

1640

1641

1642

1643

1644

1645

1646

1647

1648

1649

1650

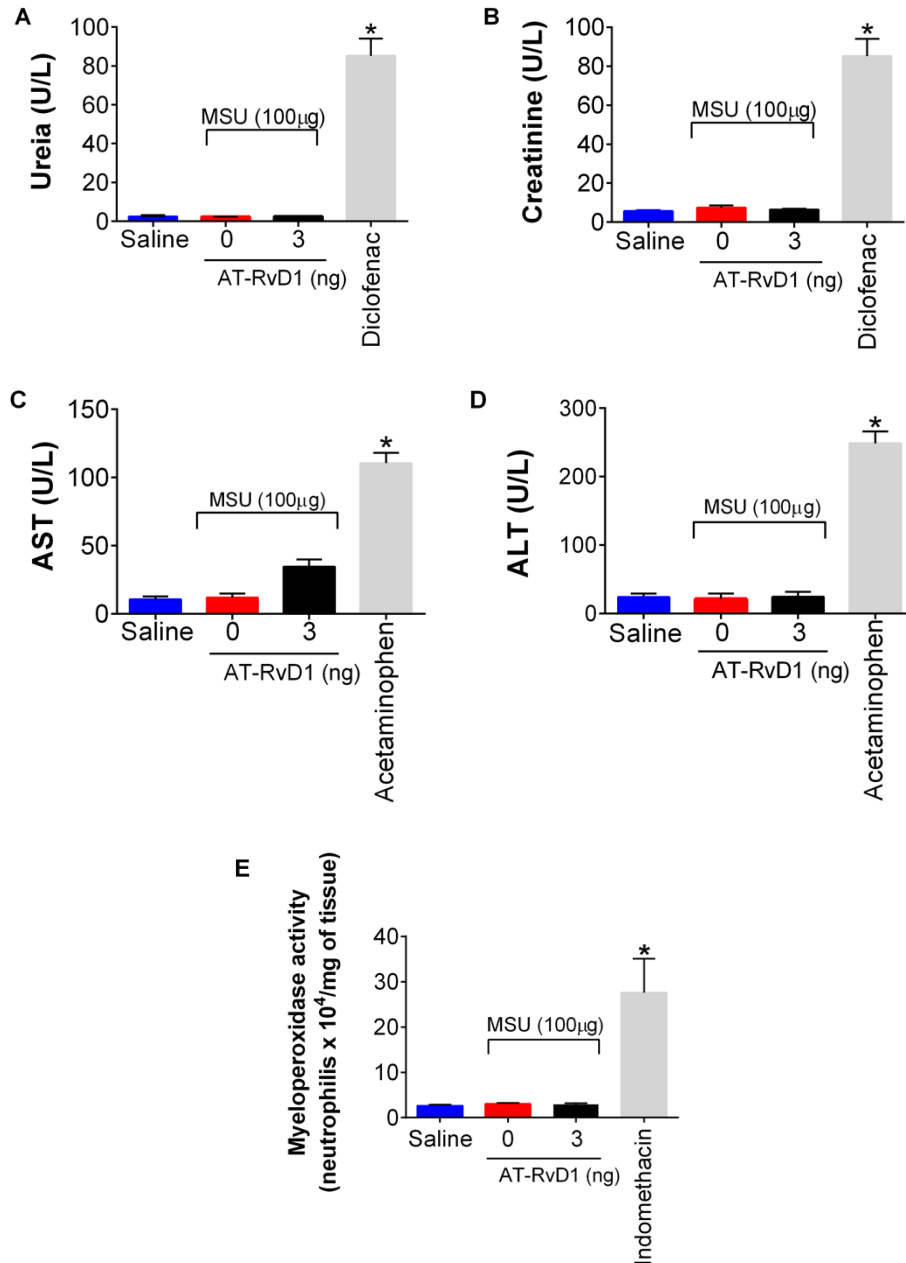
1651

1652

**Fig. 6.** NF-κB activation triggered by MSU was suppressed by AT-RvD1. A synovial lavage was used. Mice were pre-treated 30 min with AT-RvD1 (3ng/mouse, i.p.) before MSU (100μg, cavity, i.a.). Phospho-NF-κB p65 fluorescence intensity (A) CD11b<sup>+</sup> fluorescence intensity (B) with HOECHST were analyzed 15 h after stimulus with MSU by immunofluorescence in a confocal microscope at×40 magnification. Arrows representative cells with colocalized fluorescence intensity. Results are presented as mean ± SEM of 6 wells per group. \*p<0.05 versus saline group; #p<0.05 versus MSU group. (One- way ANOVA followed by Tukey's t test.

### 3.7 Treatment with AT-RvD1 does not induce renal, hepatic, or gastritis injury

The capacity of treatment with AT-RvD1 to cause renal, hepatic, or gastritis injury were evaluated. The animals were pretreated with AT-RvD1 (3ng/mouse, i.p.) 30 min before i.a. injection with MSU (100μg/10 μL sal/cavity). At the 15 h after the stimulus, serum samples were collected to analyzes concentrations of urea and creatinine, both indicators of nephrotoxicity, and concentrations of aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT), both indicators of hepatotoxicity. Stomach samples were collected to determine the activity of the myeloperoxidase enzyme (MPO), as an indirect parameter of neutrophilic inflammation. Animals were treated with diclofenac (200mg/kg, per oral gavage, diluted in sterile saline once) as a positive control for kidney injury, acetaminophen as a positive control of liver injury (650mg/kg, orally, diluted in sterile saline solution, 200mg/mL, once), or indomethacin (2.5 mg/kg, i.p., diluted in TRIS/HCL buffer for 7 days) as a positive control of gastritis. Treatment with a dose of 3ng/mouse of AT-RvD1, as well as stimulation with MSU, did not alter serum urea concentrations (Fig. 7A), creatinine (Fig. 7B), AST (Fig. 7C), ALT (Fig. 7D), and gastric MPO activity (Fig. 7E) when compared to the control. On the other hand, the positive stimulation controls did induce such markers of tissue injury/toxicity (Fig. 7).



1653

1654

1655

1656

1657

1658

1659

1660

1661

1662

1663

1664

1665

1666

1667

**Fig. 7.** Treatment with AT-RvD1 doesn't induce kidney, hepatic, and gastric damage. Effect of treatment with AT-RvD1 (3ng/mouse i.p.), administered 30 min before the i.a. stimulus with MSU (100µg/10 µL sal/cavity), diclofenac (200mg/kg, p.o., diluted in saline) administered only once, or acetaminophen (650 mg/kg, i.p., diluted in saline, 200 mg/mL), or indomethacin (2.5 mg/kg, i.p., diluted in TRIS/HCL buffer). Serum levels of urea (A), creatinine (B), AST (C), ALT (D), and MPO activity in the stomach (E) were determined. The results are presented as mean ± SEM of 6 animals per group. \*p<0.05 compared to the saline group; #p<0.05 compared to the MSU group. (One-way Anova and Tukey's t test).

#### 4. Discussion

The main purpose of pharmacological treatments of the most diverse classes of arthritis is to attenuate the inflammatory and painful process existing in the joints and periarticular tissues. In this study, the analgesic, antioxidant, and anti-inflammatory effects of AT-RvD1 were evaluated in the murine model of gout arthritis

1668 induced by monosodium urate crystals (MSU). We observed for the first time, to our knowledge, that AT-RvD1  
1669 effectively reduces gouty arthritis pain, joint edema, and leukocyte recruitment. Mechanistically, AT-RvD1 acts  
1670 by reducing cytokine production and oxidative stress, which are linked to the reduction of NF- $\kappa$ B activation in  
1671 CD11b<sup>+</sup> cells.

1672 In the first experiments, the best dose and time of pre-treatments were determined from the response of the  
1673 animal to the mechanical stimulus. The selected dose (3ng/mouse) was used to widen the study of AT-RvD1  
1674 activities and search for potential mechanisms. The analgesic effect of AT-RvD1 treatment in gouty arthritis was  
1675 observed by a reduction of hypersensitivity to mechanical and thermal stimulation. The analgesia concurred with  
1676 anti-inflammatory effects as observed by a reduction of knee joint edema and recruitment of mononuclear cells  
1677 (tissue-resident macrophages) and neutrophils to the synovial fluid. Both cell types contribute to the mechanism  
1678 of pathogenesis in acute gout [48]. Leukocytes actively contribute to the gout disease by releasing varied mediators  
1679 including proteolytic enzymes, pro-inflammatory cytokines (e.g., TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ), and ROS, which contribute to  
1680 cartilage and bone degradation and joint damage [7,16,49,50]. In summary, our data demonstrate that AT-RvD1,  
1681 is responsible for reducing recruitment and leukocyte infiltration (shown in the total and differential cell count  
1682 data [ex: neutrophils], and histological images), corroborating with previous studies [52] and, consequently  
1683 reducing synovitis and edema formation.

1684 Abdelmoaty et al., showed that the treatment with AT-RvD1 via intrathecal (cerebrospinal fluid) reduces  
1685 carrageenan-induced mechanical hypersensitivity in a dose-dependent manner. Accordingly, AT-RvD1, which  
1686 have been identified as FPR2/ALX ligands, plays important roles in the regulation of spinal sensitization and pain  
1687 processing at least partly through interference with cytokine (TNF- $\alpha$ ) release [53]. Other studies have shown that  
1688 systemically or intradermally administration of AT-RvD1 reduces Complete Freund's Adjuvant (CFA)-induced  
1689 inflammatory pain, adjuvant-induced, and capsaicin-induced hyperalgesia in rat [54]. These findings corroborate  
1690 with the obtained results, once AT-RvD1 attenuates mechanical hyperalgesia also in the gout model.

1691 It is known that the release of several pro-inflammatory mediators, such as prostaglandin E2 and cytokines  
1692 such as IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and IL-6 occurs after a peripheral inflammatory stimulus, which in turn promotes  
1693 sensitization of the nociceptor and the attenuation of the nociceptive threshold [55–57], producing increased  
1694 sensitivity to painful stimuli [58]. Thus, the reduction in mechanical hyperalgesia observed right after the  
1695 administration of AT-RvD1 may be the result of an indirect modulation of nociceptor sensitization, since the  
1696 precursor could attenuate the onset of inflammation and, consequently, the release of pro-inflammatory mediators,  
1697 decreasing the sensitization of afferent fibers.

1698 Pro-inflammatory cytokines present an essential role in gout [7]. AT-RvD1 inhibited MSU-induced pro-  
1699 inflammatory cytokine production (IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , and IL-6). These cytokines induce pain, edema, oxidative stress  
1700 (NADPH oxidase, superoxide anion, NO), and leukocyte (neutrophils) recruitment [59,60]. Spinal 1 AT-RvD1  
1701 reduced TNF, IL-1 $\beta$ , and IL-6 mRNA and protein levels in the DRG in a neuropathic pain model [61] and the  
1702 spinal cord in a model of bone cancer-induced pain [62]. Furthermore, systemic post-treatment of AT-RvD1  
1703 decreased the levels of TNF and IL-1 $\beta$  in the rat hind paw in the CFA model [54].

1704 Oxidative stress contributes to the development and maintenance of both peripheral and central sensitization  
1705 [63], and also plays an important role in the development of inflammatory pain. Reactive oxygen and nitrogen  
1706 species produced in the inflammation site, contribute to the manifestation of pain [64–66] as well as induce the  
1707 production of hyperalgesia mediators by activating MAP kinases, PI3K and, NF- $\kappa$ B [67]. In this sense, several

1708 studies have demonstrated the relationship between the reduction of oxidative stress and antinociceptive effects  
1709 [68,69]. When the superoxide anion and its derivatives are produced during inflammation and released in quantities  
1710 beyond what the antioxidant defenses can fight, the imbalance generated leads to the depletion of reduced  
1711 glutathione (GSH) levels promoting the oxidation of cysteine, which results in oxidative stress-induced lesioning  
1712 of tissues [22]. Moreover, ROS also mediates neutrophil recruitment [70] via ROS-dependent glutathionylation of  
1713 neutrophils' actin [71]. In turn, neutrophils produce ROS upon recognition of MSU crystals [72]. Hither, we show  
1714 that AT-RvD1 reduced lipid peroxidation in the joint tissue by the TBARs test and restore the levels of glutathione  
1715 (GSH), confirming its antioxidant effects in the MSU-induced gouty arthritis model.

