

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e
Farmacologia

Flávia Cristina de Sousa Fonseca

**COMPARAÇÃO FARMACOLÓGICA DOS LÍPIDES RESOLUTIVOS (RESOLVINA
E1, RESOLVINA D1 E PROTECTINA DX) NOS MODELOS EXPERIMENTAIS DE
EDEMA E NOCICEPÇÃO NA PATA DE RATOS**

Belo Horizonte

2016

Flávia Cristina de Sousa Fonseca

COMPARAÇÃO FARMACOLÓGICA DOS LÍPIDES RESOLUTIVOS (RESOLVINA E1, RESOLVINA D1 E PROTECTINA DX) NOS MODELOS EXPERIMENTAIS DE EDEMA E NOCICEPÇÃO NA PATA DE RATOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, com área de concentração em Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Janetti Nogueira de Francischi.

Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo Mathias Orlando.


Belo Horizonte

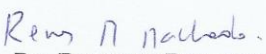
2016


**"COMPARAÇÃO FARMACOLÓGICA DOS LÍPIDES
RESOLUTIVOS (RESOLVINA E1, RESOLVINA D1 E
PROTECTINA DX) NOS MODELOS EXPERIMENTAIS DE EDEMA
E NOCICEPÇÃO NA PATA DE RATOS"**


FLÁVIA CRISTINA DE SOUSA FONSECA

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia 21 de outubro de 2016, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:


PROF. DR. MÁRCIO DE MATOS COELHO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS


PROF. DR. RENES DE RESENDE MACHADO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS


PROF. DR. RICARDO MATHIAS ORLANDO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
CO-ORIENTADOR


PROFA. DR^a. JANETTI NOGUEIRA DE FRANCISCHI
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ORIENTADORA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Belo Horizonte, 21 de outubro de 2016

*A meus pais e ao meu irmão Tiago,
pelo incentivo e carinho.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre comigo e me possibilitar essa experiência.

À Profa. Janetti Nogueira de Francischi, pela confiança e orientação, pela disponibilidade excepcional, pelo enorme aprendizado e apoio em todos os momentos, imprescindível à realização deste trabalho. Você é exemplo de comprometimento, determinação e competência.

Ao Prof. Ricardo Mathias Orlando, pela receptividade, pela disposição em ajudar sempre e pela enorme contribuição para esse trabalho.

Ao Prof. André Klein, pela atenção, sugestões e apoio.

À Profa. Regina Maria De Marco Turchetti Maia, pela agradável convivência e auxílio nos experimentos.

Ao Prof. Rodinei Augusti, pela contribuição para esse trabalho.

A todos os professores do Departamento de Farmacologia e Fisiologia do Instituto de Ciências Biológicas, pelos ensinamentos.

Aos meus amados pais, Paulo e Magna, pelo amor, incentivo, apoio e carinho sempre. Amo vocês!

Ao meu irmão Tiago, pelo entusiasmo contagiante e pelo exemplo de determinação e perseverança.

Ao Thiago pelo companheirismo, incentivo e amor.

A todos os familiares e amigos pela inestimável torcida.

A todos os amigos do Laboratório de Inflamação e Dor, por todo aprendizado, pela cooperação e companheirismo sempre, em especial ao Ayslan Barra e Natalia Matos pela agradável companhia diária, pela força e amizade verdadeira.

A toda a equipe do LSAT pela ajuda e convívio agradável.

Aos colegas da pós-graduação, em especial à Flávia Araújo, pelos momentos de carinho e descontração que carrego comigo desde a graduação. Você é um presente de Ouro Preto para a vida.

Aos funcionários da secretaria do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia, Cintya e Rodner, pelos esclarecimentos e atenção.

A toda a equipe do CEBIO-ICB/UFMG pela boa convivência e disposição em ajudar sempre.

Aos bioteristas, Wellington e Rinaldo, por todo o cuidado com os animais de experimentação, fundamental para o sucesso do nosso trabalho.

Aos órgãos de fomento CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, fica expressa aqui a minha gratidão.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis”. (José de Alencar)

RESUMO

A resolução da inflamação é atualmente considerada um processo ativo, no qual atuam mediadores lipídicos produzidos endogenamente, denominados mediadores lipídicos pró-resolutivos especializados (SPMs), que apresentam propriedades anti-inflamatórias e pró-resolutivas. O presente trabalho teve como objetivo estudar o efeito de três SPMs, a saber, resolvina E1 (RvE1), resolvina D1 (RvD1) e protectina DX (PDX), em modelos experimentais de edema e hiperalgesia mecânica da pata de ratos frente a diferentes estímulos flogogênicos. Os estímulos flogogênicos utilizados foram: carragenina (CG; 100 e 500 µg), histamina (H; 109 nmol), serotonina (5-HT; 5 nmol), substância P (SP; 0,7 nmol) e prostaglandina E₂ (PGE₂; 6 nmol), todos administrados por via intraplantar, bem como os SPMs. O edema e a nocicepção das patas foram medidos de 0h a 24h, utilizando um pletismômetro e um analgesímetro, respectivamente. Os procedimentos com animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG, com protocolos de nº 199/2014 e 376/2014. O pré-tratamento (10 min antes do estímulo flogogênico) com 285 pmol de RvE1 reduziu o edema induzido por 100 µg de CG, não alterou o edema induzido por SP e PGE₂ e aumentou o edema induzido por H e 5-HT. Além disso, reduziu a nocicepção induzida por todos os agentes flogogênicos utilizados. O pós-tratamento (2h50 min após o estímulo flogogênico) com a mesma dose de RvE1 reduziu apenas a nocicepção induzida por 500 µg de CG. Com relação à RvD1, o pré-tratamento com 570 pmol reduziu o edema induzido por 100 µg de CG e pela 5-HT, não alterou o edema induzido por H e PGE₂, e aumentou o edema induzido por SP. Além disso, reduziu a nocicepção induzida por 100 µg de CG, H e 5-HT e não alterou a nocicepção induzida pela SP e PGE₂. O pós-tratamento com a mesma dose de RvD1 reduziu apenas a nocicepção induzida por 500 µg de CG. O tratamento com a PDX se mostrou sem efeito nos modelos experimentais estudados. Adicionalmente, avaliou-se comparativamente os efeitos da RvE1 e da RvD1 com fármacos anti-inflamatórios convencionais de diferentes classes, administrados sistemicamente (via subcutânea) 30 min antes da CG, sendo eles: indometacina (INDO; 4 mg/kg), celecoxibe (CX; 30 mg/kg) e dexametasona (DEXA; 1 mg/kg). Observou-se que a INDO reduziu o edema e a nocicepção induzidos por 500 µg de CG e o CX reduziu apenas a nocicepção dessa mesma dose de CG, efeitos esses

diferentes dos observados com as resolvinas. A DEXA reduziu tanto o edema quanto a nocicepção induzidos por 100 e 500 µg de CG, apresentando maiores porcentagens de redução das respostas quando comparada às resolvinas. Dessa maneira, sugere-se que a ação anti-inflamatória e antinociceptiva das resolvinas difere da atividade dos anti-inflamatórios não esteroidais e dos esteroidais. Na investigação do envolvimento de receptores específicos nas ações anti-inflamatória e antinociceptiva apresentadas pela RvE1 frente à CG, observou-se que a utilização do composto U-75302, um antagonista específico do receptor 1 de leucotriena B₄ (receptor BLT1), reverteu a redução do edema e da nocicepção induzidos por CG sob o tratamento com RvE1. Além disso, as substâncias GW 1100 e AH 7614, respectivamente antagonistas dos receptores GPR40 e GPR120, envolvidos na mediação da resposta à ácidos graxos, não produziram nenhum efeito nesses modelos. Sendo assim, pode-se sugerir que o receptor BLT1 está envolvido nos efeitos observados com o tratamento com a RvE1, e que os receptores GPR40 e GPR120 não parecem estar envolvidos nas ações apresentadas por essa substância nos modelos experimentais estudados. Por fim, as amostras comerciais de RvE1, RvD1 e PDX utilizadas no presente estudo, foram submetidas à análise cromatográfica (HPLC-DAD), tendo sido verificado que as mesmas apresentavam padrões estruturais compatíveis com os dados descritos na literatura para tais substâncias, fundamentando assim os nossos resultados. Assim, pode-se concluir que as resolvinas E1 e D1, administradas periféricamente, têm potencial para serem melhores candidatas a fármacos analgésicos do que a fármacos anti-inflamatórios. Deve-se, contudo, alertar para o fato de que seu uso prolongado pode estar associado ao desenvolvimento de efeitos adversos relacionados com a atividade pró-inflamatória detectada com tais resolvinas.

Palavras-chave: mediadores lipídicos pró-resolutivos especializados (SPMs), resolvina E1, resolvina D1, protectina DX, edema, nocicepção mecânica.

ABSTRACT

Resolution of inflammation is considered currently as an active process in which endogenous mediators called specialized pro-resolving lipid mediators (SPMs) exhibit anti-inflammatory and pro-resolutive activities. The aim of the present work was to study the effect of three SPMs, namely resolvin E1 (RvE1), resolvin D1 (RvD1) and protectin DX (PDX) in experimental models of edema and mechanical hyperalgesia of the hindpaw of rats in response to different phlogogenic stimuli. The phlogogenic stimuli were: carrageenan (CG; 100 and 500 µg), histamine (H; 109 nmol), serotonin (5-HT; 5 nmol), substance P (SP; 0.7 nmol) and prostaglandin E₂ (PGE₂; 6 nmol), all given by intraplantar route, likewise the SPMs. The paw edema and nociception measures were taken from 0h to 24h, using a plethysmometer and an analgesimeter, respectively. Animal procedures were approved by UFMG Ethics's Committee for Animal Use, with protocols n^o 199/2014 and 376/2014. Pre-treatment (10 min before the phlogogenic stimulus) with 285 pmol RvE1 reduced the edema induced by 100 µg of CG, with no change in the edema induced by SP and PGE₂, but increased the edema induced by H and 5-HT. Moreover, RvE1 decreased nociception induced by all phlogogenic stimuli used. Post-treatment (2h50 min after the phlogogenic stimulus) with the same dose of RvE1 only reduced nociception induced by 500 µg of CG. Regarding to RvD1, pre-treatment with 570 pmol reduced the edema induced by 100 µg of CG and 5-HT, with no change in the edema induced by H and PGE₂, but increased the edema induced by SP. Furthermore, RvD1 decreased nociception induced by 100 µg of CG, H and 5-HT but did not change the nociception induced by SP and PGE₂. Post-treatment with the same dose of RvD1 only reduced nociception induced by 500 µg of CG. Treatment with PDX showed no effect in the experimental models studied. In addition, we comparatively evaluated the effects of RvE1 and RvD1 with conventional different classes of anti-inflammatory drugs, given systemically (subcutaneous route) 30 min before GC, in special: indomethacin (INDO; 4 mg/kg), celecoxib (CX; 30 mg/kg) and dexamethasone (DEXA; 1 mg/kg). It was observed that INDO reduced edema and nociception induced by 500 µg of CG and that CX only reduced the nociception of the same dose of CG, clearly showing a different profile of activity shown by resolvins. DEXA reduced edema as well nociception induced by 100 and 500 µg of CG, showing

higher reduction percentage compared with resolvins. Thus, it is suggested that the anti-inflammatory and antinociceptive action of resolvins differ from that of nonsteroidal and steroidal anti-inflammatory drugs. In the investigation of the involvement of specific receptors in the anti-inflammatory and antinociceptive actions presented by RvE1, the compound U-75302, a leukotriene B₄ receptor 1 (BLT1 receptor) specific antagonist, reversed the reduction in edema and nociception induced by CG under treatment with RvE1. Furthermore, the drugs GW 1100 and AH 7614, antagonists of the receptors GPR40 and GPR120, respectively, did not produce effect in these models. Thus, it can be suggested that the BLT1 receptor is involved in the anti-inflammatory and antinociceptive effects observed with RvE1 treatment and that GPR40 and GPR120 receptors are not involved in the actions of RvE1 in the experimental models studied. Finally, commercial samples of RvE1, RvD1 and PDX used in the present study were submitted to chromatographic analysis (HPLC-DAD) and it was verified that they had structural patterns consistent with the data described in the literature for such molecules, thus giving sound ground for our results. Thus, it can be concluded that resolvins E1 and D1, given peripherally, have the potential to be better candidates for analgesics than anti-inflammatory drugs. However, their prolonged use might be associated with the development of adverse effects related to pro-inflammatory activity here detected.

Keywords: specialized pro-resolving lipid mediators (SPMs), resolvin E1, resolvin D1, protectin DX, edema, mechanical nociception.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|-----------|
| Figura 1. Classificação dos tipos de dor..... | 26 |
| Figura 2. Processo de resolução da inflamação..... | 27 |
| Figura 3. Mediadores pró-resolutivos especializados biossintetizados a partir de seus respectivos ácidos graxos poliinsaturados..... | 29 |
| Figura 4. Biossíntese de resolvinas da série E..... | 30 |
| Figura 5. Biossíntese de resolvinas da série D..... | 31 |
| Figura 6. Biossíntese de protectinas | 32 |
| Figura 7. Introdução da pata do rato na cuba do pletismômetro para medida do edema | 44 |
| Figura 8. Analgesímetro - aparato utilizado para realizar a medida do limiar nociceptivo na pata de ratos..... | 45 |
| Figura 9. Pata do rato submetida à parte compressora do analgesímetro para medida do limiar nociceptivo em resposta ao estímulo mecânico aplicado à superfície plantar..... | 45 |
| Figura 10. Curva dose-resposta de edema e nocicepção induzidos por carragenina na pata traseira de ratos Holtzman. | 55 |
| Figura 11. Curva dose-resposta de edema e nocicepção induzidos por carragenina na pata traseira de ratos Holtzman tendo como padrão a resposta basal dos animais..... | 56 |
| Figura 12. Curva dose-resposta de edema e nocicepção induzidos por carragenina na pata traseira de ratos Wistar. | 58 |
| Figura 13. Efeito dose-dependente da resolvina E1 sobre o edema e nocicepção induzidos por carragenina na pata de ratos. | 61 |
| Figura 14. Efeito da administração de resolvina E1 em patas não inflamadas. | 63 |
| Figura 15. Comparação do efeito do pré-tratamento com resolvina E1 sobre o edema e nocicepção induzidos por carragenina na pata de ratos Holtzman e Wistar. | 65 |

| | |
|---|-----------|
| Figura 16. Efeito do pré-tratamento com resolvina E1 sobre o edema e nocicepção induzidos por 500 µg carragenina na pata de ratos. | 66 |
| Figura 17. Efeito do pós-tratamento com resolvina E1 sobre o edema e nocicepção induzidos por 100 µg carragenina na pata de ratos. | 67 |
| Figura 18. Efeito do pós-tratamento com resolvina E1 sobre o edema e nocicepção induzidos por 500 µg carragenina na pata de ratos. | 68 |
| Figura 19. Efeito do pré-tratamento com resolvina E1 sobre o edema e nocicepção induzidos por histamina na pata de ratos. | 70 |
| Figura 20. Efeito do pré-tratamento com resolvina E1 sobre o edema e nocicepção induzidos por serotonina na pata de ratos. | 72 |
| Figura 21. Efeito do pré-tratamento com resolvina E1 sobre o edema e nocicepção induzidos por substância P na pata de ratos. | 73 |
| Figura 22. Efeito do pré-tratamento com resolvina E1 sobre o edema e nocicepção induzidos por prostaglandina E ₂ na pata de ratos. | 75 |
| Figura 23. Efeito dose-dependente da resolvina D1 sobre o edema e nocicepção induzidos por carragenina na pata de ratos. | 77 |
| Figura 24. Efeito da administração de resolvina D1 em patas não inflamadas.. | 78 |
| Figura 25. Comparação do efeito do pré-tratamento com resolvina D1 sobre o edema e nocicepção induzidos por carragenina na pata de ratos Holtzman e Wistar. | 80 |
| Figura 26. Efeito do pré-tratamento com resolvina D1 sobre o edema e nocicepção induzidos por 500 µg carragenina na pata de ratos. | 81 |
| Figura 27. Efeito do pós-tratamento com resolvina D1 sobre o edema e nocicepção induzidos por 500 µg carragenina na pata de ratos. | 82 |
| Figura 28. Efeito do pré-tratamento com resolvina D1 sobre o edema e nocicepção induzidos por histamina na pata de ratos. | 84 |
| Figura 29. Efeito do pré-tratamento com resolvina D1 sobre o edema e nocicepção induzidos por serotonina na pata de ratos. | 85 |

| | |
|--|------------|
| Figura 30. Efeito do pré-tratamento com resolvina D1 sobre o edema e nocicepção induzidos por substância P na pata de ratos..... | 87 |
| Figura 31. Efeito do pré-tratamento com resolvina D1 sobre o edema e nocicepção induzidos por prostaglandina E ₂ na pata de ratos. | 88 |
| Figura 32. A protectina DX não altera o edema e a nocicepção induzidos por carragenina na pata de ratos..... | 90 |
| Figura 33. Efeito da administração de protectina DX em patas não inflamadas..... | 91 |
| Figura 34. Efeito do pré-tratamento com a combinação de resolvina E1 e resolvina D1 sobre o edema e nocicepção induzidos por carragenina na pata de ratos. | 96 |
| Figura 35. Efeito do etanol sobre o edema e nocicepção induzidos por carragenina na pata de ratos. | 98 |
| Figura 36. Efeito do etanol 10% nas respostas de edema e nocicepção medidas em patas não inflamadas. | 99 |
| Figura 37. Efeito do pré-tratamento com indometacina sobre o edema e nocicepção induzidos por 100 µg de carragenina na pata de ratos. | 101 |
| Figura 38. Efeito do pré-tratamento com indometacina sobre o edema e nocicepção induzidos por 500 µg de carragenina na pata de ratos. | 102 |
| Figura 39. Efeito do pré-tratamento com celecoxibe sobre o edema e nocicepção induzidos por 100 µg de carragenina na pata de ratos. | 104 |
| Figura 40. Efeito do pré-tratamento com celecoxibe sobre o edema e nocicepção induzidos por 500 µg de carragenina na pata de ratos. | 105 |
| Figura 41. Efeito do pré-tratamento com dexametasona sobre o edema e nocicepção induzidos por 100 µg de carragenina na pata de ratos.. | 107 |
| Figura 42. Efeito do pré-tratamento com dexametasona sobre o edema e nocicepção induzidos por 500 µg de carragenina na pata de ratos. | 108 |
| Figura 43. Efeito do U-75302 sobre o pré-tratamento com resolvina E1 frente ao edema e nocicepção induzidos por carragenina na pata de ratos. | 110 |
| Figura 44. Efeito da administração de U-75302 em patas não inflamadas. | 111 |

| | |
|---|------------|
| Figura 45. Efeito do GW 1100 sobre o pré-tratamento com resolvina E1 frente ao edema e nocicepção induzidos por carragenina na pata de ratos. | 113 |
| Figura 46. Efeito da administração de GW 1100 em patas não inflamadas. | 114 |
| Figura 47. Efeito do AH 7614 sobre o pré-tratamento com resolvina E1 frente ao edema e nocicepção induzidos por carragenina na pata de ratos. | 116 |
| Figura 48. Efeito da administração de AH 7614 em patas não inflamadas. | 117 |
| Figura 49. Cromatograma obtido pela análise do padrão da resolvina E1. | 119 |
| Figura 50. Espectro ampliado do pico de tempo de retenção de 8,84 minutos obtido na análise cromatográfica do padrão da resolvina E1. | 119 |
| Figura 51. Cromatograma obtido pela análise do padrão da resolvina D1. | 120 |
| Figura 52. Espectro ampliado do pico de tempo de retenção de 11,18 minutos obtido na análise cromatográfica do padrão da resolvina D1. | 121 |
| Figura 53. Cromatograma obtido pela análise do padrão da protectina DX. | 122 |
| Figura 54. Espectro ampliado do pico de tempo de retenção de 12,96 minutos obtido na análise cromatográfica do padrão da protectina DX. | 122 |
| Figura 55. Cromatogramas sobrepostos obtidos pela análise dos padrões de resolvina e protectina. | 123 |

LISTA DE ESQUEMAS

- Esquema 1.** Escala temporal de avaliação do efeito da carragenina e prostaglandina E_2 na indução de edema e nocicepção na pata de ratos.**47**
- Esquema 2.** Escala temporal de avaliação do efeito da histamina, serotonina e substância P na indução de edema e nocicepção na pata de ratos.....**47**
- Esquema 3.** Escala temporal de avaliação do efeito da RvE1, RvD1 e PDX sobre o edema e nocicepção induzidos por carragenina ou prostaglandina E_2 na pata de ratos.**48**
- Esquema 4.** Escala temporal de avaliação do efeito da RvE1 e RvD1 sobre o edema e nocicepção induzidos por histamina, serotonina ou substância P na pata de ratos.**48**
- Esquema 5.** Escala temporal de avaliação do efeito da combinação de RvE1 e RvD1 sobre o edema e nocicepção induzidos por carragenina na pata de ratos.**49**
- Esquema 6.** Escala temporal de avaliação do efeito do pós-tratamento com RvE1 e RvD1 sobre o edema e nocicepção induzidos por carragenina na pata de ratos.**49**
- Esquema 7.** Escala temporal de avaliação do efeito da indometacina, celecoxibe e dexametasona sobre o edema e nocicepção induzidos por carragenina na pata de ratos.**50**
- Esquema 8.** Escala temporal de avaliação do efeito de U-75302 sobre o edema e nocicepção induzidos por carragenina mediante o pré-tratamento com RvE1 na pata de ratos.**50**
- Esquema 9.** Escala temporal de avaliação do efeito de GW 1100 e AH 7614 sobre o edema e nocicepção induzidos por carragenina mediante o pré-tratamento com RvE1 na pata de ratos.....**51**

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Gradiente empregado na análise cromatográfica dos padrões resolvina E1, resolvina D1 e protectina DX**52**
- Tabela 2.** Efeitos induzidos pelos fatores de resolução resolvina E1, resolvina D1 e protectina DX na resposta edematogênica a variados agentes flogogênicos.**93**
- Tabela 3.** Efeitos induzidos pelos fatores de resolução resolvina E1, resolvina D1 e protectina DX na resposta nociceptiva a variados agentes flogogênicos.**94**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIE - anti-inflamatório esteroidal

AINE - anti-inflamatório não esteroidal

AUC- área sob a curva

BLT1 - receptor 1 de leucotriena B₄

CEBIO - Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

COX – ciclooxigenase

CX - celecoxibe

CG – carragenina

DEXA – dexametasona

DHA – ácido docosahexaenóico

DMSO - dimetilsulfóxido

EPA – ácido eicosapentaenóico

EPM - erro padrão da média

FFAR – receptor de ácidos graxos livres (do inglês “*free fatty acid receptor*”)

GPR – receptor acoplado à proteína G (do inglês “*G protein-coupled receptor*”)

H – histamina

HDHA - ácido hidroxidocosahexaenóico

HEPE - ácido hidroxieicosapentaenóico

HPLC - cromatografia líquida de alta eficiência

HPLC-DAD - cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector com arranjo de fotodiodos

IASP - Associação Internacional para o Estudo da Dor

INDO - indometacina

i.pl. – intraplantar

LOX - lipoxigenase

LTB₄ – leucotriena B₄

LX - lipoxina

MaR - maresina

NO - óxido nítrico

PAF - fator ativador de plaquetas (PAF)

PD - protectina

PGE₂ – prostaglandina E₂

pH - potencial hidrogeniônico

PMN – polimorfonuclear

ROS - espécies reativas de oxigênio

Rv - resolvina

SP - substância P

SPM - mediador lipídico pró-resolutivo especializado

s.c. - subcutânea

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

UV-VIS-DAD - detector de absorbância no ultravioleta e visível com arranjo de fotodiodos

v/v – volume por volume

5-HT - serotonina

Δ – delta

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 23 |
| 1.1 Considerações sobre inflamação..... | 23 |
| 1.2 Considerações sobre dor..... | 24 |
| 1.3 Resolução da inflamação..... | 26 |
| 2. OBJETIVOS..... | 36 |
| 2.1 Objetivo geral..... | 36 |
| 2.2 Objetivos específicos | 36 |
| 3. JUSTIFICATIVA..... | 37 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS | 38 |
| 4.1 Animais..... | 38 |
| 4.2 Drogas e reagentes | 38 |
| 4.3 Preparo de soluções..... | 39 |
| 4.4 Vias de administração das drogas..... | 42 |
| 4.5 Medidas de edema de pata | 43 |
| 4.6 Medida de desenvolvimento de nocicepção na pata de ratos | 44 |
| 4.7 Protocolo experimental | 46 |
| 4.7.1 Estímulos flogogênicos | 46 |
| 4.7.2 Agentes sob teste de atividade anti-inflamatória e antinociceptiva | 47 |
| 4.7.3 Drogas anti-inflamatórias e/ou analgésicas utilizadas como padrão de referênciã nos ensaios de edema e nocicepção à carragenina | 49 |
| 4.7.4 Estudo do envolvimento de receptores específicos nas ações da resolvina E1..... | 50 |
| 4.8 Análise cromatográfica dos padrões de resolvina E1, resolvina D1 e protectina DX empregando cromatografia líquida de alta eficiência associada a detector de absorvância no ultravioleta visível com arranjo de fotodiodos..... | 51 |

| | |
|--|-----------|
| 4.9 Análise estatística..... | 52 |
| 5. RESULTADOS..... | 54 |
| 5.1 Padronização da resposta edematogênica e nociceptiva à carragenina na pata de ratos..... | 54 |
| 5.2 Efeito anti-inflamatório e antinociceptivo das resolvinas E1 e D1 e da protectina DX..... | 59 |
| 5.2.1 Resolvina E1 | 59 |
| 5.2.2 Resolvina D1 | 76 |
| 5.2.3 Protectina DX..... | 89 |
| 5.2.4 Combinação de resolvina E1 + resolvina D1..... | 95 |
| 5.2.5 Efeito dos veículos utilizados nas respostas de edema e nocicepção na pata de ratos | 97 |
| 5.3 Efeito de drogas anti-inflamatórias e/ou analgésicas utilizadas como padrão de referência nos ensaios de edema e nocicepção à carragenina | 100 |
| 5.3.1 Indometacina..... | 100 |
| 5.3.2 Celecoxibe | 103 |
| 5.3.3 Dexametasona | 106 |
| 5.4 Estudo do envolvimento de receptores específicos no efeito anti-inflamatório e antinociceptivo da resolvina E1 | 109 |
| 5.4.1 U-75302 | 109 |
| 5.4.2 GW 1100 | 112 |
| 5.4.3 AH 7614 | 115 |
| 5.5 Análise cromatográfica dos padrões de resolvina E1, resolvina D1 e protectina DX empregando cromatografia líquida de alta eficiência associada a detector de absorvância no ultravioleta visível arranjo de fotodiodos | 118 |
| 5.5.1 Resolvina E1 | 118 |

| | |
|----------------------------|------------|
| 5.5.2 Resolvina D1 | 120 |
| 5.5.3 Protectina DX | 121 |
| 6. DISCUSSÃO | 124 |
| 7. CONCLUSÕES | 131 |
| REFERÊNCIAS..... | 132 |
| ANEXOS | 142 |

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações sobre inflamação

A inflamação é uma resposta imune complexa que ocorre nos tecidos vascularizados em decorrência de estímulos físicos, químicos, imunológicos ou microbiológicos (FILHO, 2009; HUME & FAIRLIE, 2005).

Define-se o processo inflamatório pela presença de sinais e sintomas típicos, considerados sinais cardinais da inflamação, primeiramente descritos por Celsus no séc. I d.C., como: *rubor* (vermelhidão), *tumor* (inchaço), *calor* (aquecimento) e *dolor* (dor), aos quais foi adicionado posteriormente, por Rudolf Virchow, um quinto sinal clínico, a perda de função (*functio laesa*) (FILHO, 2009; KUMAR, 2010; RATHER, 1971; RYAN & MAJNO, 1977).

A inflamação pode ser dividida em aguda e crônica, levando-se em consideração a duração e características patológicas do processo inflamatório. A inflamação aguda apresenta rápido início e uma duração relativamente curta (horas a poucos dias) e é caracterizada por vasodilatação (cl clinicamente relacionada ao calor e rubor no local lesionado), extravasamento de plasma e proteínas plasmáticas (relacionada ao edema), e migração celular (principalmente neutrófilos) para o sítio da inflamação e, em alguns casos, ativação da cascata de coagulação. Já a inflamação crônica é de longa duração (meses a anos) e está associada com a presença de linfócitos e macrófagos, proliferação de vasos sanguíneos, fibrose e destruição tecidual (FILHO, 2009; KUMAR, 2010; SHERWOOD & TOLIVER-KINSKY, 2004).

A resposta inflamatória é um processo complexo e coordenado que envolve a participação de diversos mediadores inflamatórios que são gerados a partir de células ou de proteínas plasmáticas. Dentre os mediadores derivados de células encontram-se as aminas vasoativas (histamina e serotonina), metabólitos do ácido araquidônico (prostaglandinas, leucotrienas e lipoxinas), fator ativador de plaquetas (PAF), espécies reativas de oxigênio, óxido nítrico (NO), citocinas e quimiocinas. Já como mediadores derivados de proteínas plasmáticas têm-se os sistemas do

complemento, da coagulação e das cininas (KUMAR, 2010; MEDZHITOV, 2008). O estímulo agressor, também denominado estímulo flogogênico ou pró-inflamatório, induz a liberação desses mediadores que, atuando sobre seus receptores, são responsáveis pelas alterações vasculares e celulares observadas na inflamação. Os mediadores inflamatórios também são capazes de ativar ou sensibilizar os nociceptores, podendo resultar em dor, alodínia ou hiperalgesia (revisto por JULIUS & BASBAUM, 2001; KUMAR, 2010).

O processo inflamatório constitui uma resposta fundamentalmente protetora destinada a livrar os organismos tanto da causa inicial da lesão celular quanto das consequências de tal lesão. No entanto, passa a ser deletério quando essa resposta se prolonga muito, induzindo lesão tecidual pela liberação exacerbada de enzimas, mediadores inflamatórios e radicais livres de oxigênio, conduzindo a uma cronificação do processo inflamatório (FILHO, 2009; KUMAR, 2010; RANGE *et al.*, 2011).

A persistência de uma inflamação crônica pode causar e/ou agravar uma série de doenças prevalentes, tais como doenças cardiovasculares, asma, artrite reumatóide, diabetes e câncer. Dessa forma, é de suma importância a compreensão dos mecanismos de controle do processo inflamatório (revisado por LEE & SURH, 2012; CHRISTIE, 2014; RANGE *et al.*, 2011).

1.2 Considerações sobre dor

O termo dor é definido pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) como “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a dano real ou potencial de tecidos ou descrita em termos de tal dano” (KOPF & PATEL, 2010). Dessa forma, a dor é considerada uma experiência complexa que envolve não só a transdução de estímulos ambientais nocivos, mas também o processamento cognitivo e emocional pelo cérebro (revisto por JULIUS & BASBAUM, 2001).

De acordo com WOOLF (2010) a dor pode ser amplamente dividida em três classes: (i) dor nociceptiva; (ii) dor inflamatória e (iii) dor patológica, englobando as

dores neuropática e disfuncional, conforme apresentado na Figura 1. A dor nociceptiva ocorre mediante estímulos nocivos de natureza térmica, química ou mecânica, que ativam diretamente os nociceptores e mantem-se enquanto o estímulo desencadeante estiver presente. A dor inflamatória está associada à produção de mediadores inflamatórios que ativam ou sensibilizam os nociceptores. A dor patológica é um estado de doença resultante de uma lesão neuronal (dor neuropática) ou está vinculada com o funcionamento e/ou reatividade anormal do sistema nervoso (dor disfuncional) (revisto por WOOLF, 2004; SCHOLZ & WOOLF, 2002)

Embora os animais não expressem verbalmente a ocorrência de dor, existem respostas comportamentais típicas que podem ser detectadas e interpretadas como dolorosas (LANGFORD *et al.*, 2010). No entanto, devido à dificuldade em analisar o componente emocional da dor nos animais, utiliza-se preferencialmente o termo nocicepção, ao invés de dor, nos modelos de experimentação animal. A nocicepção refere-se apenas ao componente sensorial da dor, ou seja, ao reconhecimento de sinais dolorosos pelo sistema nervoso a partir de um estímulo lesivo (revisto por WOOLF, 2004; KLAUMANN; WOUK; SILLAS, 2008).