1716 Importantly, RvD1 and AT-RvD1 share some receptors for their actions, both SPMs bind to known G-protein  
1717 coupled receptors (GPCR), GPR32 (G protein-coupled receptor 32), and ALX/ FPR2: N-formyl peptide receptor  
1718 2 [73], utilizing Gi and possibly Gq as signal transductions [74]. Both receptors are expressed in human  
1719 neutrophils, monocytes, and macrophages, however, GPR32 is not yet identified in rodent tissue [53]. In addition  
1720 to acting on FPR2/ALX and GPR32, recent data points to the antinociceptive actions of resolvins also being  
1721 mediated through several different transient receptor potential (TRP) channels. RvD1 suppresses TRPA1, TRPV1  
1722 and TRPV4 mediated activity in primary afferents [75–77]. Besides, AT-RvD1 suppresses TRPV3 (Transient  
1723 receptor potential cation channel subfamily V member 3) mediated activity in keratinocytes, leading to analgesia  
1724 [76], once that activation of the peripheral ion channel TRPV3 contributes to the sensation of pain thermal and  
1725 chemical [78–80]. With this in mind, the thermal hyperalgesia induced by MSU was evaluated and its reduction  
1726 was observed after treatment with a lipid mediator.

1727 NF- $\kappa$ B and NLRP3 inflammasome signaling pathways have pivotal roles in gout [81]. The activation of the  
1728 transcription factor NF- $\kappa$ B increases the expression of cytokines and enzymes that produce ROS [81–83].  
1729 Cytokines and ROS, in turn, further activate NF- $\kappa$ B, and this reciprocal circle amplifies the inflammatory response  
1730 [84]. Activation of NF- $\kappa$ B also induces the expression of the components of the NLRP3 inflammasome (NLRP3,  
1731 ASC, pro-caspase-1, and pro-IL-1 $\beta$ ) [85,86]. The present data support the potential of AT-RvD1 to inhibit  
1732 inflammation and pain in an animal model of gout arthritis by blocking NF- $\kappa$ B activation without directly affecting  
1733 inflammasome machinery. Other results showed a significant decrease of NF- $\kappa$ B mRNA expression and protein  
1734 activation in animals treated with AT-RvD1 compared with dextran sulfate sodium (DSS)-treated animals. These  
1735 data suggest that the reduction of NF- $\kappa$ B activation by the DHA-derived mediators could suppress the expression  
1736 of adhesion molecules and indirectly reduce PMN infiltration of intestinal mucosa during experimental colitis [87].

1737 Current pharmacological therapies used in gouty arthritis include the control of hyperuricemia and the  
1738 treatment of inflammation. Allopurinol is the main medicine used to control uric acid blood levels. Non-steroidal  
1739 anti-inflammatory drugs (NSAIDs), alkaloids (colchicine), and biological agents targeting IL-1 $\beta$  signaling.  
1740 NSAIDs, such as indomethacin and naproxen are generally used as first-line therapies for acute gout, however,  
1741 these medicines may have numerous adverse effects such as gastrointestinal toxicity, renal toxicity, or  
1742 gastrointestinal bleeding [87]. In patients with contraindications or who cannot tolerate NSAIDs or corticosteroids,  
1743 oral colchicine is frequently the next choice for primary therapy. Colchicine is a potentially toxic drug that also  
1744 can result in gastrointestinal effects and bone marrow suppression [88]. In terms of biological agents, for instance,  
1745 IL-1 receptor antagonists (IL-1ra) known as Anakinra and uricase are very expensive and have limited application  
1746 [89]. Therefore, AT-RvD1 presents benefits compared to current therapies used to treat gout arthritis, since it  
1747 presents analgesic and anti-inflammatory properties and did not cause gastric, hepatic, or renal toxicity in the dose

1748 tested.

1749 In the present study, we demonstrated that AT-RvD1 promotes improvement in inflammatory pain, edema,  
1750 and leukocyte recruitment in a murine model of gouty arthritis induced by MSU crystals. The underlying  
1751 mechanisms of AT-RvD1 depend on inhibition of oxidative stress and cytokine production, which is directly  
1752 related to the diminished recruitment of CD11b<sup>+</sup> cells, and reduced detection of activated NF- $\kappa$ B in the knee joint  
1753 synovial fluid of gouty arthritis mouse. Furthermore, our data elucidate that AT-RvD1 has a safe profile in terms  
1754 of gastric, hepatic, or renal toxicity when compared to NSAIDs and therefore can be considered as a novel  
1755 therapeutic candidate for the treatment of gouty arthritis.

1756

## 1757 **5. Conclusion**

1758 The present study shows that the lipidic mediator AT-Resolvin D1 possesses analgesic and anti-inflammatory  
1759 properties in MSU-induced gouty arthritis in mice. The mechanisms of action of AT-RvD1 were attributed to the  
1760 decrease of (a) leucocyte recruitment to the synovial cavity and synovitis; (b) proinflammatory/hyperalgesic  
1761 cytokines; and inhibition of (c) oxidative stress; (d) NF- $\kappa$ B activation in CD11b<sup>+</sup> cells. Given the fact that AT-  
1762 RvD1 is safe in experimental settings using in vivo and in vitro assays [12,52,54], it could be added as a possible  
1763 candidate to control inflammatory gout pain.

1764

## 1765 **Conflicts or Interests**

1766 All the authors declare that they have no competing interests.

1767

## 1768 **Authors contributions**

1769 K.C.A., T.H.Z., T.S.S., M.F.M., A.F., A.P.L.P., and A.C.R. performed experiments. K.C.A., T.H.Z., T.S.S.,  
1770 M.F.M., A.F., A.P.L.P., A.C.R., R.C., and W.A.V.J. analyzed and interpreted data. R.C. and W.A.V.J. were  
1771 responsible for the conception and design of the study. K.C.A., T.H.Z., T.S.S., M.F.M., A.F., A.P.L.P., and A.C.R.  
1772 organized the database. R.C. and W.A.V.J. provided research mentorship, supervision, received grants and  
1773 provided essential reagents. K.C.A., R.C. and W.A.V.J. wrote the manuscript. All authors contributed to  
1774 manuscript revision, read and approved the final version. All authors have read and agreed to the published version  
1775 of the manuscript.

1776

## 1777 **Acknowledgments**

1778 K.C.A., T.H.Z., T.S.S., M.F.M., A.F., and A.P.L.P. acknowledge Masters and PhD scholarship from CAPES  
1779 (finance code 001). A.C.R. received CNPq and CAPES post-doc fellowships at different periods. R.C. and  
1780 W.A.V.J. thank the Research Fellowship from CNPq. Authors also acknowledge the PPSUS grant funded by  
1781 Decit/SCTIE/MS intermediated by CNPq with support of Fundação Araucária and SESA-PR (agreement  
1782 041/2017); and PRONEX grant (Programa de Apoio a Grupos de Excelência) supported by SETI/Fundação  
1783 Araucária and MCTI/CNPq, and Governo do Estado do Paraná (agreement 014/2017). We thank the facility  
1784 Laboratório de Análise de Materiais e Moléculas (LAMM) under the funding of FINEP (December 01, 0294.00  
1785 and 01.13.0049.00).

1786

- 1787 [1] A.T.G. Guerrero, W.A. Verri, T.M. Cunha, T.A. Silva, F.A.C. Rocha, S.H. Ferreira, F.Q. Cunha, C.A.  
1788 Parada, Hypernociception elicited by tibio-tarsal joint flexion in mice: A novel experimental arthritis  
1789 model for pharmacological screening, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 84 (2006) 244–251.  
1790 <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2006.05.008>.
- 1791 [2] W.J. Martin, J.L. Harper, Innate inflammation and resolution in acute gout, *Immunol. Cell Biol.* 88 (2010)  
1792 15–19. <https://doi.org/10.1038/icb.2009.89>.
- 1793 [3] F. Martinon, J. Tschopp, NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens, *Trends Immunol.* 26 (2005)  
1794 447–454. <https://doi.org/10.1016/j.it.2005.06.004>.
- 1795 [4] F. Rees, M. Hui, M. Doherty, Optimizing current treatment of gout, *Nat. Rev. Rheumatol.* 10 (2014) 271–  
1796 283. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2014.32>.
- 1797 [5] F. Martinon, L.H. Glimcher, Gout: New insights into an old disease, *J. Clin. Invest.* 116 (2006) 2073–  
1798 2075. <https://doi.org/10.1172/JCI29404>.
- 1799 [6] Y. Zhu, B.J. Pandya, H.K. Choi, Prevalence of gout and hyperuricemia in the US general population: The  
1800 National Health and Nutrition Examination Survey 2007–2008, *Arthritis Rheum.* 63 (2011) 3136–3141.  
1801 <https://doi.org/10.1002/art.30520>.
- 1802 [7] N. Busso, A. So, Mechanisms of inflammation in gout, *Arthritis Res. Ther.* 12 (2010) 1090–1096.  
1803 <https://doi.org/10.1186/ar2952>.
- 1804 [8] A.E. Hak, H.K. Choi, Lifestyle and gout, *Curr. Opin. Rheumatol.* 20 (2008) 179–186.  
1805 <https://doi.org/10.1097/BOR.0b013e3282f524a2>.
- 1806 [9] K.G. Saag, H. Choi, Epidemiology, risk factors, and lifestyle modifications for gout, *Arthritis Res. Ther.*  
1807 8 (2006). <https://doi.org/10.1186/ar1907>.
- 1808 [10] K.G. Saag, T.R. Mikuls, Recent advances in the epidemiology of gout., *Curr. Rheumatol. Rep.* 7 (2005)  
1809 235–241. <https://doi.org/10.1007/s11926-996-0045-z>.
- 1810 [11] F. Martinon, V. Pétrilli, A. Mayor, A. Tardivel, J. Tschopp, Gout-associated uric acid crystals activate the  
1811 NALP3 inflammasome, *Nature.* 440 (2006) 237–241. <https://doi.org/10.1038/nature04516>.
- 1812 [12] L.D. Tavares, I. Galvão, V. V. Costa, N. V. Batista, L.C.R. Rossi, C.B. Brito, A.C. Reis, C.M. Queiroz-  
1813 Junior, A.D. Braga, F.M. Coelho, A.C. Dias, D.S. Zamboni, V. Pinho, M.M. Teixeira, F.A. Amaral, D.G.  
1814 Souza, Phosphoinositide-3 kinase gamma regulates caspase-1 activation and leukocyte recruitment in  
1815 acute murine gout, *J. Leukoc. Biol.* 106 (2019) 619–629. <https://doi.org/10.1002/JLB.MA1118-470RR>.
- 1816 [13] V. Fattori, F.A. Amaral, W.A.V. Jr, perspectives, *Pharmacol. Res.* (2016) 1–15.  
1817 <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.01.027>.
- 1818 [14] M.F. Manchope, C. Calixto-Campos, L. Coelho-Silva, A.C. Zarpelon, F.A. Pinho-Ribeiro, S.R. Georgetti,  
1819 M.M. Baracat, R. Casagrande, W.A. Verri, Naringenin inhibits superoxide anion-induced inflammatory  
1820 pain: Role of oxidative stress, cytokines, Nrf-2 and the no-cGMP-PKG-KATP channel signaling pathway,  
1821 *PLoS One.* 11 (2016). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153015>.
- 1822 [15] O. Popa-Nita, E. Rollet-Labelle, N. Thibault, C. Gilbert, S.G. Bourgoin, P.H. Naccache, Crystal-induced  
1823 neutrophil activation. IX. Syk-dependent activation of class Ia phosphatidylinositol 3-kinase, *J. Leukoc.*  
1824 *Biol.* 82 (2007) 763–773. <https://doi.org/10.1189/jlb.0307174>.
- 1825 [16] Y. Zamudio-Cuevas, C. Hernández-Díaz, C. Pineda, A.M. Reginato, J.F. Cerna-Cortés, L. Ventura-Ríos,  
1826 A. López-Reyes, Molecular basis of oxidative stress in gouty arthropathy, *Clin. Rheumatol.* 34 (2015)