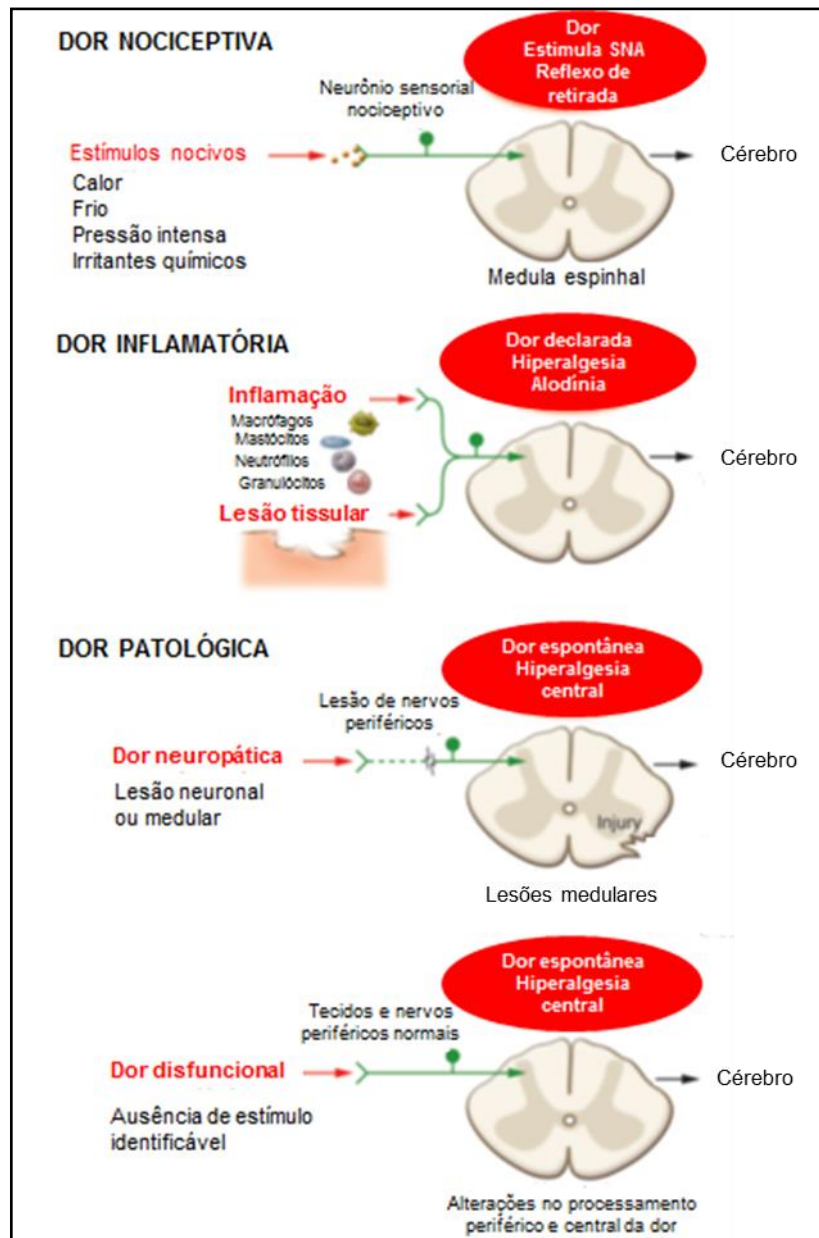


Figura 1. Classificação dos tipos de dor (modificada de WOOLF, 2010).

1.3 Resolução da inflamação

A resolução do processo inflamatório era considerada um processo passivo, possivelmente em decorrência do catabolismo de mediadores pró-inflamatórios e/ou difusão do local de produção. No entanto, atualmente se sabe que essa é apenas uma parte do processo de resolução que engloba também, o *clearance* (remoção)

de células apoptóticas e microorganismos do local lesionado, sendo essa uma etapa muito importante (GILROY *et al.*, 2004; SERHAN *et al.*, 2007; SERHAN, CHIANG, DYKE, 2008).

A resolução da inflamação é considerada hoje um processo ativo altamente coordenado, que é controlado por mediadores endógenos pró-resolutivos. Esse processo é composto por três fases: (i) diminuição de mediadores pró-inflamatórios; (ii) apoptose de leucócitos polimorfonucleares (PMNs) e (iii) fagocitose desses PMNs por macrófagos, seguida da migração desses para os vasos linfáticos. A fase inicial envolve a supressão dos mediadores pró-inflamatórios e a liberação de mediadores endógenos anti-inflamatórios e pró-resolutivos. Essas moléculas têm a capacidade de inibir a migração de PMNs para o sítio inflamado, atrair monócitos, reverter a permeabilidade vascular e a vasodilatação, induzir apoptose em PMNs ativos remanescentes, induzir efluxo de macrófagos que tenham fagocitado PMNs para os vasos linfáticos, e facilitar a remoção do exsudato inflamatório no tecido acometido, restabelecendo assim a homeostase (Figura 2) (revisado por LEE & SURH, 2012; SERHAN & CHIANG, 2008).

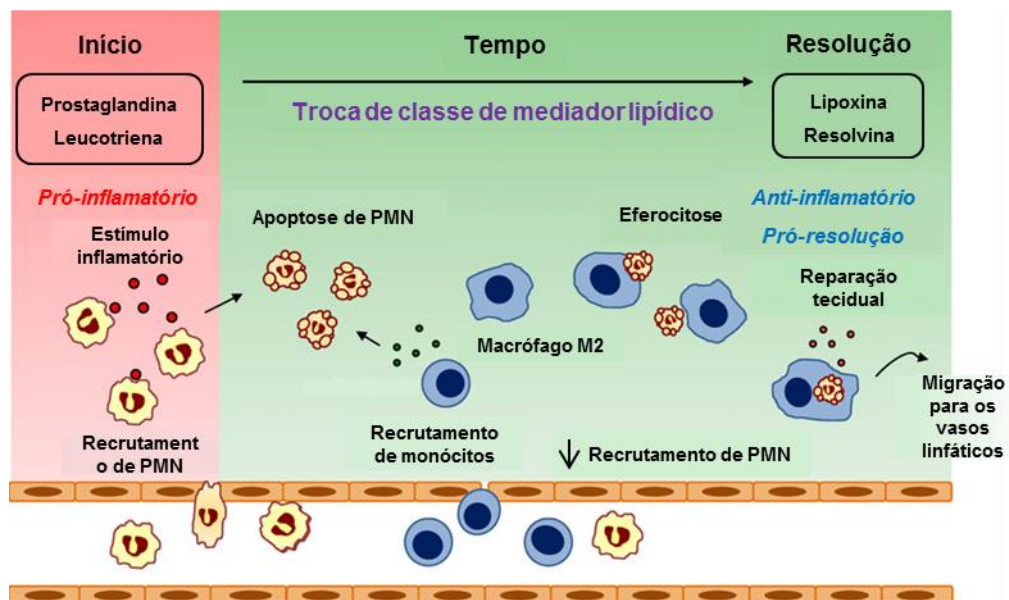


Figura 2. Processo de resolução da inflamação (modificada de LEE & SURH, 2012).

O processo inflamatório é coordenado, principalmente, por mediadores lipídicos provenientes de ácidos graxos poliinsaturados do tipo ômega-6, especialmente, a partir de derivados do ácido araquidônico, tais como as prostaglandinas, leucotrienas e lipoxinas. Porém, no decorrer desse processo, há também a participação dos mediadores lipídicos derivados de ácidos graxos poliinsaturados do tipo ômega-3, tais como as resolvinas, protectinas e maresinas (revisado por LEE & SURH, 2012). Esses últimos mediadores, bem como as lipoxinas, são produzidos endogenamente e constituem diferentes famílias de “mediadores lipídicos pró-resolutivos especializados” (SPMs) (BANNENBERG & SERHAN, 2010; SERHAN *et al.*, 2015). Tais substâncias apresentam tanto propriedades anti-inflamatórias como pró-resolutivas, embora ainda não esteja definida claramente a diferença entre tais propriedades, como se depreende do trabalho apresentado recentemente por eminentes cientistas na área (BUCKLEY *et al.*, 2013).

O termo “resolvina” foi atribuído a partir do inglês *resolution-phase interaction products* (produtos de interação da fase de resolução) e foi primeiramente introduzido para demonstrar que estes novos compostos são mediadores endógenos, encontrados em exsudatos na fase de resolução do processo inflamatório e que apresentam potentes ações anti-inflamatórias e imunorregulatórias (SERHAN *et al.*, 2002).

Conforme mencionado, os SPMs originam-se a partir do ácido araquidônico, no caso das lipoxinas (LXs), e a partir dos ácidos graxos poliinsaturados do tipo ômega-3, sendo que os compostos derivados do ácido eicosapentaenóico (EPA) são designados como resolvinas da série E (RvEs), enquanto os que são formados a partir do ácido docosahexaenóico (DHA) são denominados resolvinas da série D (RvDs), protectinas (PDs) ou maresinas (MaRs), conforme ilustrado na Figura 3 (CHRISTIE, 2014; SERHAN, 2014; SERHAN & CHIANG, 2008; KOHLI & LEVY, 2009).

A seguir será dado destaque para os efeitos da síntese endógena da resolvina E1 (RvE1), resolvina D1 (RvD1) e da protectina DX (PDX), que foram alvos de estudo do presente trabalho.

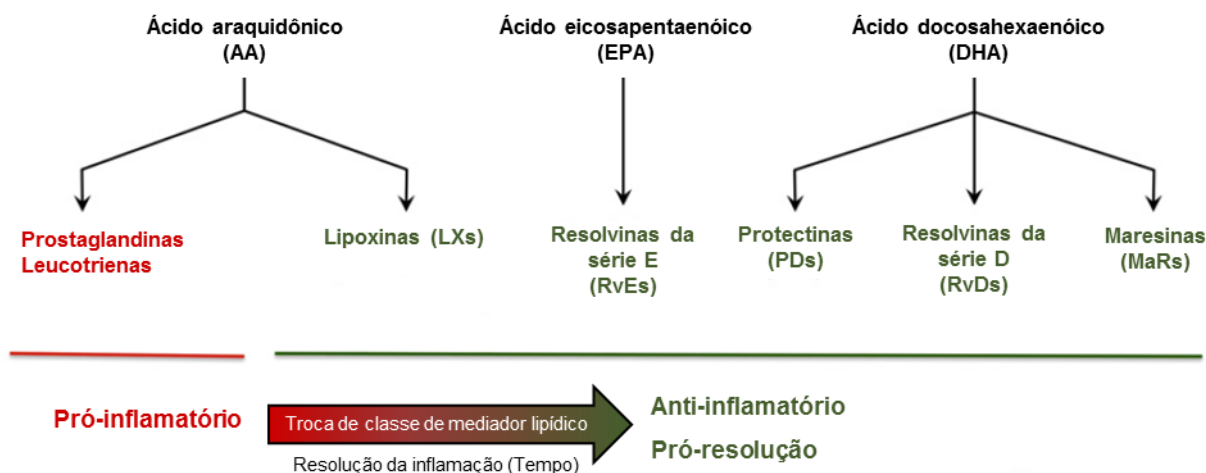


Figura 3. Mediadores pró-resolutivos especializados biossintetizados a partir de seus respectivos ácidos graxos poliinsaturados (modificada de SERHAN *et al.*, 2015).

A formação de resolvinas da série E acontece mediante a interação de células endoteliais e leucócitos, conforme apresentado na Figura 4. Em células endoteliais humanas durante a inflamação, a aspirina acetila a enzima ciclooxigenase 2 (COX-2) que promove a conversão de EPA em ácido 18*R*-hidroxieicosapentaenóico (18*R*-HEPE). Durante as interações célula-célula, o intermediário (18*R*-HEPE) é liberado para leucócitos vizinhos e, conseqüentemente, convertido pela 5-lipoxigenase (5-LOX) no produto biologicamente ativo 5*S*,12*R*,18*R*-trihidróxi-6*Z*,8*E*,10*E*,14*Z*,16*E*-ácido eicosapentaenóico ou resolvina E1. Caso o intermediário sofra uma redução, será originado um composto diferente, denominado resolvina E2. A estereoquímica específica da RvE1 é necessária para a ativação do seu receptor e, portanto, para a sua atividade biológica (ARITA *et al.*, 2005a; SERHAN *et al.*, 2000).

Estudos demonstraram que a produção de RvE1 aumenta com o uso de aspirina, no entanto, quantidades significativas de RvE1 também são produzidas na ausência de aspirina, já que o citocromo P450 também é capaz de gerar 18*R*-HEPE a partir de EPA, podendo então ser convertido pelas células PMN humanas em RvE1 (ARITA, CLISH and SERHAN, 2005).

Até agora, sabe-se que para controlar a inflamação e promover a resolução, a resolvina E1 liga-se a dois receptores acoplados à proteína G presentes em tipos celulares distintos, que são: ChemR23 em células mononucleares e células dendríticas, e BLT1 em PMNs humanos, como pode ser observado na Figura 4. O primeiro é responsável por atenuar o fator nuclear (NF)- κ B, que desempenha importante papel na inflamação, induzindo a síntese de citocinas, quimiocinas e outras proteínas pró-inflamatórias, e o segundo atua reduzindo a liberação de mediadores pró-inflamatórios dependentes da ativação de leucotriena B₄ (LTB₄) (ARITA *et al.*, 2005a; CAMPBELL *et al.*, 2007). Estudos demonstraram que a ligação específica de RvE1 a PMNs humanos é deslocada por LTB₄ e U-75302, um antagonista do receptor 1 de LTB₄ (BLT1), mas não pelo peptídeo chemerina, um ligante específico do outro receptor de RvE1 ChemR23 (ARITA *et al.*, 2007).

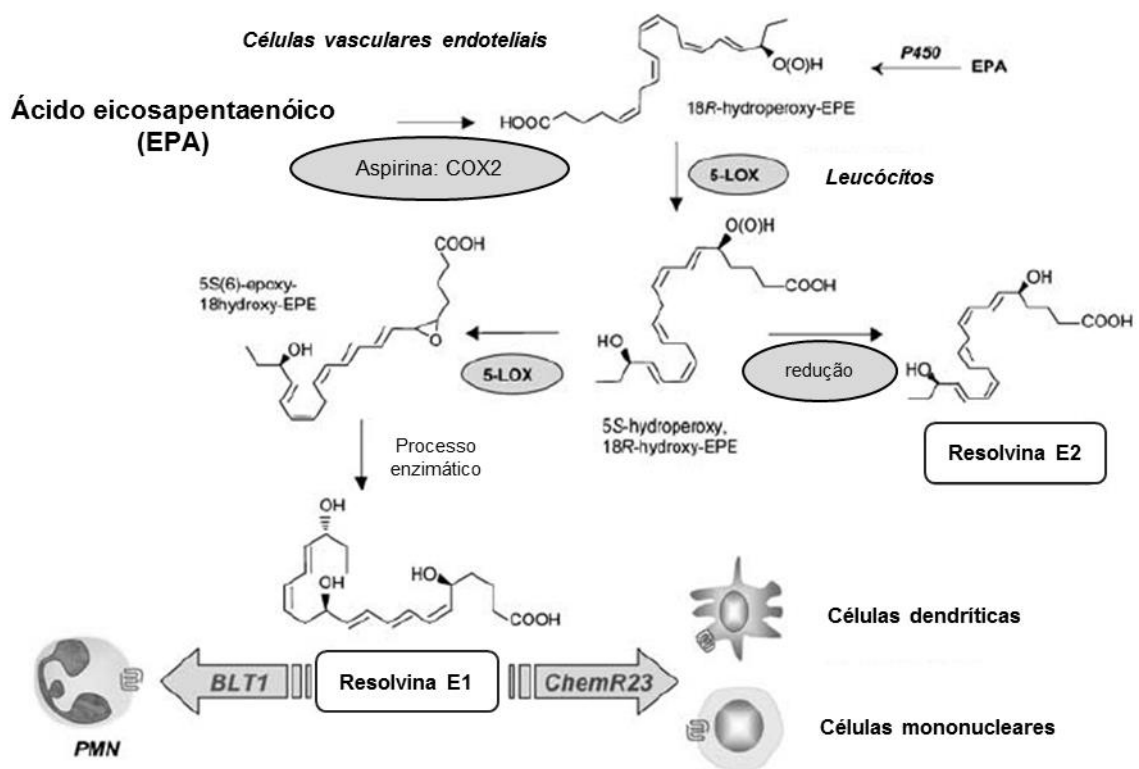


Figura 4. Biossíntese de resolvinas da série E (modificada de SERHAN & CHIANG, 2008).

A formação de resolvinas da série D ocorre a partir do DHA e já está estabelecido que a biossíntese da resolvina D1 (RvD1) envolve uma série de reações de oxigenação pelas enzimas 15-LOX e 5-LOX, conforme apresentado na Figura 5. A enzima 15-LOX promove a conversão de DHA em ácido 17S-hidroxicosahexaenóico (17S-HDHA), que por sua vez é convertido pela 5-LOX no produto biologicamente ativo 7S,8R,17S-trihidrôxi-4Z,9E,11E,13Z,15E,19Z-ácido docosahexaenóico ou resolvina D1 (SUN *et al.*, 2007; KOHLI & LEVY, 2009).

Recentemente, foi identificado que para promover os seus efeitos pró-resolutivos, a RvD1 pode-se ligar a dois tipos de receptores acoplados à proteína G. Esses receptores são: o receptor ALX/FRP2 (receptor de lipoxina A₄) e o receptor órfão GPR32 (KRISHNAMOORTHY *et al.*, 2010).

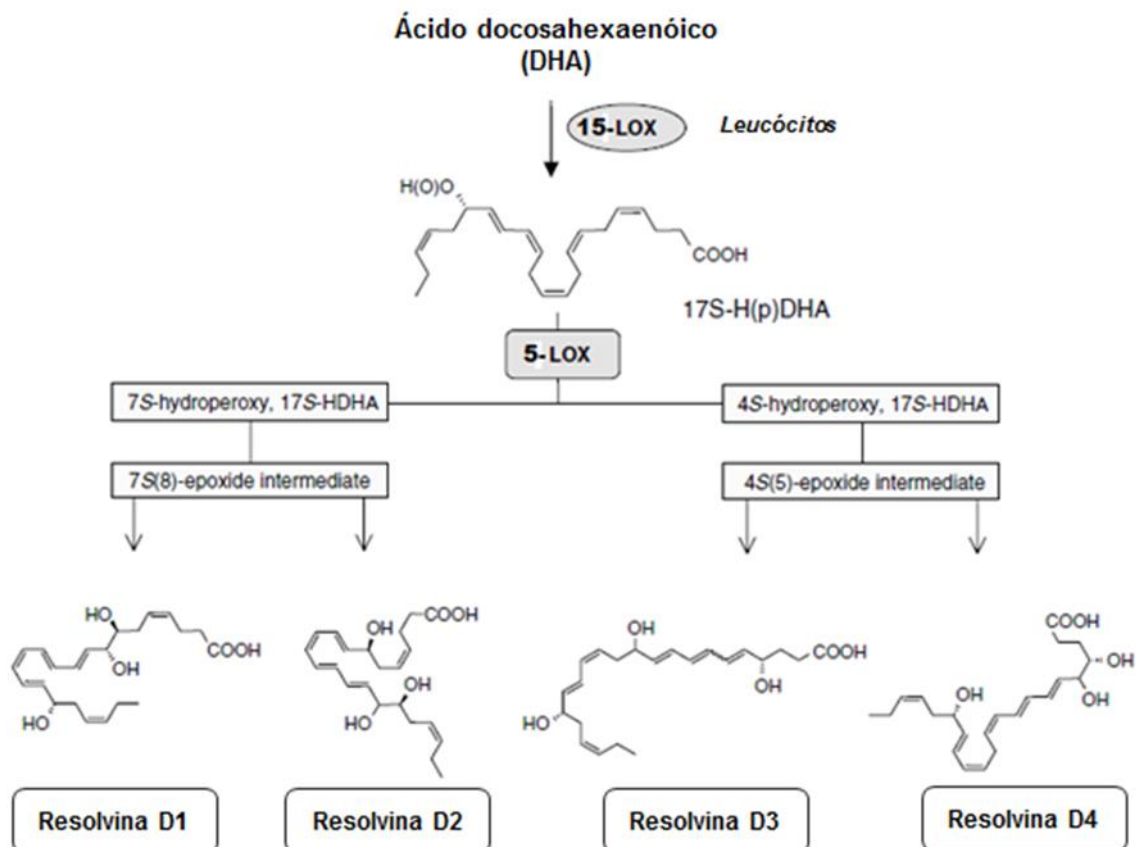


Figura 5. Biossíntese de resolvinas da série D (modificada de SERHAN & CHIANG, 2008).

Em relação à formação das protectinas, elas também são provenientes do DHA e, assim como na biossíntese das resolvinas da série D, envolve a etapa de conversão do DHA em ácido 17S-hidroxicosahexaenóico (17S-HDHA) pela enzima 15-LOX. Para a formação da PDX, segue-se mais uma etapa de oxigenação pela mesma enzima, gerando o produto 10S,17S-dihidroxi-docosa-4Z,7Z,11E,13Z,15E,19Z-ácido hexaenóico ou protectina DX (Figura 6) (CHEN *et al.*, 2009; BUTOVICH, 2005). A PDX é um isômero da PD1 e difere dessa nos seguintes aspectos: (i) na quiralidade do grupo álcool no carbono-10 que é predominantemente na configuração 10R em PD1 e 10S em PDX; (ii) na geometria das três duplas ligações conjugadas que está na configuração 11E, 13E, 15Z em PD1 e 11E, 13Z, 15E em PDX; e (iii) quanto a potência, sendo a PD1 mais potente que PDX (CHEN *et al.*, 2009; SERHAN *et al.*, 2006).

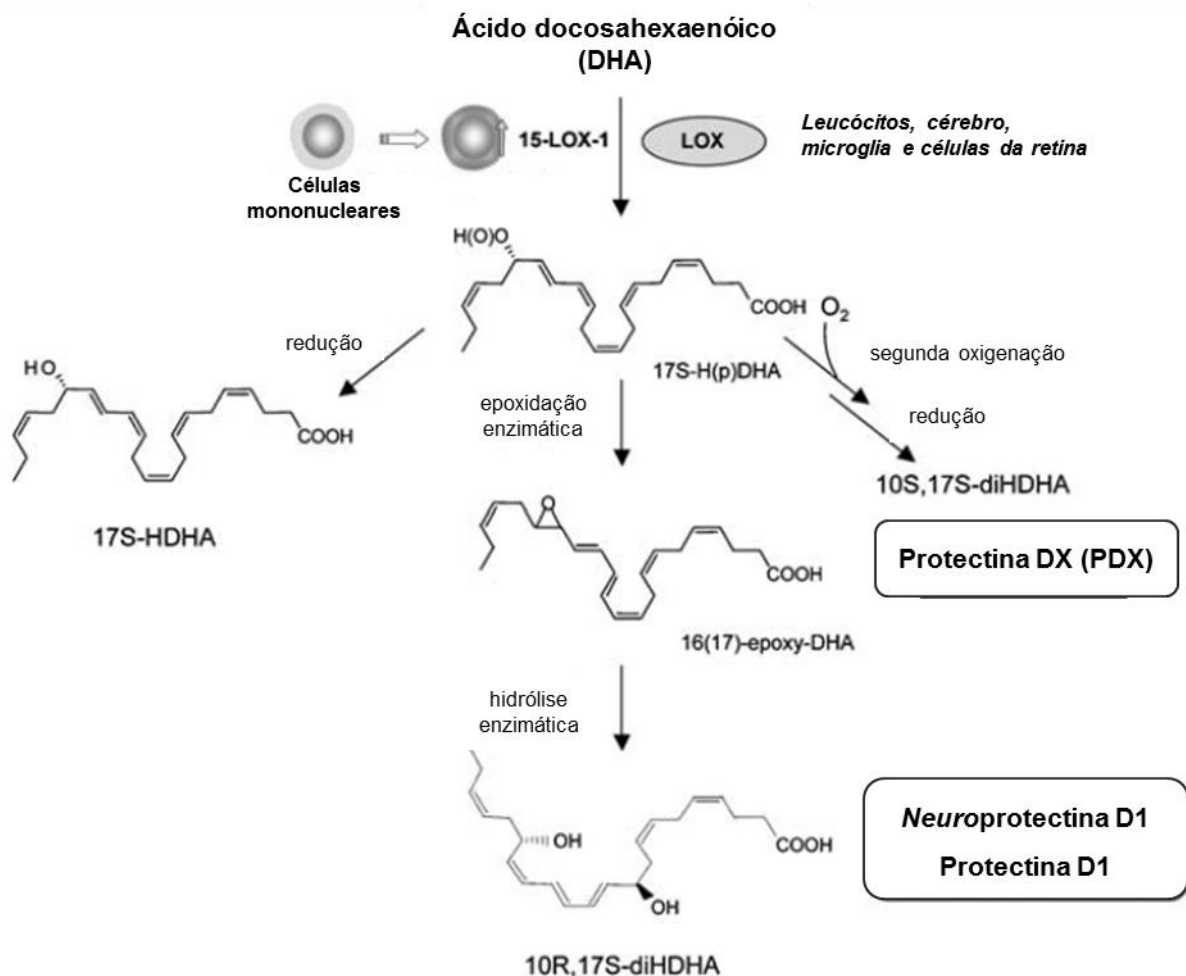


Figura 6. Biossíntese de protectinas (modificada de SERHAN & CHIANG, 2008).

Trabalhos de pesquisa envolvendo as atividades das resolvinas e das protectinas evidenciaram que essas moléculas possuem efeito anti-inflamatório em concentrações na faixa de picomolar a nanomolar. Esses lípidos foram testados *in vivo* e *in vitro* em uma ampla variedade de modelos experimentais e está bem estabelecido que eles integram o mecanismo molecular que contribui para a remoção de células inflamatórias e a restauração da integridade do tecido (CHRISTIE, 2014; LEE & SURH, 2012). Inclusive, alguns desses mediadores já estão sendo avaliados em estudos clínicos, como é o caso de um análogo da resolvina E1 (RX-10045) no qual está em curso um estudo clínico de fase III contra olho seco, já que no estudo de fase II esse análogo demonstrou uma melhora nos sintomas dessa condição (LEE, 2012; CHRISTIE, 2014).

A RvE1 demonstrou a capacidade de inibir a atividade de diversas células, como a migração e a quimiotaxia de neutrófilos, a inibição da produção e síntese de diversas citocinas pró-inflamatórias em células dendríticas, e a ativação da fagocitose de PMNs apoptóticos por macrófagos (CAMPBELL *et al.*, 2007; SEKI, TANI and ARITA, 2009). Além dessas ações *in vitro*, também se observou um efeito protetor da RvE1 *in vivo*, mediante a avaliação desse composto em modelos experimentais tais como: peritonite (BANNENBERG *et al.*, 2005), periodontite (HASTURK *et al.*, 2006), colite (ARITA *et al.*, 2005b), asma (AOKI *et al.*, 2008; AOKI *et al.*, 2010) e em modelo de olho seco (LI *et al.*, 2010; DE PAIVA *et al.*, 2012).

Assim como para a RvE1, a RvD1 também tem a capacidade de inibir a infiltração de PMNs e a secreção de citocinas pró-inflamatórias, e promover a infiltração de monócitos e a fagocitose (LEE & SURH, 2012). O efeito pró-resolução da RvD1 está correlacionado à polarização de macrófagos para o fenótipo M2 (TITIOS *et al.*, 2011). Foram demonstrados os efeitos pró-resolutivos da RvD1 também em modelos experimentais *in vivo*, tais como: peritonite (SUN *et al.*, 2007), obesidade induzida por diabetes (HELLMANN *et al.*, 2011), lesão de nervo periférico (HUANG *et al.*, 2011), isquemia renal (DUFFIELD *et al.*, 2006) e retinopatia (CONNOR *et al.*, 2007).

A PDX é um isômero biologicamente menos ativo que a PD1 em relação aos mecanismos de resolução da inflamação. No entanto, a PDX também é um mediador endógeno encontrado em exsudato inflamatório no modelo de peritonite em murinos, porém ela está presente em quantidades muito baixas. Dentre as ações relacionadas à PDX estão: a inibição da agregação plaquetária induzida por colágeno; a inibição da migração de neutrófilos em um modelo de peritonite em murinos; a inibição da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e da atividade da COX em neutrófilos humanos (SERHAN *et al.*, 2006; CHEN *et al.*, 2009; CHEN *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2014).

Além dos efeitos positivos para a resolução da inflamação promovidos pelos mediadores pró-resolutivos especializados, sabe-se também que os precursores desses mediadores (os ácidos graxos poliinsaturados, especialmente os do tipo ômega-3 EPA e DHA) também podem contribuir para um efeito anti-inflamatório. Estudos demonstraram que pelo menos alguns dos efeitos anti-inflamatórios conhecidos dos ácidos graxos ômega-3 são mediados por sua interação com receptores acoplados a proteína G, mais especificamente à proteína G 120 (GPR 120) (OH *et al.*, 2010; OH & LAGAKOS, 2011).

Recentemente, verificou-se que alguns dos receptores acoplados à proteína G, dentre eles o GPR40, GPR41, GPR43, GPR84 e GPR120, podem ser ativados por ácidos graxos livres. Sendo que os ácidos graxos de cadeia curta ativam GPR41 e 43 (TAZOE *et al.*, 2008), os de cadeia média o GPR84 (WANG *et al.*, 2006) e os de cadeia longa, particularmente os da família ômega-3 (EPA e DHA), são agonistas dos receptores GPR40 e GPR120 (ITOH *et al.*, 2003; HIRASAWA *et al.*, 2005; OH *et al.*, 2010; BRISCOE *et al.*, 2003), exercendo assim seus efeitos anti-inflamatórios.

Dentre os vários modelos experimentais, os modelos de edema e hiperalgisia da pata de ratos induzidos pela carragenina (DI ROSA, 1972; VINEGAR *et al.*, 1987) foram demonstrados por MUKHERJEE *et al.* (1996) serem os modelos mais adequados, dada sua previsibilidade para a detecção e desenvolvimento de (novos) medicamentos anti-inflamatórios eficazes no homem. Fato que comprova a utilização desses modelos para o desenvolvimento de medicamentos foram os estudos clínicos dos inibidores seletivos da COX-2: celecoxibe e rofecoxibe, os quais utilizaram como parâmetro para a avaliação do efeito desses medicamentos os

modelos mencionados acima (PENNING *et al.*, 1997; CHAN *et al.*, 1999). Nesse sentido, o estudo sistemático de novos compostos com atividade anti-inflamatória e analgésica potencial em tais modelos experimentais é uma consequência racional.

Por outro lado, mediadores inflamatórios conhecidos como a histamina, a serotonina, a substância P e a prostaglandina E₂ provocam edema e/ou hiperalgesia. Nesse sentido, desconhece-se a atividade das resolvinas e das protectinas sobre a ação pró-inflamatória e hiperalgésica desses mediadores.

Constituirá objetivo geral desse trabalho, portanto, estudar o efeito dos mediadores lipídicos pró-resolutivos especializados resolvina E1, resolvina D1 e protectina DX nos mesmos modelos experimentais de edema e hiperalgesia na pata de ratos frente a diferentes estímulos, com vistas ao conhecimento da atuação biológica desses novos compostos nesses modelos, e ao desenvolvimento de novos medicamentos anti-inflamatórios.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudar o efeito farmacológico de três mediadores lipídicos pró-resolutivos especializados (resolvina E1, resolvina D1 e protectina DX), administrados periféricamente na pata de ratos, em modelos experimentais de inflamação e dor agudas, utilizando agonistas e antagonistas reconhecidos, disponíveis comercialmente.

2.2 Objetivos específicos

1. Reproduzir curvas dose-resposta de edema e nocicepção à carragenina na pata de ratos Holtzman e Wistar, descritas na literatura;
2. Verificar o efeito do tratamento utilizando os citados fatores resolutivos nos modelos de edema e nocicepção induzidos por carragenina, sob diferentes condições experimentais;
3. Comparar os efeitos obtidos com os fatores resolutivos nestes modelos utilizando a carragenina, com seus efeitos sobre as respostas aos mediadores inflamatórios histamina, serotonina, substância P e prostaglandina E₂;
4. Comparar o efeito da administração local dos fatores resolutivos com o efeito produzido pelos anti-inflamatórios não-esteróides indometacina e celecoxibe, e o esteróide dexametasona nos modelos de edema e nocicepção induzidos por carragenina na pata de ratos;
5. Verificar se receptores específicos estão envolvidos nas ações da resolvina E1;
6. Detectar quimicamente, através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), a presença dos citados fatores resolutivos nas amostras comerciais em estudo.

3. JUSTIFICATIVA

A inflamação está associada com a patogênese de diversas doenças prevalentes na atualidade, tais como a aterosclerose, câncer, asma, doenças autoimunes e várias desordens neurológicas, como as doenças de Alzheimer e Parkinson.

Atualmente o tratamento farmacológico da inflamação é feito com agentes anti-inflamatórios clássicos, como os anti-inflamatórios não esteróides (AINEs) e os esteróides (AIEs). Esses medicamentos são capazes de inibir a liberação de mediadores pró-inflamatórios e, portanto, proporcionam alívio dos sintomas decorrentes da inflamação. Porém, eles não são capazes de reverter em sua totalidade as condições patológicas presentes nas várias desordens inflamatórias. Além disso, a utilização de AINEs no tratamento de doenças inflamatórias foi questionado devido à ocorrência de graves efeitos adversos decorrentes da utilização crônica de inibidores seletivos de ciclooxigenase tipo 2, pertencentes aquele grupo farmacológico.

Assim, a recente descoberta dos mediadores pró-resolutivos especializados, dadas suas atividades anti-inflamatórias e pró-resolutivas, surge como alternativa farmacológica que visa acelerar o processo de resolução da inflamação a fim de prevenir o surgimento e complicação de doenças crônicas como as aqui discutidas, justificando os objetivos do presente trabalho. Além disso, terapias que possam restaurar a homeostase do organismo se tornam mais interessantes do que a inibição da resposta inflamatória por meio de drogas, que muitas vezes estão relacionadas a efeitos adversos pronunciados.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Para os experimentos iniciais foram utilizados ratos da linhagem Holtzman, com peso de 150-180 gramas. Também foram realizados experimentos utilizando ratos Wistar, com o mesmo peso.