- 1827 1667–1672. <https://doi.org/10.1007/s10067-015-2933-y>.
- 1828 [17] M.F. Manchope, C. Calixto-campos, L. Coelho-silva, A.C. Zarpelon, F.A. Pinho-ribeiro, S.R. Georgetti,  
1829 M.M. Baracat, R. Casagrande, W.A. Verri, Naringenin Inhibits Superoxide Anion- Induced Inflammatory  
1830 Pain : Role of Oxidative Stress , Cytokines , Nrf-2 and the NO – cGMP – PKG – K ATP Channel Signaling  
1831 Pathway, (2016) 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153015>.
- 1832 [18] K. Schroder, J. Tschopp, The Inflammasomes, *Cell*. 140 (2010) 821–832.  
1833 <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.040>.
- 1834 [19] F.A. Amaral, V. V. Costa, L.D. Tavares, D. Sachs, F.M. Coelho, C.T. Fagundes, F.M. Soriani, T.N.  
1835 Silveira, L.D. Cunha, D.S. Zamboni, V. Quesniaux, R.S. Peres, T.M. Cunha, F.Q. Cunha, B. Ryffel, D.G.  
1836 Souza, M.M. Teixeira, NLRP3 inflammasome-mediated neutrophil recruitment and hypernociception  
1837 depend on leukotriene B4 in a murine model of gout, *Arthritis Rheum.* 64 (2012) 474–484.  
1838 <https://doi.org/10.1002/art.33355>.
- 1839 [20] W.A. Verri, T.M. Cunha, C.A. Parada, X.Q. Wei, S.H. Ferreira, F.Y. Liew, F.Q. Cunha, IL-15 mediates  
1840 immune inflammatory hypernociception by triggering a sequential release of IFN- $\gamma$ , endothelin, and  
1841 prostaglandin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (2006) 9721–9725.  
1842 <https://doi.org/10.1073/pnas.0603286103>.
- 1843 [21] A.C. Zarpelon, F.C. Rodrigues, A.H. Lopes, G.R. Souza, T.T. Carvalho, L.G. Pinto, D. Xu, S.H. Ferreira,  
1844 J.C. Alves-filho, I.B. Mcinnes, B. Ryffel, F.J. Quesniaux, F. Reverchon, T.M. Cunha, W.A. Verri, Spinal  
1845 cord oligodendrocyte-derived alarmin IL-33 mediates neuropathic pain, 38 (2015).  
1846 <https://doi.org/10.1096/fj.14-267146>.
- 1847 [22] F. Martinon, Signaling by ROS drives inflammasome activation, *Eur. J. Immunol.* 40 (2010) 616–619.  
1848 <https://doi.org/10.1002/eji.200940168>.
- 1849 [23] C. N. Serhan, S. Krishnamoorthy, A. Recchiuti, N. Chiang, Novel Anti-Inflammatory-Pro-Resolving  
1850 Mediators and Their Receptors, *Curr. Top. Med. Chem.* 11 (2012) 629–647.  
1851 <https://doi.org/10.2174/1568026611109060629>.
- 1852 [24] C.N. Serhan, N. Chiang, J. Dalli, mediators in resolution, *Semin. Immunol.* (2015) 1–16.  
1853 <https://doi.org/10.1016/j.smim.2015.03.004>.
- 1854 [25] Z.Z. Xu, R.R. Ji, Resolvins are potent analgesics for arthritic pain, *Br. J. Pharmacol.* 164 (2011) 274–277.  
1855 <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01348.x>.
- 1856 [26] C.N. Serhan, J. Dalli, S. Karamnov, A. Choi, C. Park, Z. Xu, R. Ji, M. Zhu, N.A. Petasis, Macrophage  
1857 proresolving mediator maresin 1 stimulates tissue regeneration and controls pain, *FASEB J.* 26 (2012)  
1858 1755–1765. <https://doi.org/10.1096/fj.11-201442>.
- 1859 [27] M. Aursnes, J.E. Tungen, R.A. Colas, I. Vlasakov, J. Dalli, C.N. Serhan, T. V. Hansen, Synthesis of the  
1860 16S,17S-Epoxyprotectin Intermediate in the Biosynthesis of Protectins by Human Macrophages, *J. Nat.*  
1861 *Prod.* 78 (2015) 2924–2931. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00574>.
- 1862 [28] C.N. Serhan, S. Hong, K. Gronert, S.P. Colgan, P.R. Devchand, G. Mirick, R.L. Moussignac, Resolvins :  
1863 A Family of Bioactive Products of Omega-3 Fatty Acid Transformation Circuits Initiated by Aspirin  
1864 Treatment that Counter Proinflammation Signals, *J. Exp. Med.* 196 (2002) 1025–1037.  
1865 <https://doi.org/10.1084/jem.20020760>.
- 1866 [29] S. Hong, K. Gronert, P.R. Devchand, R.L. Moussignac, C.N. Serhan, Novel docosatrienes and 17S-

- 1867 resolvins generated from docosahexaenoic acid in murine brain, human blood, and glial cells: Autacoids  
 1868 in anti-inflammation, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 14677–14687. <https://doi.org/10.1074/jbc.M300218200>.
- 1869 [30] C. Sommer, F. Birklein, Fighting off pain with resolvins, *Nat. Publ. Gr.* 16 (2010) 518–520.  
 1870 <https://doi.org/10.1038/nm0510-518>.
- 1871 [31] C.N. Serhan, N. Chiang, J. Dalli, B.D. Levy, Lipid mediators in the resolution of inflammation, *Cold  
 1872 Spring Harb. Perspect. Biol.* 7 (2015). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016311>.
- 1873 [32] C.N. Serhan, A search for endogenous mechanisms of anti-inflammation uncovers novel chemical  
 1874 mediators: Missing links to resolution, *Histochem. Cell Biol.* 122 (2004) 305–321.  
 1875 <https://doi.org/10.1007/s00418-004-0695-8>.
- 1876 [33] C.N. Serhan, A. Jain, S. Marleau, C. Clish, A. Kantarci, B. Behbehani, S.P. Colgan, G.L. Stahl, A.  
 1877 Merched, N.A. Petasis, L. Chan, T.E. Van Dyke, Reduced Inflammation and Tissue Damage in Transgenic  
 1878 Rabbits Overexpressing 15-Lipoxygenase and Endogenous Anti-inflammatory Lipid Mediators, *J.  
 1879 Immunol.* 171 (2003) 6856–6865. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.12.6856>.
- 1880 [34] T.M. Cunha, W.A. Verri, G.G. Vivancos, I.F. Moreira, S. Reis, C.A. Parada, F.Q. Cunha, S.H. Ferreira,  
 1881 An electronic pressure-meter nociception paw test for mice, *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 37 (2004) 401–  
 1882 407. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2004000300018>.
- 1883 [35] S.H. Ferreira, B.B. Lorenzetti, F.M.A. Corrêa, Central and peripheral antialgesic action of aspirin-like  
 1884 drugs, *Eur. J. Pharmacol.* 53 (1978) 39–48. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(78\)90265-0](https://doi.org/10.1016/0014-2999(78)90265-0).
- 1885 [36] A.T.G. Guerrero, W.A. Verri, T.M. Cunha, T.A. Silva, F.A.C. Rocha, S.H. Ferreira, F.Q. Cunha, C.A.  
 1886 Parada, Hypernociception elicited by tibio-tarsal joint flexion in mice: A novel experimental arthritis  
 1887 model for pharmacological screening, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 84 (2006) 244–251.  
 1888 <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2006.05.008>.
- 1889 [37] L.G. Pinto, T.M. Cunha, S.M. Vieira, H.P. Lemos, W.A. Verri, F.Q. Cunha, S.H. Ferreira, IL-17 mediates  
 1890 articular hypernociception in antigen-induced arthritis in mice, *Pain.* 148 (2010) 247–256.  
 1891 <https://doi.org/10.1016/j.pain.2009.11.006>.
- 1892 [38] W.A. Verri, A.T.G. Guerrero, S.Y. Fukada, D.A. Valerio, T.M. Cunha, D. Xu, S.H. Ferreira, F.Y. Liew,  
 1893 F.Q. Cunha, IL-33 mediates antigen-induced cutaneous and articular hypernociception in mice, *Proc. Natl.  
 1894 Acad. Sci. U. S. A.* 105 (2008) 2723–2728. <https://doi.org/10.1073/pnas.0712116105>.
- 1895 [39] T.R. Lavich, R.S.B. Cordeiro, P.M.R. Silva, M.A. Martins, A novel hot-plate test sensitive to hyperalgesic  
 1896 stimuli and non-opioid analgesics, *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 38 (2005) 445–451.  
 1897 <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2005000300016>.
- 1898 [40] F. de P. Conte, C. Barja-Fidalgo, W.A. Verri, F.Q. Cunha, G.A. Rae, C. Penido, M. das G.M.O. Henriques,  
 1899 Endothelins modulate inflammatory reaction in zymosan-induced arthritis: participation of LTB<sub>4</sub>, TNF-  
 1900  $\alpha$ , and CXCL-1, *J. Leukoc. Biol.* 84 (2008) 652–660. <https://doi.org/10.1189/jlb.1207827>.
- 1901 [41] H.P. Lemos, R. Grespan, S.M. Vieira, T.M. Cunha, W.A. Verri, K.S.S. Fernandes, F.O. Souto, I.B.  
 1902 McInnes, S.H. Ferreira, F.Y. Liew, F.Q. Cunha, Prostaglandin mediates IL-23/IL-17-induced neutrophil  
 1903 migration in inflammation by inhibiting IL-12 and IFN $\gamma$  production, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106  
 1904 (2009) 5954–5959. <https://doi.org/10.1073/pnas.0812782106>.
- 1905 [42] T.M. Cunha, W.A. Verri, S.Y. Fukada, A.T.G. Guerrero, T. Santodomingo-Garzón, S. Poole, C.A. Parada,  
 1906 S.H. Ferreira, F.Q. Cunha, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  mediate inflammatory hypernociception in mice triggered by

- 1907 B1 but not B2 kinin receptor, *Eur. J. Pharmacol.* 573 (2007) 221–229.  
1908 <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.07.007>.
- 1909 [43] V. Fattori, K.G.G. Serafim, A.C. Zarpelon, S.M. Borghi, F.A. Pinho-Ribeiro, J.C. Alves-Filho, T.M.  
1910 Cunha, F.Q. Cunha, R. Casagrande, W.A. Verri, Differential regulation of oxidative stress and cytokine  
1911 production by endothelin ETA and ETB receptors in superoxide anion-induced inflammation and pain in  
1912 mice, *J. Drug Target.* 25 (2017) 264–274. <https://doi.org/10.1080/1061186X.2016.1245308>.
- 1913 [44] R.P. Guedes, L. Dal Bosco, C.M. Teixeira, A.S.R. Araújo, S. Llesuy, A. Belló-Klein, M.F.M. Ribeiro,  
1914 W.A. Partata, Neuropathic pain modifies antioxidant activity in rat spinal cord, *Neurochem. Res.* 31 (2006)  
1915 603–609. <https://doi.org/10.1007/s11064-006-9058-2>.
- 1916 [45] A.C. Zarpelon, T.M. Cunha, J.C. Alves-Filho, L.G. Pinto, S.H. Ferreira, I.B. McInnes, D. Xu, F.Y. Liew,  
1917 F.Q. Cunha, W.A. Verri, IL-33/ST2 signalling contributes to carrageenin-induced innate inflammation and  
1918 inflammatory pain: Role of cytokines, endothelin-1 and prostaglandin E 2, *Br. J. Pharmacol.* 169 (2013)  
1919 90–101. <https://doi.org/10.1111/bph.12110>.
- 1920 [46] K.W. Ruiz-Miyazawa, S.M. Borghi, F.A. Pinho-Ribeiro, L. Staurengo-Ferrari, V. Fattori, G.S.A.  
1921 Fernandes, A.M. Casella, J.C. Alves-Filho, T.M. Cunha, F.Q. Cunha, R. Casagrande, W.A. Verri, The  
1922 citrus flavanone naringenin reduces gout-induced joint pain and inflammation in mice by inhibiting the  
1923 activation of NFκB and macrophage release of IL-1β, *J. Funct. Foods.* 48 (2018) 106–116.  
1924 <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.06.025>.
- 1925 [47] R. Casagrande, S.R. Georgetti, W.A. Verri, D.J. Dorta, A.C. dos Santos, M.J.V. Fonseca, Protective effect  
1926 of topical formulations containing quercetin against UVB-induced oxidative stress in hairless mice, *J.*  
1927 *Photochem. Photobiol. B Biol.* 84 (2006) 21–27. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2006.01.006>.
- 1928 [48] R. Terkeltaub, S. Baird, P. Sears, R. Santiago, W. Boisvert, The murine homolog of the interleukin-8  
1929 receptor CXCR-2 is essential for the occurrence of neutrophilic inflammation in the air pouch model of  
1930 acute urate crystal-induced gouty synovitis, *Arthritis Rheum.* 41 (1998) 900–909.  
1931 [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(199805\)41:5<900::AID-ART18>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/1529-0131(199805)41:5<900::AID-ART18>3.0.CO;2-K).
- 1932 [49] H.L. Wright, R.J. Moots, S.W. Edwards, The multifactorial role of neutrophils in rheumatoid arthritis, *Nat.*  
1933 *Rev. Rheumatol.* 10 (2014) 593–601. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2014.80>.
- 1934 [50] K.W.R. Larissa, S.S.S. Mizokami, Q.Á. Nlrp, Á.I.Á. Cytokines, Quercetin inhibits gout arthritis in mice :  
1935 induction of an opioid-dependent regulation of inflammasome, (2017). [https://doi.org/10.1007/s10787-](https://doi.org/10.1007/s10787-017-0356-x)  
1936 [017-0356-x](https://doi.org/10.1007/s10787-017-0356-x).
- 1937 [51] K.W.R. Larissa, S.S.S.S. Mizokami, Q.Á. Nlrp, Á.I.Á. Cytokines, K.W. Ruiz-Miyazawa, L. Staurengo-  
1938 Ferrari, S.S.S.S. Mizokami, T.P. Domiciano, F.T.M.C. Vicentini, D. Camilios-Neto, W.R. Pavanelli, P.  
1939 Pinge-Filho, F.A. Amaral, M.M. Teixeira, R. Casagrande, W.A. Verri, K.W.R. Larissa, S.S.S.S.  
1940 Mizokami, Q.Á. Nlrp, Á.I.Á. Cytokines, Quercetin inhibits gout arthritis in mice : induction of an opioid-  
1941 dependent regulation of inflammasome, *Inflammopharmacology.* 25 (2017) 555–570.  
1942 <https://doi.org/10.1007/s10787-017-0356-x>.
- 1943 [52] A.F. Bento, R.F. Claudino, R.C. Dutra, R. Marcon, J.B. Calixto, Omega-3 Fatty Acid-Derived Mediators  
1944 17(R)-Hydroxy Docosahexaenoic Acid, Aspirin-Triggered Resolvin D1 and Resolvin D2 Prevent  
1945 Experimental Colitis in Mice, *J. Immunol.* 187 (2011) 1957–1969.  
1946 <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101305>.

- 1947 [53] S. Abdelmoaty, G. Wigerblad, D.B. Bas, S. Codeluppi, T. Fernandez-zafra, S. El-awady, Y. Moustafa,  
1948 A.E.S. Abdelhamid, E. Brodin, C.I. Svensson, Spinal Actions of Lipoxin A 4 and 17 ( R ) -Resolvin D1  
1949 Attenuate Inflammation-Induced Mechanical Hypersensitivity and Spinal TNF Release, 8 (2013) 1–13.  
1950 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075543>.
- 1951 [54] J.F. Lima-garcia, R.C. Dutra, K. Silva, E.M. Motta, The precursor of resolvin D series and aspirin-  
1952 triggered resolvin D1 display anti-hyperalgesic properties in adjuvant-induced arthritis in rats, 17 (2011).  
1953 <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01345.x>.
- 1954 [55] C.A.L. Kassuya, J. Ferreira, R.F. Claudino, J.B. Calixto, Intraplantar PGE 2 causes nociceptive behaviour  
1955 and mechanical allodynia: The role of prostanoid e receptors and protein kinases, *Br. J. Pharmacol.* 150  
1956 (2007) 727–737. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707149>.
- 1957 [56] F. Cervero, Chapter 24. Spinal cord mechanisms of hyperalgesia and allodynia: Role of peripheral input  
1958 from nociceptors, *Prog. Brain Res.* 113 (1996) 413–422. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(08\)61101-](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)61101-2)  
1959 [2](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)61101-2).
- 1960 [57] H.G. Schaible, B.D. Grubb, Afferent and spinal mechanisms of joint pain, *Pain.* 55 (1993) 5–54.  
1961 [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(93\)90183-P](https://doi.org/10.1016/0304-3959(93)90183-P).
- 1962 [58] A.M. Binshtok, H. Wang, K. Zimmermann, F. Amaya, D. Vardeh, L. Shi, G.J. Brenner, R.R. Ji, B.P. Bean,  
1963 C.J. Woolf, T.A. Samad, Nociceptors are interleukin-1 $\beta$  sensors, *J. Neurosci.* 28 (2008) 14062–14073.  
1964 <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3795-08.2008>.
- 1965 [59] M.F. Manchope, N.A. Artero, V. Fattori, S.S. Mizokami, D.L. Pitol, J.P.M. Issa, S.Y. Fukada, T.M. Cunha,  
1966 J.C. Alves-Filho, F.Q. Cunha, R. Casagrande, W.A. Verri, Naringenin mitigates titanium dioxide (TiO 2  
1967 )-induced chronic arthritis in mice: role of oxidative stress, cytokines, and NF $\kappa$ B, *Inflamm. Res.* 67 (2018)  
1968 997–1012. <https://doi.org/10.1007/s00011-018-1195-y>.
- 1969 [60] J.M. Zhang, J. An, Cytokines, inflammation, and pain, *Int. Anesthesiol. Clin.* 45 (2007) 27–37.  
1970 <https://doi.org/10.1097/AIA.0b013e318034194e>.
- 1971 [61] T. Sun, E. Yu, L. Yu, J. Luo, H. Li, Z. Fu, LipoxinA(4) induced antinociception and decreased expression  
1972 of NF- $\kappa$ B and pro-inflammatory cytokines after chronic dorsal root ganglia compression in rats., *Eur. J.*  
1973 *Pain.* 16 (2012) 18–27. <https://doi.org/10.1016/j.ejpain.2011.05.005>.
- 1974 [62] S. Hu, Q.L. Mao-Ying, J. Wang, Z.F. Wang, W.L. Mi, X.W. Wang, J.W. Jiang, Y.L. Huang, G.C. Wu,  
1975 Y.Q. Wang, Lipoxins and aspirin-triggered lipoxin alleviate bone cancer pain in association with  
1976 suppressing expression of spinal proinflammatory cytokines, *J. Neuroinflammation.* 9 (2012).  
1977 <https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-278>.
- 1978 [63] K. Janes, W.L. Neumann, D. Salvemini, Anti-superoxide and anti-peroxynitrite strategies in pain  
1979 suppression, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1822 (2012) 815–821.  
1980 <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.12.008>.
- 1981 [64] Z.Q. Wang, F. Porreca, S. Cuzzocrea, K. Galen, R. Lightfoot, E. Masini, C. Muscoli, V. Mollace, M.  
1982 Ndengele, H. Ischiropoulos, D. Salvemini, A newly identified role for superoxide in inflammatory pain, *J.*  
1983 *Pharmacol. Exp. Ther.* 309 (2004) 869–878. <https://doi.org/10.1124/jpet.103.064154>.
- 1984 [65] J.E. Keeble, J.V. Bodkin, L. Liang, R. Wodarski, M. Davies, E.S. Fernandes, C. de F. Coelho, F. Russell,  
1985 R. Graepel, M.N. Muscara, M. Malcangio, S.D. Brain, Hydrogen peroxide is a novel mediator of  
1986 inflammatory hyperalgesia, acting via transient receptor potential vanilloid 1-dependent and independent

- 1987 mechanisms, *Pain*. 141 (2009) 135–142. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2008.10.025>.
- 1988 [66] D. Salvemini, J.W. Little, T. Doyle, W.L. Neumann, Roles of reactive oxygen and nitrogen species in pain, *Free Radic. Biol. Med.* 51 (2011) 951–966. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.01.026>.
- 1989
- 1990 [67] L. Wang, Y.C. Tu, T.W. Lian, J.T. Hung, J.H. Yen, M.J. Wu, Distinctive antioxidant and antiinflammatory effects of flavonols, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 9798–9804. <https://doi.org/10.1021/jf0620719>.
- 1991
- 1992 [68] D.A. Valério, F.I. Ferreira, T.M. Cunha, J.C. Alves-Filho, F.O. Lima, J.R. De Oliveira, S.H. Ferreira, F.Q. Cunha, R.H. Queiroz, W.A. Verri, Fructose-1,6-bisphosphate reduces inflammatory pain-like behaviour in mice: Role of adenosine acting on A<sub>1</sub> receptors, *Br. J. Pharmacol.* 158 (2009) 558–568. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00325.x>.
- 1993
- 1994
- 1995
- 1996 [69] S.A. Navarro, K.G.G. Serafim, S.S. Mizokami, M.S.N. Hohmann, R. Casagrande, W.A. Verri, Analgesic activity of piracetam: Effect on cytokine production and oxidative stress, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 105 (2013) 183–192. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2013.02.018>.
- 1997
- 1998
- 1999 [70] H. Hattori, K.K. Subramanian, J. Sakai, Y. Jia, Y. Li, T.F. Porter, F. Loison, B. Sarraj, A. Kasorn, H. Jo, C. Blanchard, D. Zirkle, D. McDonald, S.Y. Pai, C.N. Serhan, H.R. Luo, Small-molecule screen identifies reactive oxygen species as key regulators of neutrophil chemotaxis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107 (2010) 3546–3551. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914351107>.
- 2000
- 2001
- 2002
- 2003 [71] J. Sakai, J. Li, K.K. Subramanian, S. Mondal, B. Bajrami, H. Hattori, Y. Jia, B.C. Dickinson, J. Zhong, K. Ye, C.J. Chang, Y.S. Ho, J. Zhou, H.R. Luo, Reactive Oxygen Species-Induced Actin Glutathionylation Controls Actin Dynamics in Neutrophils, *Immunity*. 37 (2012) 1037–1049. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.08.017>.
- 2004
- 2005
- 2006
- 2007 [72] P. Desaulniers, M. Fernandes, C. Gilbert, S.G. Bourgoïn, P.H. Naccache, Crystal-induced neutrophil activation. VII. Involvement of Syk in the responses to monosodium urate crystals, *J. Leukoc. Biol.* 70 (2001) 659–668. <https://doi.org/10.1189/jlb.70.4.659>.
- 2008
- 2009
- 2010 [73] S. Krishnamoorthy, A. Recchiuti, N. Chiang, G. Fredman, C.N. Serhan, Resolvin D1 receptor stereoselectivity and regulation of inflammation and proresolving MicroRNAs, *Am. J. Pathol.* 180 (2012) 2018–2027. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.01.028>.
- 2011
- 2012
- 2013 [74] N. Chiang, C.N. Serhan, S.E. Dahlén, J.M. Drazen, D.W.P. Hay, G. Enrico Rovati, T. Shimizu, T. Yokomizo, C. Brink, The lipoxin receptor ALX: Potent ligand-specific and stereoselective actions in vivo, *Pharmacol. Rev.* 58 (2006) 463–487. <https://doi.org/10.1124/pr.58.3.4>.
- 2014
- 2015
- 2016 [75] Z.Z. Xu, L. Zhang, T. Liu, J.Y. Park, T. Berta, R. Yang, C.N. Serhan, R.R. Ji, Resolvins RvE1 and RvD1 attenuate inflammatory pain via central and peripheral actions, *Nat. Med.* 16 (2010) 592–597. <https://doi.org/10.1038/nm.2123>.
- 2017
- 2018
- 2019 [76] S. Bang, S. Yoo, T.J. Yang, H. Cho, S.W. Hwang, 17 ( R ) -resolvin D1 specifically inhibits transient receptor potential ion channel vanilloid 3 leading to peripheral antinociception, (2012) 683–692. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01568.x>.
- 2020
- 2021
- 2022 [77] C.K. Park, Z.Z. Xu, T. Liu, N. Lü, C.N. Serhan, R.R. Ji, Resolvin D2 is a potent endogenous inhibitor for transient receptor potential subtype V1/A1, inflammatory pain, and spinal cord synaptic plasticity in mice: Distinct roles of resolvin D1, D2, and E1, *J. Neurosci.* 31 (2011) 18433–18438. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4192-11.2011>.
- 2023
- 2024
- 2025
- 2026 [78] A. Moqrich, S.W. Hwang, T.J. Earley, M.J. Petrus, A.N. Murray, K.S.R. Spencer, M. Andahazy, G.M.