Os animais foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas (CEBIO) da UFMG e mantidos, em número de 5 a 7 por caixa, no biotério do Departamento de Farmacologia da UFMG, com ciclo claro-escuro de 12h (07:00-19:00 h) e livre acesso à ração e água. No dia anterior ao dia da realização dos experimentos, os animais permaneceram na sala de experimentação para adaptação.

Os procedimentos com animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG, com protocolos de nº 199/2014 e 376/2014 (Anexo I).

4.2 Drogas e reagentes

1. Álcool etílico absoluto P.A. (etanol) (Cromoline Química Fina, São Paulo, Brasil)
2. AH 7614 (Cayman Chemicals)
3. Carragenina λ tipo IV (SIGMA, St. Louis, MO, EUA)
4. Celecoxibe (Pfizer, Guarulhos, São Paulo, Brasil)
5. Dexametasona (Aché Laboratórios Farmacêuticos S.A., Brasil)
6. DMSO (LABSYNTH, Diadema, São Paulo, Brasil)
7. GW 1100 (Cayman Chemicals)
8. Histamina (Carlo Erba, Itália)

9. Indometacina (SIGMA, São Paulo, Brasil)
10. Prostaglandina E₂ (Cayman Chemicals)
11. Protectina DX (Cayman Chemicals)
12. Resolvina D1 (Cayman Chemicals)
13. Resolvina E1 (Cayman Chemicals)
14. Serotonina (SIGMA, St. Louis, MO, EUA)
15. Solução aquosa de cloreto de sódio (NaCl) estéril a 0,9% (salina fisiológica estéril) (Equiplex Indústria Farmacêutica, Goiás, Brasil)
16. Substância P (SIGMA, St. Louis, MO, EUA)
17. Trizma Base (SIGMA, St. Louis, MO, EUA)
18. U-75302 (Cayman Chemicals)

4.3 Preparo de soluções

1. AH 7614 (Cayman Chemicals)

O AH 7614, um antagonista seletivo do receptor FFAR4/GPR120, foi utilizado na dose de 99 nmol (34,8 µg). Para isso, foi feita uma solução estoque de AH 7614 de 4 mg/mL em etanol, a partir da qual foram retiradas alíquotas para fazer as soluções com a dose citada. Tanto a solução estoque quanto as alíquotas foram mantidas a -20°C. Antes das injeções, as alíquotas foram descongeladas e então diluídas em salina, para obtenção da dose desejada.

2. Solução de carragenina (CG)

As doses de CG utilizadas na curva dose resposta foram 100, 500 e 1000 µg. Para isso, a CG foi preparada nas concentrações de 1, 5 e 10 mg/mL em salina fisiológica estéril e mantida a 5°C.

3. Solução de celecoxibe (CX)

O CX é um anti-inflamatório não esteroidal (AINE) inibidor seletivo da ciclooxigenase (COX) - 2 e foi utilizado na dose de 30 mg/kg (FRANCISCHI *et al.*, 2002). Para isso, preparou-se uma solução de 30 mg/mL em salina fisiológica estéril no dia da sua utilização.

4. Solução de dexametasona (DEXA)

A DEXA é um anti-inflamatório esteroidal (AIE) e foi utilizada na dose de 1 mg/kg (FRANCISCHI *et al.*, 1996). Para isso, preparou-se uma solução de 1 mg/mL em salina fisiológica estéril no dia da sua utilização.

5. GW 1100 (Cayman Chemicals)

O GW 1100, um antagonista seletivo do receptor FFAR1/GPR40, foi utilizado nas doses de 96 e 192 nmol (50 e 100 µg, respectivamente) (BRISCOE *et al.*, 2006). Para isso, foi feita uma solução estoque de GW 1100 de 5 mg/mL em etanol, a partir da qual foram retiradas alíquotas para fazer as soluções com as doses citadas. Tanto a solução estoque quanto as alíquotas foram mantidas a -20°C. Antes das injeções, as alíquotas foram descongeladas e então diluídas em salina, para obtenção da dose desejada.

6. Solução de histamina (H)

As doses de H utilizadas na curva dose resposta foram 54, 109 e 543 nmol (10, 20 e 100 µg respectivamente). Para isso, foi feita uma solução estoque de H de 1000 µg/mL em salina fisiológica estéril, a partir da qual foram retiradas alíquotas para fazer as soluções com as doses citadas. Tanto a solução estoque quanto as alíquotas foram mantidas a -20°C. Antes das injeções, as alíquotas foram descongeladas e então diluídas em salina, para obtenção da dose desejada.

7. Solução de indometacina (INDO)

A INDO é um AINE não seletivo para COX e foi utilizada na dose de 4 mg/kg (FRANÇA *et al.*, 2006). Para isso, preparou-se uma solução de 4 mg/mL em tampão Tris (0,1 mol L⁻¹; pH = 8,0) no dia da sua utilização.

8. Prostaglandina E₂ (PGE₂)

As doses de PGE₂ utilizadas na curva dose resposta foram 0,6, 1,0 e 6,0 nmol (0,2, 0,4 e 2,0 µg, respectivamente). Para isso, foi feita uma solução estoque de PGE₂ de 1000 µg/mL em etanol, a partir da qual foram retiradas alíquotas para fazer as soluções com as doses citadas. Tanto a solução estoque quanto as alíquotas foram mantidas a -20°C. Antes das injeções, as alíquotas foram descongeladas e então diluídas em salina, para obtenção da dose desejada.

9. Protectina DX (PDX)

As doses de PDX utilizadas na curva dose resposta foram 70, 285, 570 pmol (25, 103 e 205 ng, respectivamente). Para isso, foi feita uma solução estoque de PDX de 100 µg/mL em etanol, a partir da qual foram retiradas alíquotas para fazer as soluções com as doses citadas. Tanto a solução estoque quanto as alíquotas foram mantidas a -20°C. Antes das injeções, as alíquotas foram descongeladas e então diluídas em salina, para obtenção da dose desejada.

10. Resolvina D1 (RvD1)

As doses de RvD1 utilizadas na curva dose resposta foram 285, 570 e 1140 pmol (107, 214 e 430 ng, respectivamente). Para isso, foi feita uma solução estoque de RvD1 de 100 µg/mL em etanol, a partir da qual foram retiradas alíquotas para fazer as soluções com as doses citadas. Tanto a solução estoque quanto as alíquotas foram mantidas a -80°C. Antes das injeções, as alíquotas foram descongeladas e então diluídas em salina, para obtenção da dose desejada.

11. Resolvina E1 (RvE1)

As doses de RvE1 utilizadas na curva dose resposta foram 57, 285 e 570 pmol (20, 100 e 200 ng, respectivamente). Para isso, foi feita uma solução estoque de RvE1 de 20 µg/mL em etanol, a partir da qual foram retiradas alíquotas para fazer as soluções com as doses citadas. Tanto a solução estoque quanto as alíquotas foram mantidas a -80°C. Antes das injeções, as alíquotas foram descongeladas e então diluídas em salina, para obtenção da dose desejada.

12. Serotonina (5-HT)

As doses de 5-HT utilizadas na curva dose resposta foram 5 e 24 nmol (1 e 5 µg, respectivamente). Para isso, foi feita uma solução estoque de 5-HT de 500 µg/mL em salina fisiológica estéril, a partir da qual foram retiradas alíquotas para fazer as soluções com as doses citadas. Tanto a solução estoque quanto as alíquotas foram mantidas a -20°C. Antes das injeções, as alíquotas foram descongeladas e então diluídas em salina, para obtenção da dose desejada.

13. Substância P (SP)

As doses de SP utilizadas na curva dose resposta foram 0,7, 4,0 e 37 nmol (1, 5 e 50 µg, respectivamente). Para isso, foi feita uma solução estoque de SP de 500 µg/mL em salina fisiológica estéril, a partir da qual foram retiradas alíquotas para fazer as soluções com as doses citadas. Tanto a solução estoque quanto as alíquotas foram mantidas a -20°C. Antes das injeções, as alíquotas foram descongeladas e então diluídas em salina, para obtenção da dose desejada.

14. U-75302

O U-75302, um antagonista seletivo do receptor BLT1 (receptor 1 de leucotriena B₄), foi utilizado na dose de 8 nmol (3 µg) (ARITA *et al.*, 2007; GOMIDES *et al.*, 2012). Para isso, foi feita uma solução estoque de U-75302 de 500 µg/mL em etanol, a partir da qual foram retiradas alíquotas para fazer as soluções com a dose citada. Tanto a solução estoque quanto as alíquotas foram mantidas a -20°C. Antes das injeções, as alíquotas foram descongeladas e então diluídas em salina, para obtenção da dose desejada.

4.4 Vias de administração das drogas

1. Intraplantar (i.pl.)

Os agentes flogogênicos (carragenina, histamina, serotonina, substância P e prostaglandina E₂), os agentes sob teste de atividade anti-inflamatória e antinociceptiva (resolvinas E1, resolvinas D1 e protectina DX), assim como os antagonistas (U-75302, GW 1100 e AH 7614) foram todos administrados

subcutaneamente na superfície plantar da pata posterior direita do rato, em um volume de 0,1 mL.

2. Subcutânea (s.c.)

Os agentes anti-inflamatórios e/ou analgésicos utilizados como padrão de referência (indometacina, celecoxibe e dexametasona) foram administrados subcutaneamente no dorso da região cervical do animal, em um volume de 0,1 mL de solução para cada 100 g de animal.

4.5 Medidas de edema de pata

Para a avaliação do volume da pata foi utilizado o pletismômetro modelo 7140 (UGO BASILE, Itália). Esse aparelho é constituído basicamente por duas cubas interligadas (sistema de vasos comunicantes) e preenchidas com uma solução eletrolítica, além do visor digital e um pedal. O pletismômetro é utilizado para registrar o volume de líquido deslocado em resposta à introdução da pata de animais experimentais em uma das cubas do sistema. A outra cuba contém um transdutor capaz de detectar, de forma precisa, pequenas quantidades de líquido deslocado, cujo valor é indicado no visor digital em mililitros (mL).

Na realização do teste, faz-se a contenção do animal em posição vertical com uma das mãos do experimentador, enquanto a pata a ser estudada é mergulhada em uma das cubas do aparelho conforme representado na Figura 7. Quando a pata do animal é introduzida na cuba de medida até a articulação tíbio-társica, o pedal é pressionado pelo experimentador, que fixa, dessa forma, o valor do volume observado no visor digital. É importante ressaltar que a introdução da pata na cuba é sempre feita até a articulação tíbio-társica para que não haja diferença no volume devido a uma maior ou menor imersão da pata pelo experimentador.

Na experimentação, faz-se a medida em triplicata, do volume das patas posteriores do animal antes da administração de qualquer substância (medida do volume basal) e em intervalos definidos, de acordo com cada estímulo flogogênico utilizado, após sua administração. Calcula-se então a diferença (Δ) entre a média do

volume da pata direita e a média do volume da pata esquerda, em mL, encontrando-se assim o aumento do volume, aqui descrito como edema, obtido na pata para cada tempo.

Vale ressaltar que, a título de comparação, em um experimento foi realizado o cálculo do Δ como sendo a diferença entre a média do volume da pata para cada tempo após a administração do estímulo flogogênico e a média do volume basal, ambos da pata direita, encontrando-se assim o edema obtido na pata para cada tempo.



Figura 7. Introdução da pata do rato na cuba do pletismômetro para medida do edema (Retirada de UGO BASILE - Plethysmometer).

4.6 Medida de desenvolvimento de nocicepção na pata de ratos

Para realizar a medida do limiar nociceptivo foi utilizado o teste de retirada de pata submetida à compressão, originalmente descrito por Randall & Selitto (1957). Esse teste se baseia na utilização de um analgesímetro modelo 7200 (UGO BASILE, Itália), aparato capaz de medir a sensibilidade de ratos à pressão exercida na superfície de suas patas, por um peso (em gramas) cujo valor aumenta a uma taxa constante, através de um dispositivo movido por um motor (Figura 8).



Figura 8. Analgesímetro - aparato utilizado para realizar a medida do limiar nociceptivo na pata de ratos.

Na realização do teste, faz-se a contenção do animal em posição horizontal sobre a bancada com uma das mãos do experimentador, enquanto a superfície plantar da pata a ser estudada é exposta e posicionada sob a parte compressora do aparelho, como representado na Figura 9.



Figura 9. Pata do rato submetida à parte compressora do analgesímetro para medida do limiar nociceptivo em resposta ao estímulo mecânico aplicado à superfície plantar.

Ao colocar a pata do animal na parte compressora, o experimentador aciona um pedal e a intensidade da pressão exercida sobre a pata aumenta a uma taxa constante de 32 g/s. Ao observar uma resposta comportamental nociceptiva típica

do animal, caracterizada pela retirada ou tremor da pata, taquicardia e pêlo eriçado, o experimentador desaciona o pedal e verifica, na escala numérica do aparelho, a quantidade de peso suportada pelo animal (em gramas), definida então, como o limiar nociceptivo. A escala numérica do aparelho é expressa como 20 g/cm da régua.

É importante salientar que o animal passa por uma ambientalização ao aparelho no dia anterior ao teste. Esse processo consiste em submeter a pata do animal ao aparelho dez vezes, até que ele não apresente uma reação de fuga à condição aversiva a que foi exposto. Dessa forma, no dia do teste o animal apresentará o movimento de retirada da pata devido a uma resposta nociceptiva e não como fuga à condição aversiva imposta.

No dia do experimento, faz-se a medida em triplicata, do limiar nociceptivo das patas posteriores do animal antes da administração de qualquer substância (medida do limiar nociceptivo basal) e em intervalos definidos, de acordo com cada estímulo flogogênico utilizado, após sua administração. Calcula-se então a diferença (Δ) entre a média do limiar nociceptivo da pata direita e a média do limiar nociceptivo da pata esquerda, em gramas, encontrando-se assim o limiar nociceptivo obtido na pata para cada tempo.

Assim como para a medida de edema, realizou-se um experimento calculando o Δ como sendo a diferença entre a média do limiar nociceptivo da pata para cada tempo após a administração do estímulo flogogênico e a média do limiar nociceptivo basal, ambos da pata direita, encontrando-se assim o limiar nociceptivo obtido na pata para cada tempo.

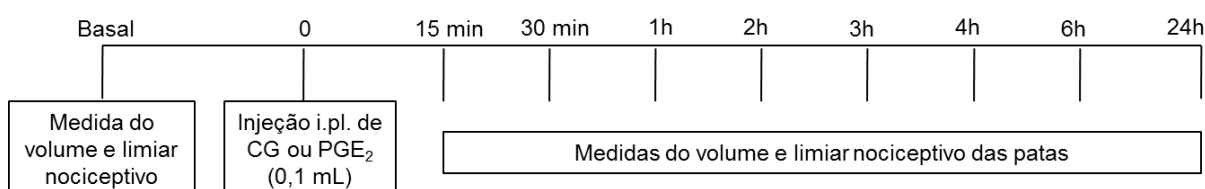
4.7 Protocolo experimental

4.7.1 Estímulos flogogênicos

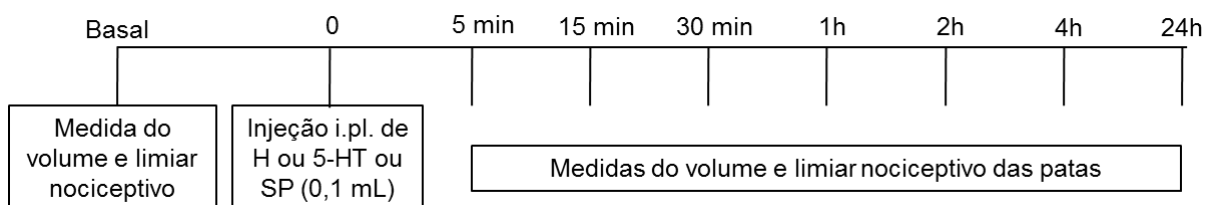
Nos experimentos utilizando a carragenina e a prostaglandina E₂ fez-se a medida do volume e limiar nociceptivo basal (antes da administração de qualquer

substância) das patas posteriores do animal e também nos tempos 15 e 30 min, 1, 2, 3, 4, 6 e 24 h após a injeção i.pl. do estímulo no tempo zero (Esquema 1). É importante salientar, que a curva dose-resposta à carragenina também foi realizada com ratos Wistar, da mesma maneira como explicado para a linhagem Holtzman, para comparação entre as linhagens.

Para os experimentos utilizando a histamina, serotonina e substância P foi realizado o mesmo procedimento descrito acima, porém a medida do volume e limiar nociceptivo após a injeção do estímulo foi feita nos tempos 5, 15 e 30 min, 1, 2, 4 e 24 h (Esquema 2).



Esquema 1. Escala temporal de avaliação do efeito da carragenina e prostaglandina E₂ na indução de edema e nocicepção na pata de ratos.

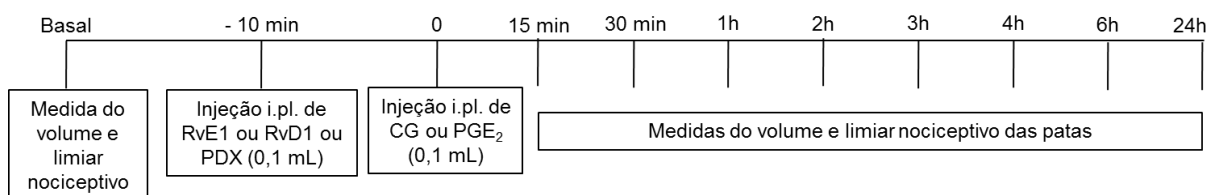


Esquema 2. Escala temporal de avaliação do efeito da histamina, serotonina e substância P na indução de edema e nocicepção na pata de ratos.

4.7.2 Agentes sob teste de atividade anti-inflamatória e antinociceptiva

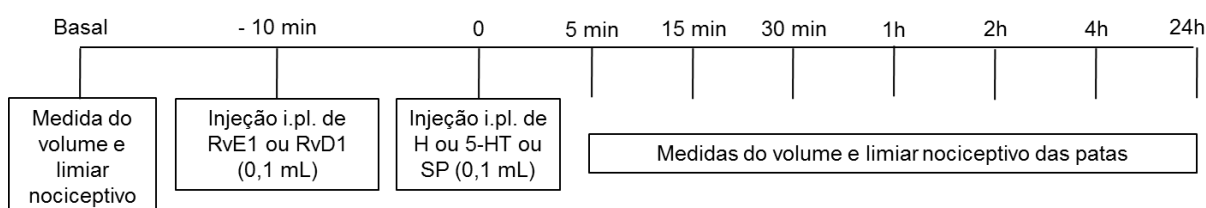
Nos experimentos utilizando a resolvina E1, resolvina D1 e a protectina DX procedeu-se conforme descrito no item 4.7.1, e a administração desses lípides foi realizada 10 minutos antes da injeção do agente flogogênico no tempo zero. Os tempos de medida do volume e limiar nociceptivo das patas utilizando a carragenina

e a prostaglandina E_2 como agente flogogênico estão apresentados no Esquema 3 e, para os demais agentes flogogênicos, no Esquema 4.



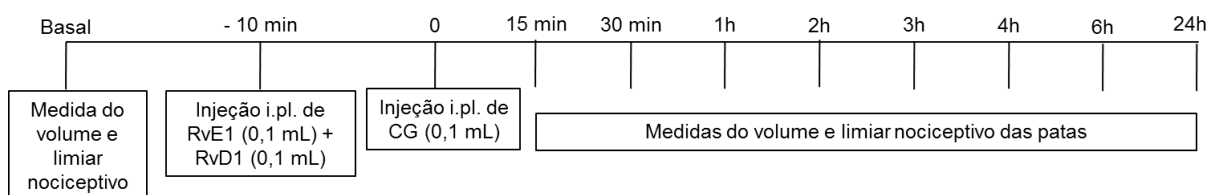
Esquema 3. Escala temporal de avaliação do efeito da RvE1, RvD1 e PDX sobre o edema e nocicepção induzidos por carragenina ou prostaglandina E_2 na pata de ratos.

É importante salientar que, a título de comparação da resposta entre linhagens diferentes, foram realizados experimentos com a RvE1 e a RvD1 frente ao edema e nocicepção induzidos por carragenina em ratos Wistar, da mesma maneira como explicado para a linhagem Holtzman.



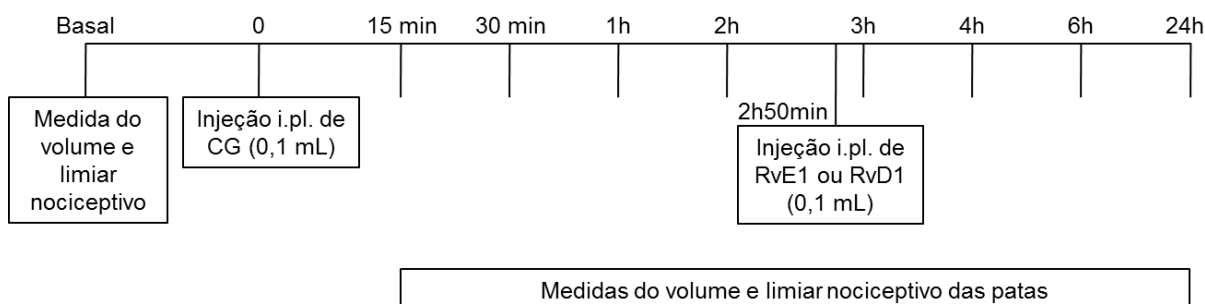
Esquema 4. Escala temporal de avaliação do efeito da RvE1 e RvD1 sobre o edema e nocicepção induzidos por histamina, serotonina ou substância P na pata de ratos.

Também foi realizado um experimento para verificar o efeito da combinação de resolvina E1 e resolvina D1 frente ao edema e nocicepção induzidos por carragenina. Para isso, procedeu-se como descrito anteriormente, sendo que 10 minutos antes da injeção da carragenina, foi administrado por via i.pl. 0,1 mL de RvE1 imediatamente seguido de 0,1 mL de RvD1 na pata posterior direita do rato. Os tempos de medida do volume e limiar nociceptivo das patas estão apresentados no Esquema 5.



Esquema 5. Escala temporal de avaliação do efeito da combinação de RvE1 e RvD1 sobre o edema e nocicepção induzidos por carragenina na pata de ratos.

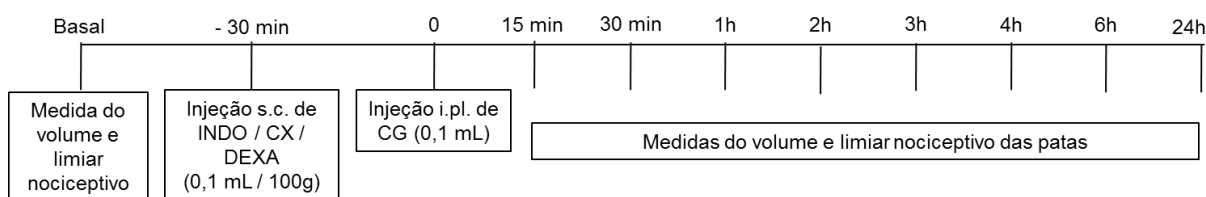
Além disso, o efeito do pós-tratamento com a resolvina E1 e a resolvina D1 frente ao edema e nocicepção induzidos por carragenina também foi estudado. Para isso, procedeu-se conforme descrito no item 4.7.1, sendo que a administração da RvE1 e da RvD1 foi realizada após 2h50 min da injeção de carragenina (Esquema 6).



Esquema 6. Escala temporal de avaliação do efeito do pós-tratamento com RvE1 e RvD1 sobre o edema e nocicepção induzidos por carragenina na pata de ratos.

4.7.3 Drogas anti-inflamatórias e/ou analgésicas utilizadas como padrão de referência nos ensaios de edema e nocicepção à carragenina

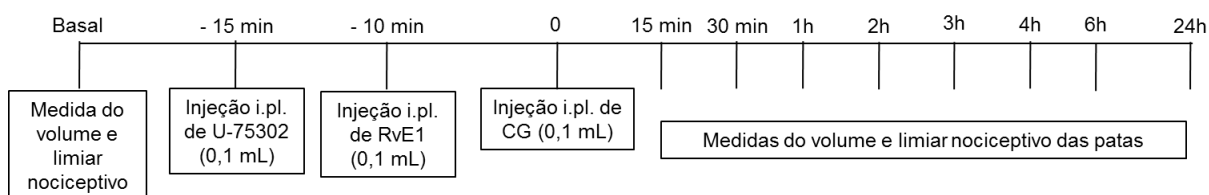
Nos experimentos utilizando a indometacina, o celecoxibe e a dexametasona procedeu-se conforme descrito no item 4.7.1, sendo que a administração s.c. desses fármacos foi realizada 30 minutos antes da injeção da carragenina. Os tempos de medida do volume e limiar nociceptivo das patas estão apresentados no Esquema 7.



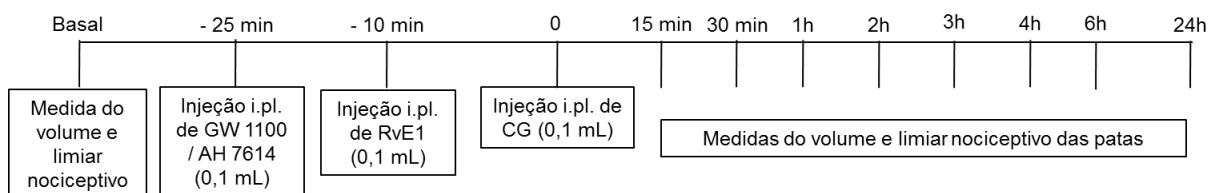
Esquema 7. Escala temporal de avaliação do efeito da indometacina, celecoxibe e dexametasona sobre o edema e nocicepção induzidos por carragenina na pata de ratos.

4.7.4 Estudo do envolvimento de receptores específicos nas ações da resolvina E1

Nos experimentos utilizando os antagonistas (U-75302, GW 1100 e AH 7614) procedeu-se conforme descrito no item 4.7.1, sendo que a administração i.pl. desses fármacos foi realizada no tempo de 5 (no caso do U-75302) e 15 minutos (para os demais) antes da injeção de RvE1, que por sua vez foi administrada 10 minutos antes da carragenina. Os tempos de medida do volume e limiar nociceptivo das patas estão apresentados no Esquema 8 para o U-75302 e no Esquema 9 para o GW 1100 e AH 7614.



Esquema 8. Escala temporal de avaliação do efeito de U-75302 sobre o edema e nocicepção induzidos por carragenina mediante o pré-tratamento com RvE1 na pata de ratos.



Esquema 9. Escala temporal de avaliação do efeito de GW 1100 e AH 7614 sobre o edema e nocicepção induzidos por carragenina mediante o pré-tratamento com RvE1 na pata de ratos.

4.8 Análise cromatográfica dos padrões de resolvina E1, resolvina D1 e protectina DX empregando cromatografia líquida de alta eficiência associada a detector de absorvância no ultravioleta visível com arranjo de fotodiodos

Para certificar a pureza dos padrões dos compostos de interesse em estudo (resolvina E1, resolvina D1 e protectina DX) as três substâncias foram submetidas à análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (ARITA *et al.*, 2006; SUN *et al.*, 2007; CHEN *et al.*, 2009). Para essa análise foi empregado um cromatógrafo acoplado a um detector de absorvância no ultravioleta e visível com arranjo de fotodiodos (UV-VIS-DAD), conforme descrito a seguir. Estes estudos foram realizados no Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da UFMG sob a orientação dos Professores Rodinei Augusti e Ricardo Mathias Orlando.

A separação foi realizada em um cromatógrafo líquido de alta eficiência Finnigan SurveyorPlus da marca ThermoScientific equipado com auto injetor, forno para coluna e detector de absorvância no ultravioleta e visível com arranjo de fotodiodos (UV-VIS-DAD). A coluna empregada foi a coluna Zorbax Eclipse Plus (Agilent, EUA) a base de sílica híbrida de fase reversa (C18) de dimensões de 150 x 4,6 mm, e partículas de 5,0 μm .

A fase móvel consistiu de uma mistura de água e acetonitrila ambos contendo ácido fórmico no teor de 0,01% (v/v). O modo de eluição empregado foi o gradiente apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Gradiente empregado na análise cromatográfica dos padrões resolvina E1, resolvina D1 e protectina DX

| Tempo (minutos) | % de água contendo 0,1% (v/v) de ácido fórmico | % de acetonitrila contendo 0,1% (v/v) de ácido fórmico |
|------------------------|---|---|
| 0,0 | 90 | 10 |
| 15,0 | 10 | 90 |
| 20,0 | 10 | 90 |
| 20,1 | 90 | 10 |
| 26,0 | 90 | 10 |

A eluição foi realizada a uma vazão de 1,0 mL / min, com o forno da coluna ajustado para 40 °C. Os padrões analisados foram preparados em solução de etanol:solução cloreto de sódio 0,9% (1/ 10, v/v) na concentração final de 1 µg / mL de cada um dos padrões.

Um volume de 20 µL de cada padrão foi injetado no mínimo três vezes no sistema cromatográfico e o espectro na faixa de 225 a 325 nm foi obtido durante toda a corrida cromatográfica que durou 26 minutos no total.

A obtenção dos espectros de absorção assim como os cromatogramas e tempos de retenção dos compostos analisados foram obtidos utilizando o software de tratamento de dados cromatográficos Xcalibur da ThermoScientific.

4.9 Análise estatística

Os animais foram distribuídos aleatoriamente entre os grupos experimentais e controle. O programa GraphPad Prism 5.00 foi utilizado para a confecção dos gráficos e para a realização da análise estatística.

Os resultados obtidos foram apresentados como a média \pm erro padrão da média (EPM) de cada grupo de animais. Para os gráficos temporais, os dados foram submetidos à análise de variância *two-way* ANOVA, seguida pelo teste de Bonferroni. Para os gráficos que correspondem à área sob a curva (AUC), os dados foram submetidos ao teste *t de Student*. Foram considerados estatisticamente significativos valores de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Padronização da resposta edematogênica e nociceptiva à carragenina na pata de ratos

Inicialmente, foi estabelecido o padrão de resposta edematogênica e nociceptiva à carragenina na pata de ratos, com o objetivo de determinar a dose desse estímulo a ser utilizada em experimentos posteriores.

Como pode ser observado na Figura 10, a carragenina nas doses de 100, 500 e 1000 μg / pata induziu edema e nocicepção de maneira dose-dependente nos animais de experimentação e o pico do efeito edematogênico e nociceptivo ocorreu entre a terceira e a quarta hora (Figura 10a e 10b, respectivamente).

Para o cálculo dos valores médios de edema e nocicepção em cada tempo, considerou-se o cálculo da diferença (Δ) entre a média do edema e do limiar nociceptivo da pata direita e a média do edema e do limiar nociceptivo da pata esquerda para cada tempo, conforme apresentado na Figura 10. A Figura 11 apresenta o perfil edematogênico e nociceptivo utilizando a diferença entre os valores da média do edema e do limiar nociceptivo em cada tempo e a média do edema e do limiar nociceptivo basal da pata correspondente. Embora a tendência da resposta média de edema e nocicepção sob as duas condições se mostrasse semelhante, optamos pela descrição da resposta edematogênica e nociceptiva conforme apresentado na Figura 10, nos resultados subsequentes.

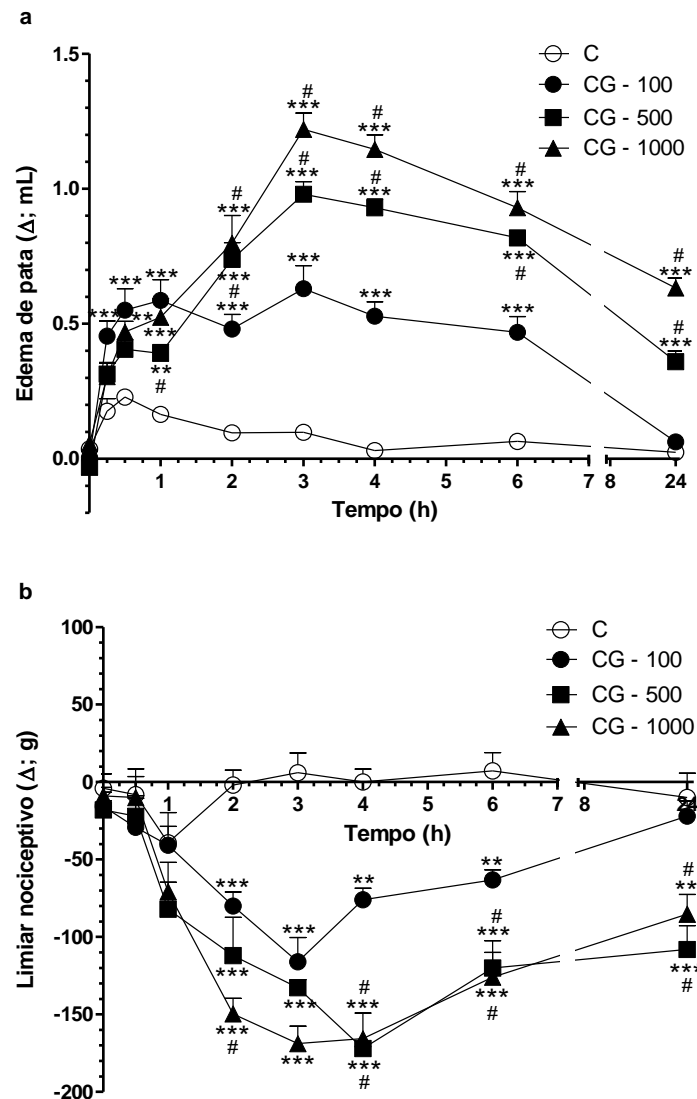


Figura 10. Curva dose-resposta de edema e nocicepção induzidos por carragenina na pata traseira de ratos Holtzman. Carragenina (100, 500 e 1000 $\mu\text{g}/0,1\text{ mL}$) foi injetada subcutaneamente na pata posterior direita do rato. Nos animais controle (C) injetou-se 0,1 mL de salina fisiológica estéril. Os dados são apresentados como a média \pm EPM da diferença de volume (edema) em **(a)** e da diferença na latência de retirada da pata em resposta ao estímulo mecânico em **(b)** entre a pata direita e a esquerda nos diferentes tempos de medida. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. # $p < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa em relação a menor dose (100 μg). $N=5$ / grupo.