- 2027 Story, A. Patapoutian, Impaired thermosensation in mice lacking TRPV3, a heat and camphor sensor in  
2028 the skin, *Science* (80-. ). 307 (2005) 1468–1472. <https://doi.org/10.1126/science.1108609>.
- 2029 [79] S.M. Huang, H. Lee, M.K. Chung, U. Park, Y.Y. Yin, H.B. Bradshaw, P.A. Coulombe, J.M. Walker, M.J.  
2030 Caterina, Overexpressed transient receptor potential vanilloid 3 ion channels in skin keratinocytes  
2031 modulate pain sensitivity via prostaglandin E2, *J. Neurosci.* 28 (2008) 13727–13737.  
2032 <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5741-07.2008>.
- 2033 [80] S. Bang, S. Yoo, T.J. Yang, H. Cho, S.W. Hwang, Farnesyl pyrophosphate is a novel pain-producing  
2034 molecule via specific activation of TRPV3, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 19362–19371.  
2035 <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.087742>.
- 2036 [81] M. Jaramillo, P.H. Naccache, M. Olivier, Monosodium Urate Crystals Synergize with IFN- $\gamma$  to Generate  
2037 Macrophage Nitric Oxide: Involvement of Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 and NF- $\kappa$ B, *J.*  
2038 *Immunol.* 172 (2004) 5734–5742. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.9.5734>.
- 2039 [82] F.A. Pinho-Ribeiro, M.S.N. Hohmann, S.M. Borghi, A.C. Zarpelon, C.F.S. Guazelli, M.F. Manchope, R.  
2040 Casagrande, W.A. Verri, Protective effects of the flavonoid hesperidin methyl chalcone in inflammation  
2041 and pain in mice: Role of TRPV1, oxidative stress, cytokines and NF- $\kappa$ B, *Chem. Biol. Interact.* 228 (2015)  
2042 88–99. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2015.01.011>.
- 2043 [83] E. Niederberger, G. Geisslinger, The IKK-NF- $\kappa$ B pathway: a source for novel molecular drug targets in  
2044 pain therapy?, *FASEB J.* 22 (2008) 3432–3442. <https://doi.org/10.1096/fj.08-109355>.
- 2045 [84] A. Bowie, L.A.J. O'Neill, Oxidative stress and nuclear factor- $\kappa$ B activation: A reassessment of the  
2046 evidence in the light of recent discoveries, in: *Biochem. Pharmacol.*, Elsevier Inc., 2000: pp. 13–23.  
2047 [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(99\)00296-8](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(99)00296-8).
- 2048 [85] F.G. Bauernfeind, G. Horvath, A. Stutz, E.S. Alnemri, K. MacDonald, D. Speert, T. Fernandes-Alnemri,  
2049 J. Wu, B.G. Monks, K.A. Fitzgerald, V. Hornung, E. Latz, Cutting Edge: NF- $\kappa$ B Activating Pattern  
2050 Recognition and Cytokine Receptors License NLRP3 Inflammasome Activation by Regulating NLRP3  
2051 Expression, *J. Immunol.* 183 (2009) 787–791. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901363>.
- 2052 [86] C. Dhanasekar, S. Kalaiselvan, M. Rasool, Morin , a Bioflavonoid Suppresses Monosodium Urate Crystal-  
2053 Induced Inflammatory Immune Response in RAW 264 . 7 Macrophages through the Inhibition of  
2054 Inflammatory Mediators , Intracellular ROS Levels and NF-  $\kappa$  B Activation, 7082 (2015).  
2055 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145093>.
- 2056 [87] T. Neogi, Clinical practice. Gout., *N. Engl. J. Med.* 364 (2011) 443–52.  
2057 <https://doi.org/10.1056/NEJMcp1001124>.
- 2058 [88] B.N. Cronstein, R. Terkeltaub, The inflammatory process of gout and its treatment, 7 (2006) 1–7.  
2059 <https://doi.org/10.1186/ar1908>.
- 2060 [89] A.J. Farrell, D.R. Blake, R.M.J. Palmer, S. Moncada, Increased concentrations of nitrite in synovial fluid  
2061 and serum samples suggest increased nitric oxide synthesis in rheumatic diseases, *Ann. Rheum. Dis.* 51  
2062 (1992) 1219–1222. <https://doi.org/10.1136/ard.51.11.1219>.
- 2063
- 2064

## 2065 5 CONCLUSÃO

2066 Neste estudo, demonstramos que a 17(R)-RvD1 promove melhora na dor  
2067 inflamatória induzida por zimosan e MSU. No modelo de artrite induzida por zimosan, a 17(R)-  
2068 RvD1 reduziu os quadros de hiperalgesia mecânica (dose-dependente) e térmica, distribuição  
2069 de peso entre as patas dos animais, formação de edema articular, recrutamento leucocitário  
2070 e produção periférica de citocinas pró-inflamatórias.

2071 No modelo de artrite induzida por cristais de urato monossódico, a 17(R)-RvD1  
2072 reduziu os quadros de hiperalgesia mecânica (dose e tempo-dependentes) e térmica,  
2073 formação de edema articular, recrutamento leucocitário, produção periférica de citocinas pró-  
2074 inflamatórias, níveis de parâmetros de estresse oxidativo, ativação do NF- $\kappa$ B, sem provocar  
2075 toxicidade em um modelo experimental murino.

2076 Dados na literatura demonstram a eficácia de ácidos graxos do ômega-3  
2077 (PUFAs) em doenças reumáticas (FATTORI et al., 2016), e com o fato de apresentarem  
2078 eficácia terapêutica em picogramas, é possível que os mediadores lipídicos isolados, como a  
2079 17(R)-RvD1, possam ser uma nova possibilidade na gestão de crises de artrite reumatoide e  
2080 gotosa, visando a melhora da qualidade de vida de pacientes.

2081

2082

2083

2084

2085

2086

2087

2088

2089

2090

2091

2092

2093

2094

2095

2096

2097

2098 **REFERÊNCIAS**

- 2099                   ABBAS, A. K., LICHTMAN, A. H., PILLAI, S. *Imunologia celular e*  
2100 *molecular*. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.
- 2101                   ABDELMOATTY, S., et al. Spinal actions of Lipoxin A 4 and 17 (R)-  
2102 Resolvin D1 attenuate inflammation-induced mechanical hypersensitivity and spinal  
2103 TNF release. *PLoS ONE*, v. 8, n. 9, e75543, 2013.
- 2104                   AKIRA S., TAKEDA K. Toll-like receptor signaling. *Nature Reviews*  
2105 *Immunology*, v. 4, p. 499-511, 2004.
- 2106                   AMARAL, F. A., et al. NLRP3 inflammasome-mediated neutrophil  
2107 recruitment and hypernociception depend on leukotriene B(4) in a murine model of  
2108 gout. *Arthritis Rheum.*, v. 64, n. 2, p. 474-84, fev 2012.
- 2109                   AN, L. L., et al. Complement C5a potentiates uric acid crystal-induced  
2110 IL-1beta production. *Eur J Immunol.*, v. 44, n. 12, p. 3669-79, dez 2014.
- 2111                   ARROMDEE, E., et al. Epidemiology of gout: is the incidence rising?  
2112 *J Rheumatol.*, v. 29, p. 2403-6, 2002.
- 2113                   ASQUITH, D. L., et al. Animal models of rheumatoid arthritis. *Eur J*  
2114 *Immunol.*, v. 39, p. 2040-2044, 2009.
- 2115                   AURSNES, M., et al. Synthesis of the 16S,17S-epoxyprotectin  
2116 intermediate in the biosynthesis of protectins by human macrophages. *J Nat Prod.*, v.  
2117 78, n. 12, p. 2924-31, dez 2015.
- 2118                   BACK, M., et al. Update on leukotriene, lipoxin and oxoeicosanoid  
2119 receptors: IUPHAR Review 7. *Br J Pharmacol.*, v.171, p. 3551-74, 2014.
- 2120                   BANG, S., et al. 17 (R)-resolvin D1 specifically inhibits transient  
2121 receptor potential ion channel vanilloid 3 leading to peripheral antinociception. *Br J*  
2122 *Pharmacol.*, v. 165, p. 683-692, 2012.
- 2123                   BANG, S., et al. Farnesyl pyrophosphate is a novel pain-producing  
2124 molecule via specific activation of TRPV3. *J Biol Chem.*, v. 285, p. 19362-19371,  
2125 2010a.
- 2126                   BANNENBERG, G. L., et al. Molecular circuits of resolution: formation  
2127 and actions of resolvins and protectins. *J Immunol.*, v. 174, p. 4345-4355, 2005.
- 2128                   BEDBROOK, G. M. Injuries of the Thoracolumbar Spine with  
2129 Neurological Symptoms, em: VINKEN P. J., BRUYN G. W. - *Handbook of Clinical*  
2130 *Neurology Amsterdam*. 25th ed., North-Holland, p. 437- 466, 1976.

- 2131 BENTO, A. F., et al. Omega-3 fatty acid-derived mediators 17(R)-  
2132 hydroxy docosahexaenoic acid, aspirin-triggered resolvin D1 and resolvin D2 prevent  
2133 experimental colitis in mice. *J Immunol.*, v. 187, p. 1957-1969, 2011.
- 2134 BESSON, P., PERL, E. R. Responses of cutaneous sensory units with  
2135 unmyelinated fibers to noxious stimuli. *J Neurophysiol.*, v. 32, n. 6, p. 1025-1043, 1969.
- 2136 BEUKELMAN, T., et al. Arthritis by the numbers-book of trusted facts  
2137 & figures, 1.2. Arthritis Foundation. 2017.
- 2138 BINSHTOK, A. M., et al. Nociceptors are interleukin-1b sensors. *J*  
2139 *Neurosci.*, v. 28, p. 14062-14073, 2008.
- 2140 BORGHI, S. M., et al. *J Nat Prod.*, v. 76, p.1141-1149, 2013.
- 2141 BOTTARO, D., et al. Serotonin, norepinephrine, and histamine  
2142 mediation of endothelial cell barrier function in vitro. *J. of Cellular Physiology*, v. 128,  
2143 n. 2, p. 189-194, ago 1986.
- 2144 BRADLEY, P. P., et al. Measurement of cutaneous inflammation:  
2145 estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol.*, v. 78, p.  
2146 206-9, 1982.
- 2147 BRAZ, J., et al. Transmitting pain and itch messages: a contemporary  
2148 view of the spinal cord circuits that generate gate control. *Neuron.*, v. 82, n. 3, p. 522-  
2149 36, mai 2014.
- 2150 BROZ, P., Dixit, V. M. Inflammasomes: mechanism of assembly,  
2151 regulation and signalling. *Nat Rev Immunol.*, v. 16, p.407-420, 2016.
- 2152 BUCKLEY, C. D., GILROY, D. W., SERHAN, C. N. Pro-resolving lipid  
2153 mediators and mechanisms in the resolution of acute inflammation. *Immunity*, v.40,  
2154 n.3, p. 315-27, mar 2014.
- 2155 BURNS, K., MARTINON, F., TSCHOPP, J. New insights into the  
2156 mechanism of IL-1beta maturation. *Curr Opin Immunol.*, v. 15, n. 1, p. 26-30, fev 2003.
- 2157 BUSHNELL, M. C., CEKO, M., LOW, L. A. Cognitive and emotional  
2158 control of pain and its disruption in chronic pain. *Nat Rev Neurosci.*, v. 14, n. 7, p. 502-  
2159 11, jul 2013.
- 2160 CALATI, R., et al. The impact of physical pain on suicidal thoughts and  
2161 behaviors: Meta-analyses. *J Psychiatr Res.*, v. 71, p. 16-32, dez 2015.
- 2162 CAMPBELL, J. N., et al - Peripheral Neural Mechanisms of  
2163 Nociception, em: Wall PD, Melzack R - Textbook of Pain. Edimburgh, Scotland,  
2164 Churchill Livingstone, p. 22-45, 1989.

- 2165 CASAGRANDE, R., et al. Protective effect of topical formulations  
2166 containing quercetin against UVB- induced oxidative stress in hairless mice. J  
2167 Photochem Photobiol B., v. 84, p. 21-7, 2006.
- 2168 CHIANG, N., et al. Infection regulates pro-resolving mediators that  
2169 lower antibiotic requirements. Nature, v. 484, p. 524–528, 2012.
- 2170 CHIANG, N., et al. The lipoxin receptor ALX: potent ligand-specific and  
2171 stereoselective actions in vivo. Pharmacol Rev., v. 58, p.463-87, 2006.
- 2172 CHOI, H. K., MOUNT, D. B., REGINATO, A. M. Pathogenesis of gout.  
2173 Ann Intern Med., v.143, n. 7, p.499-516, 2005.
- 2174 CODERRE, T. J. Spinal cord mechanisms of hyperalgesia and  
2175 allodynia. In: Basbaum AI, Bushnell MC (eds). Science of Pain Academic Press: San  
2176 Diego, p. 339-380, 2009.
- 2177 CONTE, F. D. E. P., et al. Endothelins modulate inflammatory reaction  
2178 in zymosan-induced arthritis: participation of LTB<sub>4</sub>, TNF- $\alpha$ , and CXCL-1. J Leukoc  
2179 Biol., v. 84, n. 3, p. 652-60, set 2008.
- 2180 CONTE, F. P., et al. Endothelins modulate inflammatory reaction in  
2181 zymosan-induced arthritis: participation of LTB<sub>4</sub>, TNF- $\alpha$ , and CXCL-1, J. Leukoc.  
2182 Biol., v. 84, p.652-660, 2008.
- 2183 COTRAN, R. S., KUMAR, V., COLLINS, T. Bases patológicas da  
2184 doença de Robbins. WB Saunders: Filadélfia, 1999.
- 2185 CRONSTEIN, B. N., TERKELTAUB, R. The inflammatory process of  
2186 gout and its treatment. Arthritis Res Ther, v.8, p.1-7 abr 2006.
- 2187 CROSS, M et al. The global burden of rheumatoid arthritis: estimates  
2188 from the global burden of disease 2010 study. Ann Rheum Dis., v. 73, p. 1316-1322,  
2189 2014.
- 2190 CUNHA, F. Q., et al. The pivotal role of tumour necrosis factor alpha  
2191 in the development of inflammatory hyperalgesia. Br. J. Pharmacol., v. 107, n. 3, p.  
2192 660-664, 1992.
- 2193 CUNHA, T. M. et al. Crucial role of neutrophils in the development of  
2194 mechanical inflammatory hypernociception. J Leukoc Biol., v. 83, n. 4, p. 824-32, abr  
2195 2008.
- 2196 CUNHA, T. M., et al. A cascade of cytokines mediates mechanical  
2197 inflammatory hypernociception in mice. PNAS, v. 102, n. 5, p. 1755-60, fev. 2005.
- 2198 CUNHA, T. M., et al. An electronic pressure-meter nociception paw