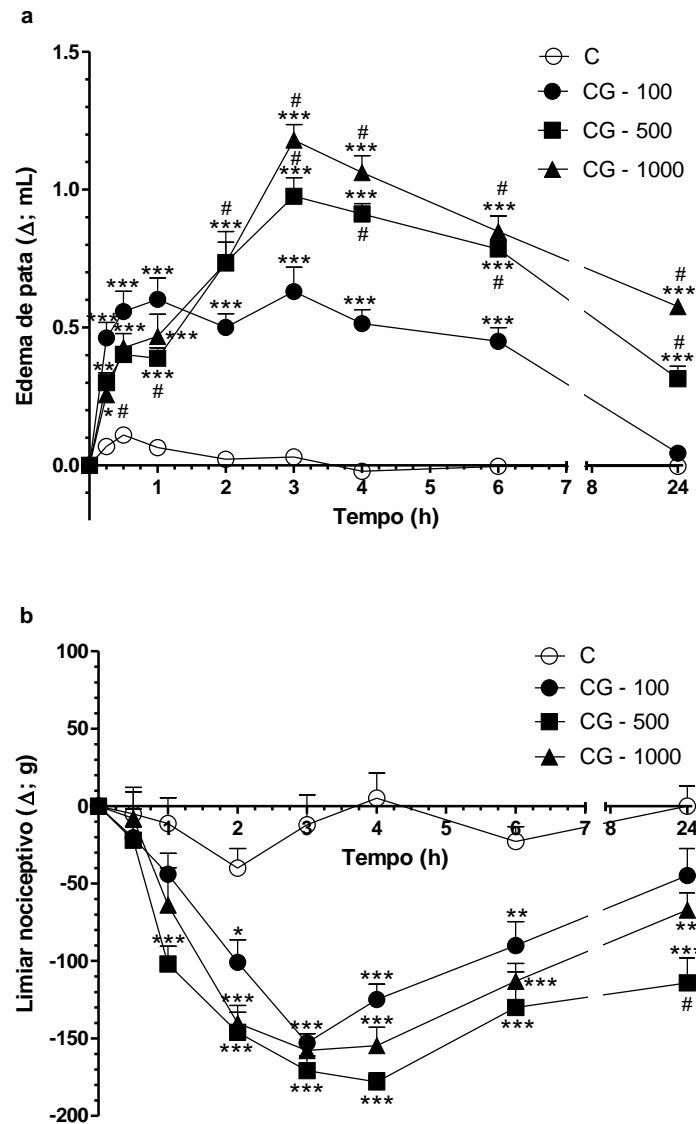


Figura 11. Curva dose-resposta de edema e nociceção induzidos por carragenina na pata traseira de ratos Holtzman tendo como padrão a resposta basal dos animais. Carragenina (100, 500 e 1000 μg / 0,1 mL) foi injetada subcutaneamente na pata posterior direita do rato. Nos animais controle (C) injetou-se 0,1 mL de salina fisiológica estéril. Os dados são apresentados como a média \pm EPM da diferença de volume (edema) em **(a) e da diferença na latência de retirada da pata em resposta ao estímulo mecânico em **(b)** entre a pata direita após a administração do estímulo flogogênico e a pata direita basal nos diferentes tempos de medida. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ indica diferença estatisticamente**

significativa em relação ao grupo controle. # $p < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa em relação a menor dose (100 μg). N=5 / grupo.

O mesmo padrão de resposta edematogênica e nociceptiva à carragenina encontrado para os ratos Holtzman também foi verificado em ratos Wistar. A carragenina nas doses utilizadas induziu edema e nocicepção de maneira dose-dependente com pico de efeito edematogênico e nociceptivo entre a terceira e quarta horas (Figura 12). Entretanto, uma nítida diferença de intensidade de hiperalgisia foi detectada, sendo esta menor nos ratos Wistar, comparados com os ratos Holtzman, indicando maior sensibilidade hiperalgésica desta linhagem à carragenina, em relação aos ratos Wistar. É importante salientar que na maior parte do presente estudo, utilizou-se a linhagem Holtzman como referência.

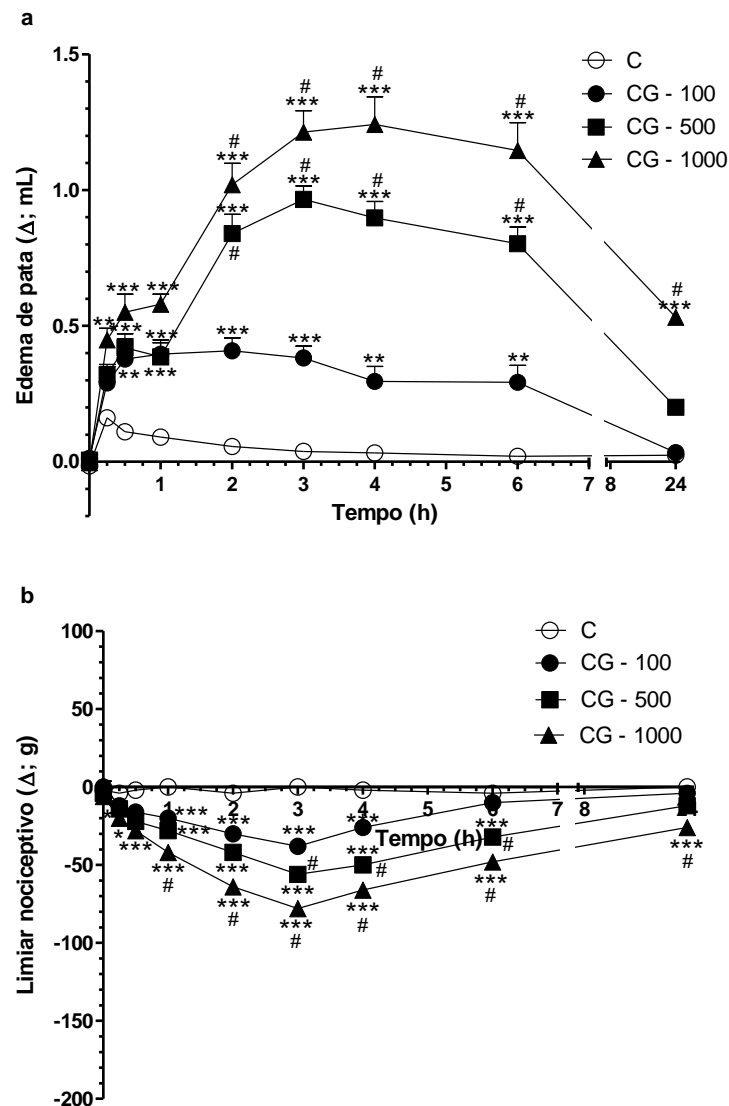


Figura 12. Curva dose-resposta de edema e nocicepção induzidos por carragenina na pata traseira de ratos Wistar. Carragenina (100, 500 e 1000 μg / 0,1 mL) foi injetada subcutaneamente na pata posterior direita do rato. Nos animais controle (C) injetou-se 0,1 mL de salina fisiológica estéril. Os dados são apresentados como a média \pm EPM da diferença de volume (edema) em **(a)** e da diferença na latência de retirada da pata em resposta ao estímulo mecânico em **(b)** entre a pata direita e a esquerda nos diferentes tempos. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. # $p < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa em relação a menor dose (100 μg). N=5 / grupo.

5.2 Efeito anti-inflamatório e antinociceptivo das resolvinas E1 e D1 e da protectina DX

Atendendo nossos objetivos iniciais, foram realizados ensaios com os lípidos derivados do ácido eicosapentaenóico (resolvina E1) e do ácido docosahexaenóico (resolvina D1 e protectina DX), com a finalidade de verificar o efeito produzido pelo tratamento com esses lípidos em modelos de edema e hiperalgesia da pata de ratos induzido por diferentes estímulos flogogênicos, entre eles: histamina, serotonina, substância P e prostaglandina E₂. Curvas dose-resposta de edema e de hiperalgesia a esses agentes foram construídas previamente para a escolha das doses efetivas de referência, que por motivos de clareza, não serão apresentadas neste trabalho.

5.2.1 Resolvina E1

5.2.1.1 Carragenina

Inicialmente, foi construída uma curva dose-resposta utilizando o pré-tratamento com a RvE1 frente ao edema e nocicepção induzidos por carragenina (Figura 13). O tempo utilizado para o pré-tratamento, 10 minutos antes da administração do agente flogogênico, bem como a dose inicial de RvE1 (57 pmol), foram obtidos de trabalhos na literatura, como o de XU *et al.*, 2010. As doses utilizadas foram 57 (20 ng), 285 (100 ng) e 570 pmol (200 ng) por pata.

Analisando-se o efeito do pré-tratamento com diferentes doses de RvE1 frente ao edema induzido por carragenina, pode-se observar que a dose de 57 pmol (Figura 13a) não alterou a resposta e que as doses de 285 e 570 pmol (Figuras 13c e 13e, respectivamente) reduziram significativamente o edema induzido por carragenina. A redução do edema com a dose de 285 pmol se iniciou com 1 h após a administração da carragenina, apresentando 42% de redução na terceira hora, enquanto na dose de 570 pmol a redução do edema teve início com 2 h e foi obtido 32% de redução na terceira hora. Com relação à nocicepção, pode-se observar que

apenas a dose de 285 pmol foi capaz de induzir redução da resposta hiperalgésica à carragenina, sendo essa uma redução de 53% na nocicepção após a terceira hora da administração desse agente (Figura 13d).

Com base nos resultados descritos acima, fixou-se a dose de 285 pmol (100 ng) de RvE1 para a realização dos ensaios subsequentes, já que foi nesta dose que houve a maior redução do edema e da nocicepção induzidos pela carragenina.

É importante ressaltar que a administração de RvE1 sem a presença de um estímulo flogogênico não alterou as respostas edematogênica e nociceptiva fisiológicas nos animais de experimentação, conforme apresentado na Figura 14.

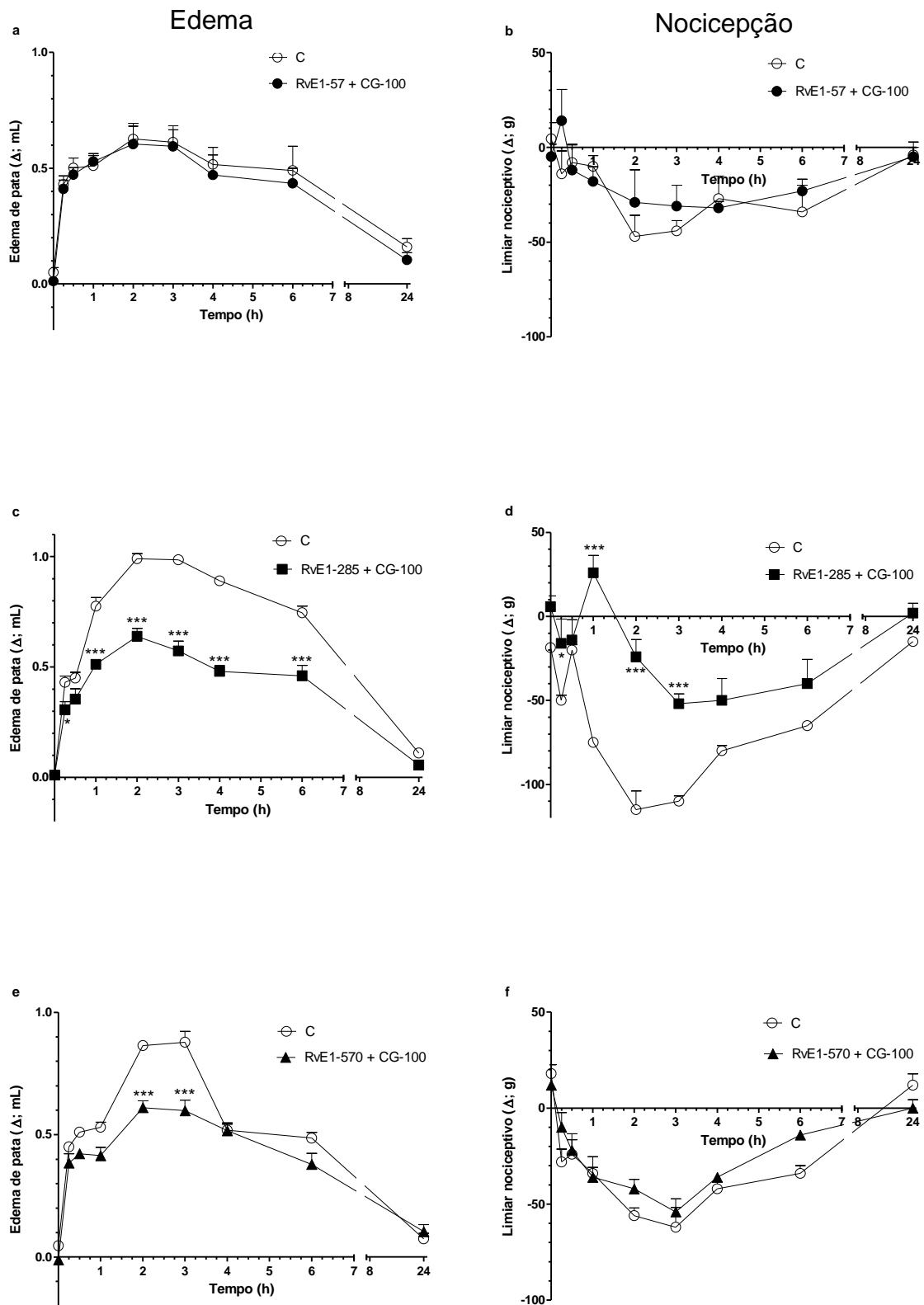


Figura 13. Efeito dose-dependente da resolvina E1 sobre o edema e nociceção induzidos por carragenina na pata de ratos. Resolvina E1 (RvE1 57, 285 e 570 pmol / 0,1 mL) foi administrada 10 minutos antes da carragenina (100 µg /

0,1 mL), ambas injetadas por via subcutânea na pata posterior direita do rato. Os animais do grupo controle (C) receberam o veículo da RvE1 no mesmo tempo e pela mesma via, e a carragenina na zero hora. Em **(a)** e **(b)** o veículo utilizado foi o etanol 1%, em **(c)** e **(d)** etanol 5%, e em **(e)** e **(f)** etanol 10%. Os dados são apresentados como a média \pm EPM da diferença de volume (edema) em **(a)**, **(c)** e **(e)** e da diferença na latência de retirada da pata em resposta ao estímulo mecânico em **(b)**, **(d)** e **(f)** entre a pata direita e a esquerda nos diferentes tempos de medida. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. N=5 / grupo.