- 2199 test for mice. *Braz J Med Biol Res.*, v. 37, n. 3, p. 401-7, mar 2004.
- 2200 DALBETH, N., HASKARD, D. O. Mechanisms of inflammation in gout.
- 2201 *Rheumatology (oxford)*, v. 44, n. 9, p. 1090-6, set 2005.
- 2202 DALBETH, N., MERRIMAN, T. R., STAMP, L. K. Gout. *Lancet*, v. 388,
- 2203 p. 2039-2052, 2016.
- 2204 DANESE, S., et al. Adhesion molecules in inflammatory bowel
- 2205 disease: therapeutic implications for gout inflammation. *Dig Liver Dis.*, v. 37, p. 811-
- 2206 818, 2005.
- 2207 DE SOUZA, M. R., et al. Pharmacological basis for use of
- 2208 *Lychnophora trichocarpa* in gouty arthritis: anti-hyperuricemic and anti-inflammatory
- 2209 effects of its extract, fraction and constituents. *J Ethnopharmacol*, v.142, n.3, p. 845-
- 2210 850, ago 2012.
- 2211 DESAI, J., et al. PMA and crystal-induced neutrophil extracellular trap
- 2212 formation involves RIPK1–RIPK3– MLKL signaling. *Eur J Immunol.*, v. 46, p. 223-229,
- 2213 2016.
- 2214 DIMTRIEVA, N., SWESS, G., SHIRLEY, R. Resolvins RVD1 and
- 2215 17(R)-RVD1 alleviate signs of inflammation in a rat model of endometriosis. *Fertil*
- 2216 *Steril.*, v. 102, n. 4, p.1191-6, out 2014.
- 2217 DMITRIEVA, N., et al. Resolvins RvD1 and 17(R)-RvD1 alleviate signs
- 2218 of inflammation in a rat model of endometriosis. *Fertil Steril.*, v. 102, n. 4, p. 1191,
- 2219 2014.
- 2220 DUBCHAK, N., FALASCA, G. F. New and improved strategies for the
- 2221 treatment of gout. *Int J Nephrol Renovasc Dis.*, v.3, p. 145-166, nov 2010.
- 2222 DUEWELL, P., et al. NLRP3 inflammasomes are required for
- 2223 atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature*, v. 464, n. 7293, p. 1357-
- 2224 61, abr 2010.
- 2225 DUFFIELD, J. S., et al. Resolvin D series and protectin d1 mitigate
- 2226 acute kidney injury. *J Immunol.*, v.177, n. 9, p. 5902-5911, nov 2006.
- 2227 ESSANI, N. A., et al. Cytokine-induced up regulation of hepatic
- 2228 intercellular adhesion molecule-1 messenger RNA expression and its role in the
- 2229 pathophysiology of murine endotoxin shock and acute liver failure. *Hepatology*, v. 21:
- 2230 p. 1632-1639, 1995.
- 2231 FARKOUH, M. E., GREENBERG, B. P. An evidence-based review of
- 2232 the cardiovascular risks of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am J Cardiol.*, v. 103,

- 2233 p. 9, 1227-1237, 2009.
- 2234 FATTORI, V., AMARAL, F. A., VERRI, W. A. Neutrophils and arthritis:  
2235 Role in disease and pharmacological perspectives. *Pharmacol Res.*, v. 112, p. 84-98,  
2236 2016.
- 2237 Fattori, V., et al. Differential regulation of oxidative stress and cytokine  
2238 production by endothelin ET A<sub>1</sub> and ET B<sub>1</sub> receptors in superoxide anion-  
2239 induced inflammation and pain in mice. *J. Drug Target*, v. 25, p. 264-274, 2017
- 2240 FEIN, A. Nociceptores: As células que sentem dor. Petrov, P.;  
2241 Francischi, J. N.; Ferreira, S. H. et al. tradutores. Ribeirão Preto - SP: Dor On Line,  
2242 2011.
- 2243 FERREIRA, S. H. et al. Dor Inflamatória. In: ALVES NETO, O. & cols.  
2244 Dor - Princípios e Prática, 1 ed, São Paulo: Artmed, p. 265-279, 2009.
- 2245 FERREIRA, S. H. The role of interleukins and nitric oxide in the  
2246 mediation of inflammatory pain and its control by peripheral analgesics. *Drugs*, v. 46,  
2247 p. 1-9, 1993.
- 2248 FERREIRA, S. H., LORENZETTI, B. B., BRISTOW, A. F., POOLE, S.  
2249 Interleukin-1 beta as a potent hyperalgesic agent antagonized by a tripeptide  
2250 analogue. *Nature*, v. 334, n. 6184, p. 698-700, 1988.
- 2251 FREIRE, M.O., VAN DYKE, T.E. Natural resolution of inflammation.  
2252 *Periodontology* 2000, v. 63, n.1, p. 149-164, 2013.
- 2253 GALVAO, I., et al. Annexin A1 promotes timely resolution of  
2254 inflammation in murine gout. *Eur J Immunol.*, v. 47, p. 585-596, 2017).
- 2255 GOMES, R. et al. Impacto da artrite reumatoide no sistema público de  
2256 saúde em Santa Catarina, Brasil: análise descritiva e de tendência temporal de 1996  
2257 a 2009. *Revista Brasileira de Reumatologia*, v. 57, n. 3, p. 204-209, 2017.
- 2258 GORONZY, J. J., WEYAND, C. M. Rheumatoid arthritis *Immunol Rev.*,  
2259 v. 204, 55-73, 2005.
- 2260 GUAZELLI, C., et al. Quercetin attenuates zymosan-induced arthritis  
2261 in mice. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, v. 102, p. 175-184, 2018.
- 2262 GUEDES, R. P., et al. Neuropathic pain modifies antioxidant activity in  
2263 rat spinal cord. *Neurochem Res.*, v. 31, n. 5, p. 603-9, 2006.
- 2264 GUEDES, R. P., et al. Neuropathic pain modifies antioxidant activity in  
2265 rat spinal cord. *Neurochem Res.*, v. 31, p. 603-609, 2006.
- 2266 GUERRERO, A. T. et al. Involvement of LTB<sub>4</sub> in zymosan-induced

- 2267 joint nociception in mice: participation of neutrophils and PGE2. *J Leukoc Biol.*, v. 83,  
2268 p. 122-130, 2007.
- 2269 GUERRERO, A. T., et al. Hypernociception elicited by tibio-tarsal 1  
2270 joint flexion in mice: a novel experimental arthritis model for pharmacological  
2271 screening. *Pharmacol Biochem Behav.*, v. 84, n. 21, p. 244-51, jun 2006.
- 2272 GUERRERO, A. T., et al. Toll-like receptor 2/MyD88 signaling  
2273 mediates zymosan-induced joint hypernociception in mice: participation of TNF-alpha,  
2274 IL-1beta and CXCL1/KC. *Eur J Pharmacol.*, v. 674, n. 1, p. 51-7, 2012.
- 2275 HAK, A. E., CHOI, H. K. Lifestyle and gout. *Curr Opin Rheumatol.*, v.  
2276 20, n. 2, p.179-186, 2008.
- 2277 HAK, A. E.; et al. Menopause, postmenopausal hormone use and risk  
2278 of incident gout. *Ann Rheum Dis.*, v. 69, n. 7, 1305-1309, 2010.
- 2279 HARDY, J. D., WOLFF, H. G., GOODELL, H. Experimental evidence  
2280 on the nature of cutaneous hyperalgesia. *J Clin Invest.*, v. 29, n. 1, p. 115-140, 1950.
- 2281 HATTORI, H., et al. Small-molecule screen identifies reactive oxygen  
2282 species as key regulators of neutrophil chemotaxis. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, v. 107,  
2283 n. 8, p. 3546-3551, 2010.
- 2284 HE, Y., et al. NEK7 is an essential mediator of NLRP3 activation  
2285 downstream of potassium efflux. *Nature*, v. 530, n. 7590, p. 354-7, fev 2016.
- 2286 HELLMANN, J., et al. Resolvin D1 decreases adipose tissue  
2287 macrophage accumulation and improves insulin sensitivity in obese-diabetic mice.  
2288 *Faseb J.*, v. 25, p. 2399-2407, 2011.
- 2289 HOCHBERG, M. C., et al. *Rheumatology.*, 3 ed. New York: Mosby,  
2290 2003.
- 2291 HOHMANN, M. S. N., et al. 5-lipoxygenase deficiency reduces  
2292 acetaminophen-induced hepatotoxicity and lethality. *BioMed research international*,  
2293 e627046, p. 1-13, 2013.
- 2294 HOLZINGER, D., et al. Myeloid-related proteins 8 and 14 contribute to  
2295 monosodium urate monohydrate crystal-induced inflammation in gout. *Arthritis*  
2296 *Rheumatol.*, v. 66, n.5, p. 1327-39, mai 2014.
- 2297 HONG, S., et al. N. Novel docosatrienes and 17S-resolvins generated  
2298 from docosahexaenoic acid in murine brain, human blood, and glial cells. Autacoids in  
2299 anti-inflammation. *J Biol Chem.*, v. 278, p. 14677-14687, 2003.
- 2300 HUANG, L., et al. Enduring prevention and transient reduction of

- 2301 postoperative pain by intrathecal resolvin D1. *Pain*, v. 152, p. 557-565, 2011.
- 2302 HUANG, S. M., et al. Overexpressed transient receptor potential  
2303 vanilloid 3 ion channels in skin keratinocytes modulate pain sensitivity via  
2304 prostaglandin E2. *J Neurosci.*, v. 28, p. 13727-13737, 2008.
- 2305 HUYNH, M. L. N., FADOK, V. A., HENSON, P. M. Phosphatidylserine  
2306 dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF-beta1 secretion and the  
2307 resolution of inflammation. *J Clin Invest.*, v. 109, n. 1, p. 41-50, 2002.
- 2308 IASP- International Association for the Study of Pain. "Part III: Terms,  
2309 A current list with definitions and notes on usage". *Classification of Chronic Pain*, 2nd  
2310 Edition, IASP Task Force on Taxonomy, p. 209-214, editado por H. Merskey and N.  
2311 Bogduk, IASP Press, Seattle, 1994, e modificado em 2013.
- 2312 JOOSTEN, L. A., et al. Engagement of fatty acids with Toll-like  
2313 receptor 2 drives interleukin-1beta production via the ASC/caspase 1 pathway in  
2314 monosodium urate monohydrate crystal-induced gouty arthritis. *Arthritis Rheum.*, v.  
2315 62, n. 11, p. 3237-48, nov 2010.
- 2316 KAHN A. M. Effect of diuretics on the renal handling of urate. *Semin*  
2317 *Nephrol.*, v. 8, n. 3, p. 305-314, 1988.
- 2318 KASSUYA, C. A. L., et al. Intraplantar PGE2 causes nociceptive  
2319 behaviour and mechanical allodynia: the role of prostanoid E receptors and protein  
2320 kinases. *Br J Pharmacol.*, v. 150, p. 727-737, 2007.
- 2321 KAWAI, T., AKIRA, S. Toll-like Receptors and Their Crosstalk with  
2322 Other Innate Receptors in Infection and Immunity. *Immunity.*, v. ;34, n. 5, p. 637-50,  
2323 mai 2011.
- 2324 KEEBLE, J. E., et al. Hydrogen peroxide is a novel mediator of  
2325 inflammatory hyperalgesia, acting via transient receptor potential vanilloid 1-dependent  
2326 and independent mechanisms. *Pain*, v. 141, p. 135-142, 2009.
- 2327 KHAMENEH, H. J., et al. C5a Regulates IL-1beta 1 Production and  
2328 Leukocyte Recruitment in a Murine Model of Monosodium Urate Crystal-Induced  
2329 Peritonitis. *Front Pharmacol.*, v. 8, p. 10, 2017.
- 2330 KRAMER, H. M., CURHAN, G. The association between gout and  
2331 nephrolithiasis: the National Health and Nutrition Examination Survey III, 1988-1994.  
2332 *Am J Kidney Dis.*, v. 40, p. 37-42, 2002.
- 2333 KUMAR, V., ABBAS, A. K., ASTER, J. C. Robbins: *Patologia Básica*.  
2334 9 ed. Elsevier, 2013.

- 2335 KUMAR, V., COTRAN, R. S., ROBBINS S. L. Basic Pathology. 7 ed.  
2336 Philadelphia: Saunders, p. 873, 2004.
- 2337 KUO, C. F.; GRAINGE, M. J.; ZHANG, W.; DOHERTY, M. Global  
2338 epidemiology of gout: prevalence, incidence and risk factors. Nat Rev Rheumatol., v.  
2339 11, n. 11, p. 649-662, 2005.
- 2340 LEVINE, J. D., TAIWO, Y. Inflammatory Pain, em: Wall PD, Melzack  
2341 R, Bonica JJ - Textbook of Pain. 3rd ed., Edinburgh, Scotland, Churchill Livingstone,  
2342 p. 45-56, 1994.
- 2343 LEVY, B. D., et al. Lipid mediator class switching during acute  
2344 inflammation: signals in resolution. Nat Immunol., v. 2, n. 7, p. 612-9, jul 2001.
- 2345 LIMA-GARCIA, J. F., et al. The precursor of resolvin D series and  
2346 aspirin-triggered resolvin D1 display anti-hyperalgesic properties in adjuvant-induced  
2347 arthritis in rats. Br J Pharmacol, v. 164, n. 2, p. 278-293, set 2011.
- 2348 LIN, J., KAKKAR, V., LU, X. Essential roles of toll-like receptors in  
2349 atherosclerosis. Current Medicinal Chemistry, v. 23, n. 5, p. 431-454, fev 2016.
- 2350 LIU-BRYAN, R., et al. Innate immunity conferred by Toll-like receptors  
2351 2 and 4 and myeloid differentiation factor 88 expression is pivotal to monosodium urate  
2352 monohydrate crystal-induced inflammation. Arthritis Rheum., v. 52, p. 2936-2946,  
2353 2005.
- 2354 LOEWENSTEIN, W. R. Mechano-Electric Transduction in the  
2355 Pacinian Corpuscle: Initiation of Sensory Impulses in Mechanoreceptors, em: Autrum  
2356 H - Handbook of Sensory Physiology. Berlin. Springer-Verlag, p. 267-290, 1971.
- 2357 LORENZETTI, B. B., et al. Cytokine-induced neutrophil  
2358 chemoattractant 1 (CINC-1) mediates the sympathetic component of inflammatory  
2359 mechanical hypersensitivity in rats. Eur Cytokine Netw., v.13, n. 4, p. 456-461, 2002.
- 2360 LOURENCO-GONZALEZ, Y., et al. Repurposing of the nootropic drug  
2361 vinpocetine as an analgesic and anti-inflammatory agent: evidence in a mouse model  
2362 of superoxide anion-triggered inflammation. Mediat Inflamm., v. 2019, p. 1-14, 2019.
- 2363 MAIOLI N. A., et al. The superoxide anion donor, potassium  
2364 superoxide, induces pain and inflammation in mice through production of reactive  
2365 oxygen species and cyclooxygenase-2. Brazilian J Med Biol Res., n. 48, p. 321-31,  
2366 2015
- 2367 MAJNO, G.; JORIS, I. Cells, tissues, and disease: Principles of  
2368 general pathology. Oxford University Press., v.58, n. 9, New York: 2004.

- 2369 MARTINON, F., BURNS, K. & TSCHOPP, J. The inflammasome: a  
2370 molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of  
2371 pro-IL- $\beta$ . *Mol Cell*, v. 10, p. 417-426, 2002.
- 2372 MARTINON, F., et al. Gout-associated uric acid crystals activate the  
2373 NALP3 inflammasome. *Nature*, v. 440, n. 7081, p. 237-41, mar 2006.
- 2374 MARTINON, F., GLIMCHER, L. H. Gout: new insights into an old  
2375 disease. *J Clin Invest.*, v. 116, n. 8, p. 2073-5, ago 2006.
- 2376 MARTINON, F., TSCHOPP, J. NLRs join TLRs as innate sensors of  
2377 pathogens. *Trends in Immunology*, v. 26, n. 8, p. 447-454, ago 2005.
- 2378 MARTINON, F.; GLIMCHER, L. H. Gout: new insights into an old  
2379 disease. *J Clin Invest.*, v. 116, p. 2073-2075, 2006.
- 2380 MAS, E., et al. Resolvins D1, D2, and other mediators of self-limited  
2381 resolution of inflammation in human blood following n-3 fatty acid supplementation,  
2382 *Clin Chem.*, v. 58, p. 1476-1484, 2012.
- 2383 MASAKIYO, Y., et al. 17(R)-resolvin D1 ameliorates bleomycin-  
2384 induced pulmonary fibrosis in mice. *Physiol Rep.*, v. 3, n. 12, e12628, 2015.
- 2385 MATHEW, A. J.; RAVINDRAN, V. Infections and arthritis. *Best  
2386 Practice and Research: Clinical Rheumatology*, v. 28, n. 6, p. 935-959, 2014.
- 2387 MCGONAGLE, D., MCDERMOTT, M. F. A proposed classification of  
2388 the immunological diseases. *PLoS Med.*, v. 3, e297, 2006.
- 2389 MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation.  
2390 *Nature*, v. 454, n. 307203, p. 428-435, jul 2008.
- 2391 MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. *Prog  
2392 Neurobiol.*, v. 57, n. 1, p.1-164, jan 1999.
- 2393 MITROULIS, I., et al. Neutrophil extracellular trap formation is  
2394 associated with IL-1 $\beta$  and autophagy-related signaling in gout. *PLoS One*, v. 6, n.  
2395 12, p. e29318, 2011.
- 2396 MITROULIS, I., KAMBAS, K., RITIS, K. Neutrophils, IL-1 $\beta$ , and  
2397 gout: is there a link *Semin Immunopathol.*, v. 35, n. 4, p. 501-12, jul 2013.
- 2398 MITTAL, M. et al. Reactive oxygen species in inflammation and tissue  
2399 injury. *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 20, n. 7, p. 1126-1167, mar 2014.
- 2400 MIYAZAKI, S., et al. Neutrophil infiltration as a crucial step for  
2401 monocyte chemoattractant protein (MCP-1) to attract monocytes in lipopolysaccharide-  
2402 induced arthritis in rabbits. *Inflamm Res.*, v. 49, p. 673-678, 2000.

- 2403 MOGIL, J. S., YU, L., BASBAUM, A. I. Pain genes: natural variation  
2404 and transgenic mutants. *Annu Rev Neurosci.*, v. 23, p. 777-811, 2000.
- 2405 MOQRICH, A., et al. Impaired thermosensation in mice lacking  
2406 TRPV3, a heat and camphor sensor in the skin. *Science*, n. 307, p. 1468-1472, 2005.
- 2407 NAVARRO, S. A., et al. Analgesic activity of piracetam: effect on  
2408 cytokine production and oxidative stress. *Pharmacol Biochem Behav.*, v. 105, p. 183-  
2409 192, 2013.
- 2410 NDENGELE, M. M., et al. *FASEB J.*, v. 22, p. 3154-3164, 2008.
- 2411 NELSON, D. L., COX, M. Lehninger – Princípios de Bioquímica. 3ed.  
2412 São Paulo: Sarvier, 2002.
- 2413 NEOGI, T. Clinical practice. *Gout. N. Engl. J. Med.*, v. 364, n. 5, 2011.
- 2414 NORLING, L. V., et al. Cutting edge: humanized nano-proresolving  
2415 medicines mimic inflammation-resolution and enhance wound healing. *J. Immunol.*, v.  
2416 186, p. 5543-5547, 2011.
- 2417 PASCHKE, S., et al. Technical advance: inhibition of neutrophil  
2418 chemotaxis by colchicine is modulated through viscoelastic properties of subcellular  
2419 compartments. *J. Leukocyte Biol.*, v. 94, n. 5, p. 1091–1096, 2013.
- 2420 PEREZ-RUIZ, F., et al. *Gout. Imaging of gout: findings and utility.*  
2421 *Arthritis Res Ther.*, v. 11, n. 3, p. 232, 2009.
- 2422 PERRETTI, M., D'ACQUISTO, F. Annexin A1 and glucocorticoids as  
2423 effectors of the resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol.*, v. 9, n. 1, p. 62-70, jan  
2424 2009.
- 2425 PERRETTI, M., D'ACQUISTO, F. Annexin A1 and glucocorticoids as  
2426 effectors of the resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol.*, v. 9, p. 62-70, 2009.
- 2427 PERRETTI, M, FLOWER, R. J. Annexin 1 and the biology of the  
2428 neutrophil. *J Leukoc Biol.*, v. 76, p. 25-29, 2004.
- 2429 PETRILLI, V., et al. Activation of the NALP3 inflammasome is triggered  
2430 by low intracellular potassium concentration. *Cell Death Differ.*, v. 14, n. 9, p. 1583-9,  
2431 set 2007.
- 2432 PIOTROWSKI, W., FOREMAN, J. C. Some effects of calcitonin  
2433 generelated peptide in human skin and on histamine release. *Br J Dermatol.*, v.114, p.  
2434 37-46, 1986.
- 2435 POPA-NITA O., et al. Crystal-induced neutrophil activation. IX. Syk-  
2436 dependent activation of class Ia phosphatidylinositol 3-kinase. *J Leukoc Biol.*, v. 82, n.

- 2437 3, p. 763-73, set 2007.
- 2438 RANG, H. P., BEVAN, S., DRAY, A. Chemical activation of nociceptive  
2439 peripheral neurones. *Br. Med. Bull.*, v. 47, n. 3, p. 534-548, 1991.
- 2440 REICHLING, D. B., LEVINE, J. D. Critical role of nociceptor plasticity  
2441 in chronic pain. *Trends Neurosci.*, v. 32, n. 12, p. 611-8, dez 2009.
- 2442 RIBEIRO, R. A., et al. Involvement of resident macrophages and mast  
2443 cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice.  
2444 *Eur J Pharmacol.*, v. 387, n. 1, p. 111-118, 2000.
- 2445 RIBEIRO, R. A., et al. Role of resident mast cells and macrophages in  
2446 the neutrophil migration induced by LTB<sub>4</sub>, fMLP and C5a des arg. *Int Arch Allergy*  
2447 *Immunol.*, v. 112, n.1, p. 27-35, jan 1997.
- 2448 ROBBINS, S. L.; KUMAR, V. (ed.); ABBAS, A.K. (ed.); FAUSTO, N.  
2449 (ed.). *Patologia: Bases Patológicas das doenças*. 7<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.
- 2450 ROCHA E SILVA, M. A brief survey of the history of inflammation.  
2451 1978. *Agents and actions*, v. 43, n. 3-4, p. 86-90, dez 1994.
- 2452 ROGERIO, A. P., et al. Resolvin D1 and aspirin-triggered resolvin D1  
2453 promote resolution of allergic airways responses. *J Immunol.*, v. 189, p. 1983-1991,  
2454 2012.
- 2455 RUIZ-MIYAZAWA, K. W., et al, 15d-PGJ<sub>2</sub>-loaded nanocapsules  
2456 ameliorate experimental gout arthritis by reducing pain and inflammation in a PPAR-  
2457 gamma-sensitive manner in mice, *Scientific Reports*, v. 8, n. 13979, 2018.
- 2458 RUIZ-MIYAZAWA, K. W., et al. Vinpocetine reduces  
2459 lipopolysaccharide-induced inflammatory pain and neutrophil recruitment in mice by  
2460 targeting oxidative stress, cytokines and NF-κB. *Chem Biol Interact.*, v. 237, p. 9-17,  
2461 2015.
- 2462 SAAG, K. G., CHOI, H. Epidemiology, risk factors, and lifestyle  
2463 modifications for gout. *Arthritis Res Ther.*, 8 Suppl 1:S2, 2006.
- 2464 SAAG, K. G., MIKULS, T. R. Recent advances in the epidemiology of  
2465 gout. *Curr Rheumatol Rep.*, v. 7, n. 3, p. 235-241, 2005.
- 2466 SABINA, E. P., NAGAR, S., RASOOL, M. A role of piperine on  
2467 monosodium urate crystal-induced inflammation an experimental model of gouty  
2468 arthritis. *Inflammation*, v.34, n.3, p. 184-192, jun 2011.
- 2469 SACHS, D., et al. Tumour necrosis factor-alpha, interleukin-1beta and  
2470 interleukin-8 induce persistent mechanical nociceptor hypersensitivity. *Pain*, v. 96, n.

- 2471 1-2, p. 89-97, 2002.
- 2472 SALVEMINI, D., et al. Roles of reactive oxygen and nitrogen species  
2473 in pain. *Free Radic Biol M.*, v. 51, p. 951-966, 2011.
- 2474 SAVILL, J., et al. A blast from the past: clearance of apoptotic cells  
2475 regulates immune responses. *Nat Rev Immunol.*, v. 2, p. 965-975, 2002.
- 2476 SCHAIBLE, H. G., GRUBB, B. D. Afferent and spinal mechanisms of  
2477 joint pain. *Pain*, v. 55, p. 5-54, 1993.
- 2478 SCHAUER, C., et al. Aggregated neutrophil extracellular traps limit  
2479 inflammation by degrading cytokines and chemokines. *Nat Med.*, v. 20, n. 5, p. 5-11,  
2480 mai 2014.
- 2481 SCHLESINGER, N., THIELE, R. G. The pathogenesis of bone  
2482 erosions in gouty arthritis. *Ann Rheum Dis.*, v. 69, n. 11, p. 1907-12, nov 2010.
- 2483 SCHMID-BURGK, J. L., et al. A Genome-wide CRISPR (clustered  
2484 regularly interspaced short palindromic repeats) screen identifies NEK7 as an essential  
2485 component of NLRP3 inflammasome activation. *J Biol Chem.*, v. 291, n. 1, p. 103-9,  
2486 jan 2016.
- 2487 SCHOLZ, J., WOOLF, C. J. Can we conquer pain? *Nat Neurosci.*, v.  
2488 5, p. 1062-7, nov 2002.
- 2489 SERAFIM, K. G. G., et al. Bosentan, a mixed endothelin receptor  
2490 antagonist, inhibits superoxide anion-induced pain and inflammation in mice. *Naunyn-  
2491 Schmiedeberg's Arch Pharmacol.*, n. 388, v. 11, p. 1211-1221, 2015.
- 2492 SERHAN, C. N. A search for endogenous mechanisms of anti-  
2493 inflammation uncovers novel chemical mediators: missing links to resolution.  
2494 *Histochem Cell Biol.*, v. 122, p. 305-321, 2004.
- 2495 SERHAN, C. N., CHIANG, N., DALLI, J., COLAS, R. A. Identification  
2496 of resolvin D2 receptor mediating resolution of infections and organ protection. *J Exp  
2497 Med.*, v.212, n.8, p.1203-17, jul 2015.
- 2498 SERHAN, C. N., CHIANG, N., VAN DYKE, T. E. Resolving  
2499 inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev  
2500 Immunol*, v.8, n.5, p. 349-361, mai 2008.
- 2501 SERHAN, C. N., et al. Lipid mediators in the resolution of inflammation.  
2502 *Cold SpringHarb Perspect Biol.*, v. 7, n. 2, p. a016311, out 2014.
- 2503 SERHAN, C. N., et al. Macrophage proresolving mediator maresin 1  
2504 stimulates tissue. *Faseb J.*, v. 26, n. 4, p. 1755-65, abr 2012.

- 2505 SERHAN, C. N., et al. Novel anti-inflammatory pro-resolving mediators  
2506 and their receptors. *Curr Top Med Chem.*, v. 11, p. 629-647, 2011.
- 2507 SERHAN, C. N., et al. Novel functional sets of lipid-derived mediators  
2508 with antiinflammatory actions generated from omega-3 fatty acids via cyclooxygenase  
2509 2-nonsteroidal antiinflammatory drugs and transcellular processing. *J Exp Med.*, v. 92,  
2510 p. 1197-1204, 2000.
- 2511 SERHAN, C. N., et al. Reduced inflammation and tissue damage in  
2512 transgenic rabbits overexpressing 15-lipoxygenase and endogenous anti-inflammatory  
2513 lipid mediators. *J Immunol.*, v.171, n.12, p. 6856-65, dez 2003.
- 2514 SERHAN, C. N., et al. Resolvins: a family of bioactive products of  
2515 omega-3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter pro  
2516 inflammation signals. *J Exp Med.*, v.196, n.8, p. 1025-1037, out 2002.
- 2517 SHI, H., et al. NLRP3 activation and mitosis are mutually exclusive  
2518 events coordinated by NEK7, a new inflammasome component. *Nat Immunol.*, v. 17,  
2519 n. 3, p. 250-8, mar 2016.
- 2520 SIEBERT, S., et al. Cytokines as Therapeutic Targets in Rheumatoid  
2521 Arthritis and Other Inflammatory Diseases. *Pharmacological Reviews*, V. 67, n. 2, p.  
2522 280-309, 2015.
- 2523 SO A. K., MARTINON, F. Inflammation in gout: mechanisms and  
2524 therapeutic targets. *Nat Rev Rheumatol.*, v. 13, n. 11, p. 639-64, 2017.
- 2525 SO, A. K., MARTINON, F. Inflammation in gout: mechanisms and  
2526 therapeutic targets. *Nat Rev Rheumatol.*, v. 13, n. 11, p. 639-647, nov 2017.
- 2527 SOMMER, C., BIRKLEIN, F. Fighting off pain with resolvins. *Nature*  
2528 *Med.*, v.16, p. 518-520, 2010.
- 2529 SPECTOR W. G., WILLOUGHBY, D. A. Vasoactive amines in acute  
2530 inflammation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 116, n. 3, p. 839-846,  
2531 1964.
- 2532 Sprangers, M. A., et al. Which chronic conditions are associated with  
2533 better or poorer quality of life? *J Clin Epidemiol.*, v. 53, p. 895-907, 2000.
- 2534 STOCKER, C. J., et al. TNF-a, IL-4, and IFN-g regulate differential  
2535 expression of P- and E-selectin expression by porcine aortic endothelial cells. *J*  
2536 *Immunol.*, v. 164, p. 3309-3315, 2000.
- 2537 SUGIMOTO, M. A., et al. Annexin A1 and the resolution of  
2538 inflammation: modulation of neutrophil recruitment, apoptosis, and clearance. *J*

- 2539 Immunol Res., 8239258, 2016.
- 2540 SUN, Y. P., et al. Resolvin D1 and its aspirin-triggered 17R epimer.  
2541 Stereochemical assignments, anti-inflammatory properties, and enzymatic  
2542 inactivation. *J Biol Chem.*, v. 282, p. 9323-9334, 2007.
- 2543 TAKEUCHI, O., AKIRA, S. Pattern Recognition Receptors and  
2544 Inflammation. *Cell*, v. 140, n. 6, p. 805-20, mar 2010.
- 2545 THEOHARIDES, T. C., et al. Differential release of mast cell mediators  
2546 and the pathogenesis of inflammation. *Immunological Reviews*, v. 217, n. 1, p. 65-78,  
2547 jun 2007.
- 2548 TITOS, E., et al. Resolvin D1 and its precursor docosahexaenoic acid  
2549 promote resolution of adipose tissue inflammation by eliciting macrophage polarization  
2550 toward an M2-like phenotype. *J Immunol.*, v. 187, p. 5408-5418, 2011.
- 2551 TODD, A. J. Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn.  
2552 *Nat Rev Neurosci.*, v. 11, n. 12, p. 823-36, dez 2010.
- 2553 UÇEYLER, N., SCHÄFERS, M., SOMMER, C. Mode of action of  
2554 cytokines on nociceptive neurons. *Exp Brain Res.*, v. 196, n. 67-78, 2009.
- 2555 UMAMAHESWARI, M., ASOKKUMAR, K., SIVASHANMUGAM, A. T.,  
2556 et al. In vitro xanthine oxidase inhibitory activity of the fractions of *Erythrina stricta* roxb.  
2557 *J Ethnopharmacol.*, v.124, n.3, p. 646-648, jul 2009.
- 2558 VALÉRIO, D. A., et al. Quercetin reduces inflammatory pain: inhibition  
2559 of oxidative stress and cytokine production. *J Nat Prod.*, v. 72, p. 1975-1979, 2009.
- 2560 VERRI, W. A. JR., et al. IL-15 mediates immune inflammatory  
2561 hypernociception by triggering a sequential release of IFN-gamma, endothelin, and  
2562 prostaglandin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 103, n. 25, p. 9721-5, jun 2006.
- 2563 VERRI, W. A., et al. Hypernociceptive role of cytokines and  
2564 chemokines: targets for analgesic drug development. *Pharmacol Ther.*, v.112, n.1, p.  
2565 116-138, out 2006.
- 2566 WANG, B., et al. Resolvin D1 protects mice from LPS-induced acute  
2567 lung injury. *Pulm Pharmacol Ther.*, v. 24, p. 434-441, 2011a.
- 2568 WANG, L., et al. Distinctive antioxidant and antiinflammatory effects of  
2569 flavonols. *J Agric Food Chem.*, v. 54, p. 9798-9804, 2006.
- 2570 WANG, R., DASHWOOD, R. H. Endothelins and their receptors in  
2571 cancer: identification of therapeutic targets. *Pharmacol Res.*, v. 63, p. 519-524, 2011.
- 2572 WANG, Z. Q., et al. A newly identified role for superoxide in

2573 inflammatory pain. *J Pharmacol Exp Ther.*, v. 309, p. 869-878, 2004.

2574 WATKINS, L. R., et al. Mechanisms of tumor necrosis factor-alpha  
2575 (TNF-alpha) hyperalgesia. *Brain Res.*, v. 692, n. 1-2, p. 244-250, 1995.

2576 WIESER, M. J., et al. Mutual influences of pain and emotional face  
2577 processing. *Front Psychol.*, v. 5, n. 1160, out 2014.

2578 WILSON, L.; SASEEN, J. J. Gouty arthritis: a review of acute  
2579 management and prevention. *Pharmacotherapy*, v. 36, p 906-922, 2016.

2580 WOOLF, C. J., SALTER, M. W. Neuronal plasticity: increasing the gain  
2581 in pain. *Science*, v. 288, n. 5472, p. 1765-9, jun 9 2000.

2582 XU, L., et al. Comparison of prednisolone, etoricoxib, and  
2583 indomethacin in treatment of acute gouty arthritis: an open-label, randomized,  
2584 controlled trial. *Med Sci Monit.*, v.22, p. 810-817, mar 2016.

2585 XU, Z. Z; JI, R. R. Resolvins are potent analgesics for arthritic pain. *Br*  
2586 *J Pharmacol.*, v. 164, p. 274-277, 2011.

2587 YARON, JR., et al. K<sup>+</sup> regulates Ca<sup>2+</sup> to drive inflammasome  
2588 signaling: dynamic visualization of ion flux in live cells. *Cell Death Dis.*, v. 6, p. e1954,  
2589 out 2015.

2590 YATOMI, M., et al. 17(R)-resolvin D1 ameliorates bleomycin-induced  
2591 pulmonary fibrosis in mice. *Physiol Rep.*, v. 3, n. 12, e12628, 2015.

2592 ZHAO, J., HUANG, Y. Salivary uric acid as a noninvasive biomarker  
2593 for monitoring the efficacy of urate-lowering therapy in a patient with chronic gouty  
2594 arthropathy. *Clin Chim Acta.*, v.450, p. 115-120, out 2015.

2595 ZHU, Y.; PANDYA, B. J.; CHOI, H. K. Prevalence of gout and  
2596 hyperuricemia in the US general population: the national health and nutrition  
2597 examination survey 2007–2008. *Arthritis Rheum.*, v. 63, n. 10, p. 3136-3141, 2011.

2598

2599

2600

2601

2602

2603

2604

2605

2606

## ANEXO 1

2607

## COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

## COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 62/2018

Londrina, 27 de Abril de 2018.

Prezado (a) professor (a)

Certificamos que o projeto intitulado: “Avaliação do efeito e mecanismos analgésico e anti-inflamatório da 17-r-resolvina D1 em modelo de artrite induzida por zymosan e em modelo de gota induzida por cristais de monourato de sódio (MSU).” protocolo nº1415.2018.99 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 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/UUEL) em **27/04/2018**.

O objetivo do projeto é avaliar o efeito analgésico e anti-inflamatório e mecanismos da 17-R-resolvina D1 em modelo de artrite induzida por zymosan e em modelo de gota induzida por cristais de monourato de sódio (MSU). Grau de invasividade=2

Vigência do Projeto	27/04/2018 a 01/08/2018
Espécie/linhagem	Camundongo heterogênico / Swiss Camundongo isogênico / C57BL/6
Nº de animais	696+40=736
Peso/Idade	20-25 g / 2 meses 20-25 g / 2 meses
Sexo	Machos.
Origem	Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina (Swiss) / Biotério do Hospital Universitário (C57BL/6)
Amostras a serem coletadas	Lavado articular, articulação fêmuro-tibial, tibia, fêmur.

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

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

*Maria Fernanda R. Graciano*  
Profª. Dra. Maria Fernanda Rodrigues Graciano  
Coordenadora da CEUA/UUEL

Ilmo.(a) Sr.(a)  
**Prof. (a) Dr. (a). Waldiceu Aparecido Verri Junior**  
Responsável pelo projeto  
Departamento de Ciências Patológicas - CCB

C/C para a Chefia do Depto. de Ciências Patológicas - CCB  
C/C para a Direção do CCB