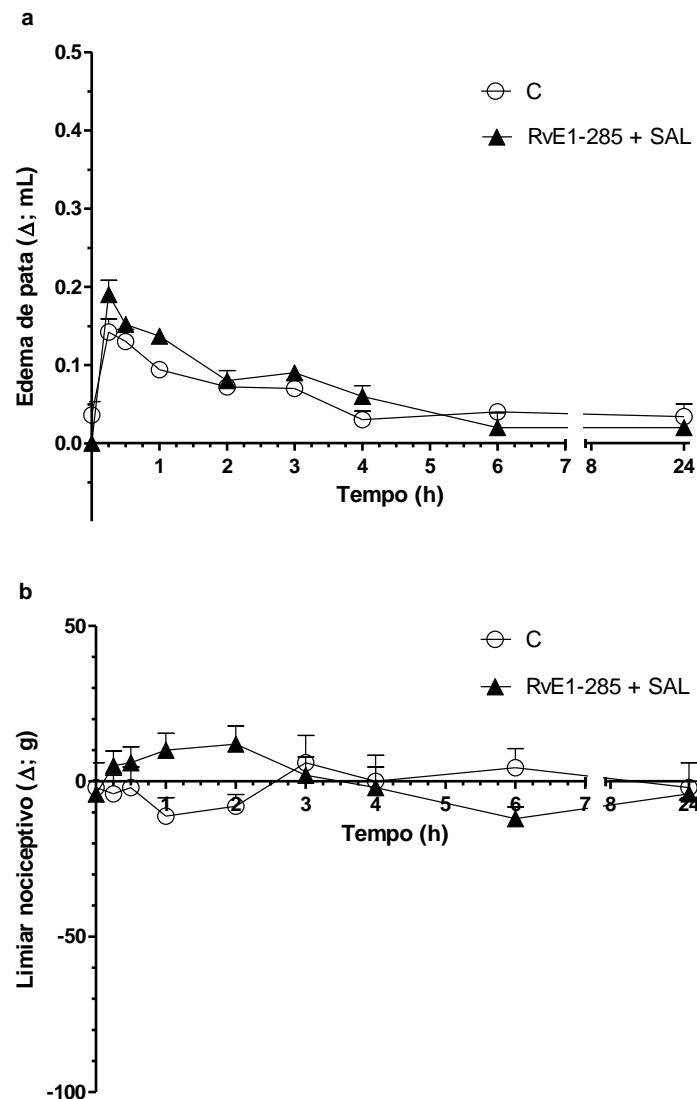


Figura 14. Efeito da administração de resolvina E1 em patas não inflamadas. Resolvina E1 (285 pmol / 0,1 mL) foi administrada 10 minutos antes da salina fisiológica estéril (SAL, 0,1 mL), ambas injetadas por via subcutânea na pata posterior direita do rato. Os animais do grupo controle (C) receberam o veículo da RvE1 (etanol 5%) no mesmo tempo e pela mesma via, e a salina na zero hora. Os dados são apresentados como a média \pm EPM da diferença de volume (edema) em **(a)** e da diferença na latência de retirada da pata em resposta ao estímulo mecânico em **(b)** entre a pata direita e a esquerda nos diferentes tempos de medida. N= 3-5.

A partir da dose estabelecida de RvE1 (285 pmol), fez-se uma comparação do efeito obtido entre as linhagens Holtzman e Wistar. Como pode ser observado na Figura 15, os ratos Wistar se mostraram menos sensíveis ao pré-tratamento com RvE1 para redução do edema e da nocicepção induzidos por 100 µg de carragenina quando comparados aos ratos Holtzman.

Verificou-se também o efeito do pré-tratamento com 285 pmol de RvE1 frente ao edema e nocicepção induzidos por uma dose maior de carragenina (500 µg), conforme apresentado na Figura 16. Como pode ser observado, a dose de 285 pmol de RvE1 foi capaz de reduzir apenas a nocicepção induzida por 500 µg de carragenina, em 56%, após 2 h da injeção de carragenina (Figura 16b).

Além do pré-tratamento com a RvE1, também foi realizado o pós-tratamento com a dose estabelecida (285 pmol) desta substância. Nesse caso, a RvE1 foi administrada 10 minutos antes da terceira hora após a administração da carragenina 100 (Figura 17) e 500 µg (Figura 18), já que após 3h a carragenina exerce o pico do seu efeito edematogênico e nociceptivo. Como pode ser observado na Figura 17, a RvE1 não reduziu a resposta edematogênica e nociceptiva à 100 µg de carragenina. No entanto, quando utilizada com 500 µg de carragenina, a RvE1 reduziu a nocicepção em 37% na terceira hora após a administração do agente flogogênico (Figura 18b).

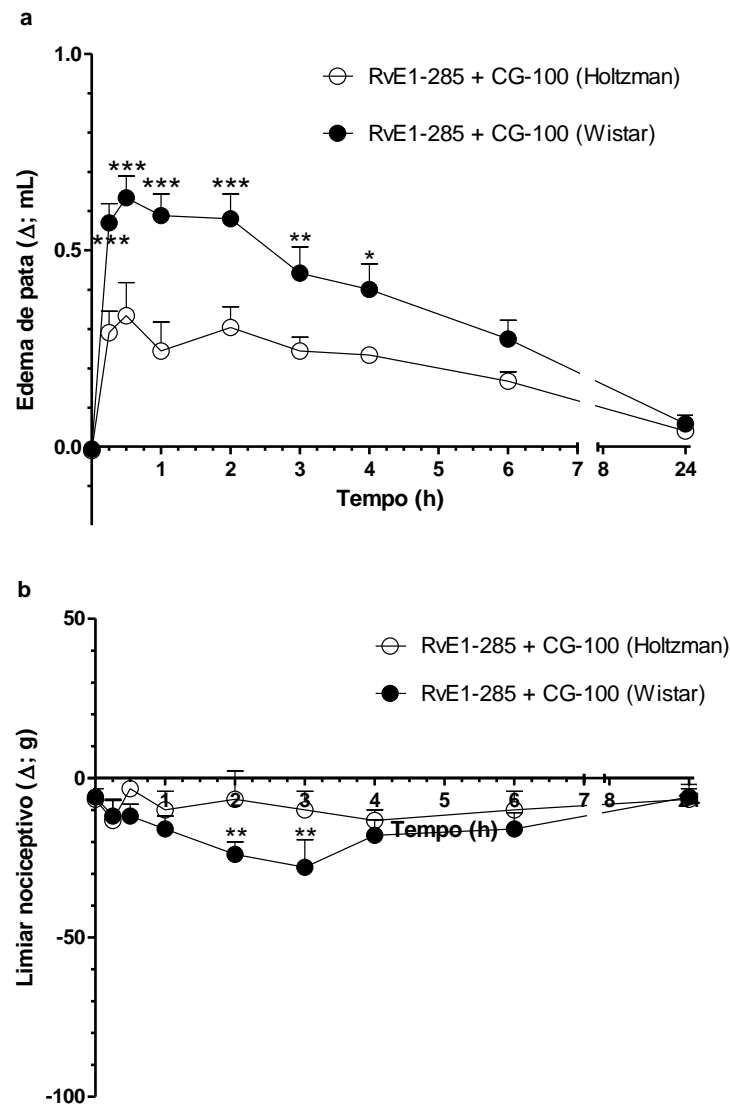


Figura 15. Comparação do efeito do pré-tratamento com resolvina E1 sobre o edema e nocicepção induzidos por carragenina na pata de ratos Holtzman e Wistar. Resolvina E1 (285 pmol / 0,1 mL) foi administrada 10 minutos antes da carragenina (100 µg / 0,1 mL), ambas injetadas por via subcutânea na pata posterior direita de ratos Holtzman e Wistar. Os dados são apresentados como a média ± EPM da diferença de volume (edema) em **(a)** e da diferença na latência de retirada da pata em resposta ao estímulo mecânico em **(b)** entre a pata direita e a esquerda nos diferentes tempos de medida. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. N=5 / grupo.

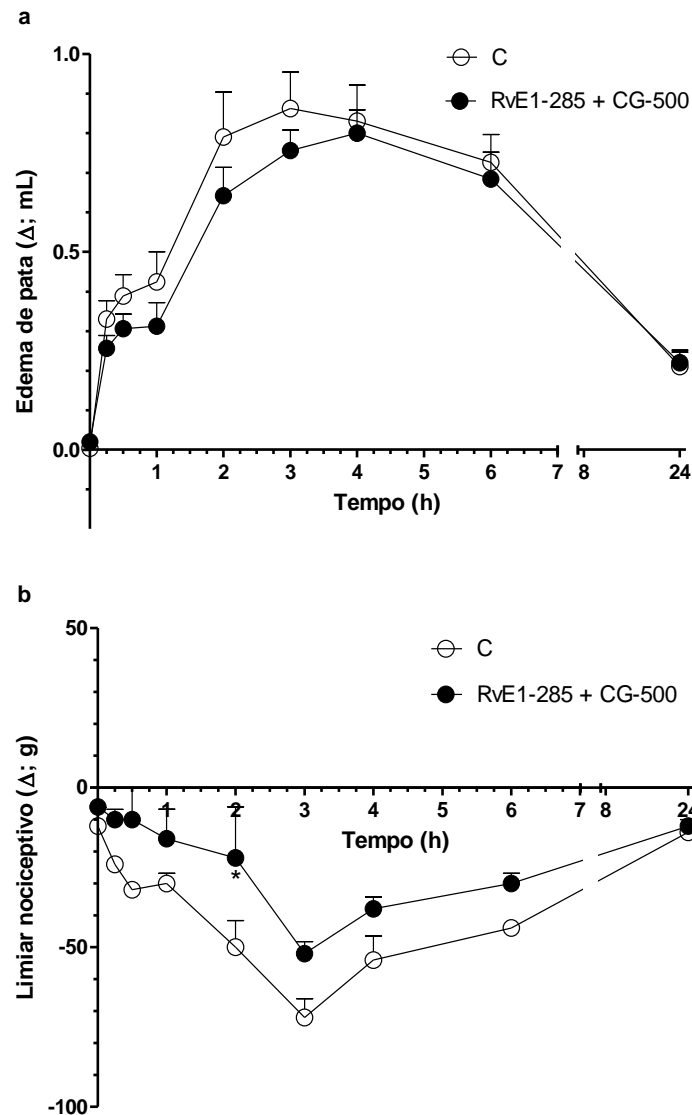


Figura 16. Efeito do pré-tratamento com resolvina E1 sobre o edema e nocicepção induzidos por 500 µg carragenina na pata de ratos. Resolvina E1 (285 pmol / 0,1 mL) foi administrada 10 minutos antes da carragenina (500 µg/ 0,1 mL), ambas injetadas por via subcutânea na pata posterior direita do rato. Os animais do grupo controle (C) receberam o veículo da RvE1 (etanol 5%) no mesmo tempo e pela mesma via, e a carragenina na zero hora. Os dados são apresentados como a média ± EPM da diferença de volume (edema) em **(a)** e da diferença na latência de retirada da pata em resposta ao estímulo mecânico em **(b)** entre a pata direita e a esquerda nos diferentes tempos de medida. * $p < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. N=5 / grupo.

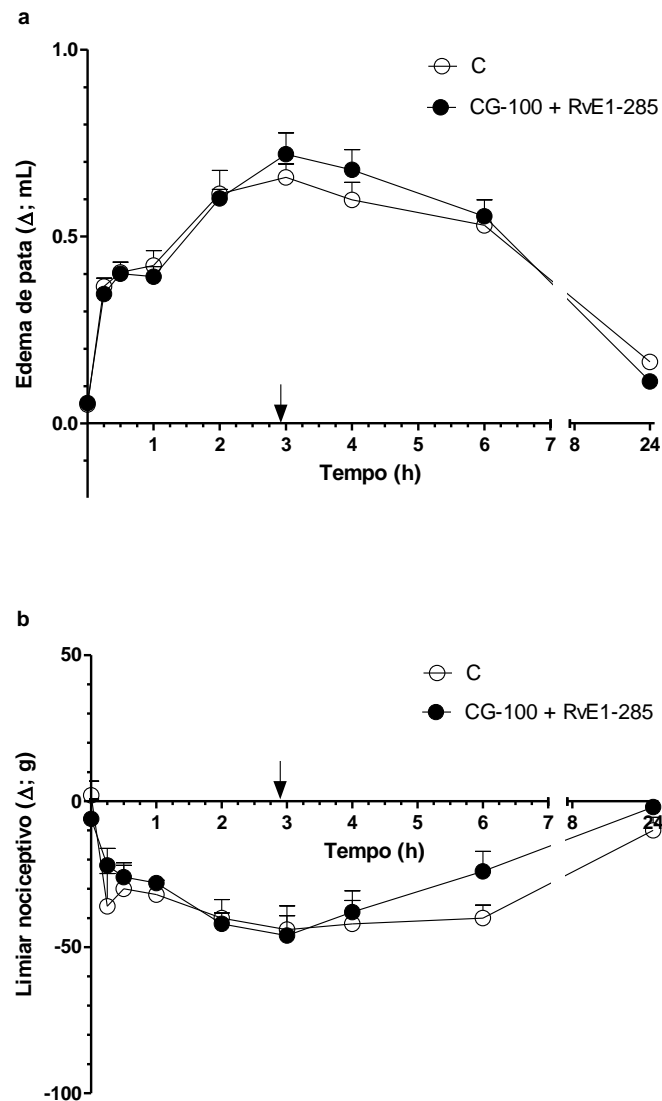


Figura 17. Efeito do pós-tratamento com resolvina E1 sobre o edema e nociceção induzidos por 100 μ g carragenina na pata de ratos. Resolvina E1 (285 pmol / 0,1 mL) foi administrada 2 h 50 min após a carragenina (100 μ g / 0,1 mL), ambas injetadas por via subcutânea na pata posterior direita do rato. Os animais do grupo controle (C) receberam o veículo da RvE1 (etanol 5%) no mesmo tempo e pela mesma via, e a carragenina na zero hora. A seta indica o momento da administração da RvE1 ou de seu veículo. Os dados são apresentados como a média \pm EPM da diferença de volume (edema) em **(a)** e da diferença na latência de retirada da pata em resposta ao estímulo mecânico em **(b)** entre a pata direita e a esquerda nos diferentes tempos de medida. N=5 / grupo.

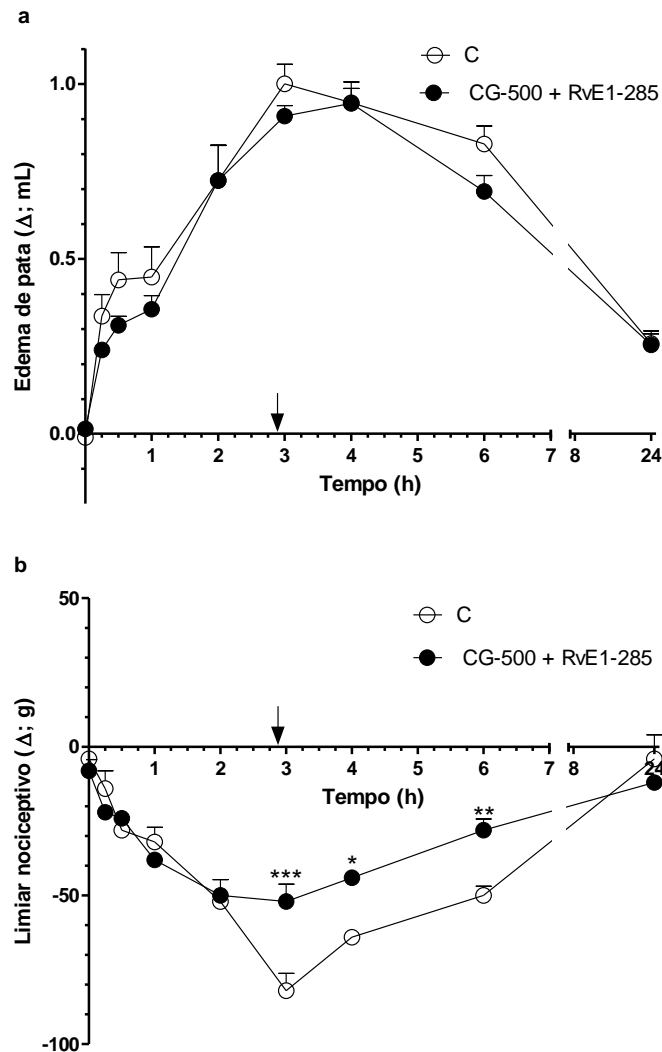


Figura 18. Efeito do pós-tratamento com resolvina E1 sobre o edema e nociceção induzidos por 500 µg carragenina na pata de ratos. Resolvina E1 (285 pmol / 0,1 mL) foi administrada 2h50min após a carragenina (500 µg / 0,1 mL), ambas injetadas por via subcutânea na pata posterior direita do rato. Os animais do grupo controle (C) receberam o veículo da RvE1 (etanol 5%) no mesmo tempo e pela mesma via, e a carragenina na zero hora. A seta indica o momento da administração da RvE1 ou de seu veículo. Os dados são apresentados como a média \pm EPM da diferença de volume (edema) em **(a)** e da diferença na latência de retirada da pata em resposta ao estímulo mecânico em **(b)** entre a pata direita e a esquerda nos diferentes tempos de medida. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. N=5 / grupo.

5.2.1.2 Histamina

O efeito do pré-tratamento com 285 pmol de RvE1 também foi verificado em patas injetadas com 109 nmol (20 µg) de histamina. Como pode ser observado na Figura 19, nessa dose a RvE1, surpreendentemente, aumentou a resposta edematogênica nas patas em 32% e concomitantemente ocorreu o aparecimento de hipoalgesia, isto é, um aumento do limiar em relação à resposta basal induzida pela histamina, ambos com 15 minutos após a administração desse agente flogogênico.

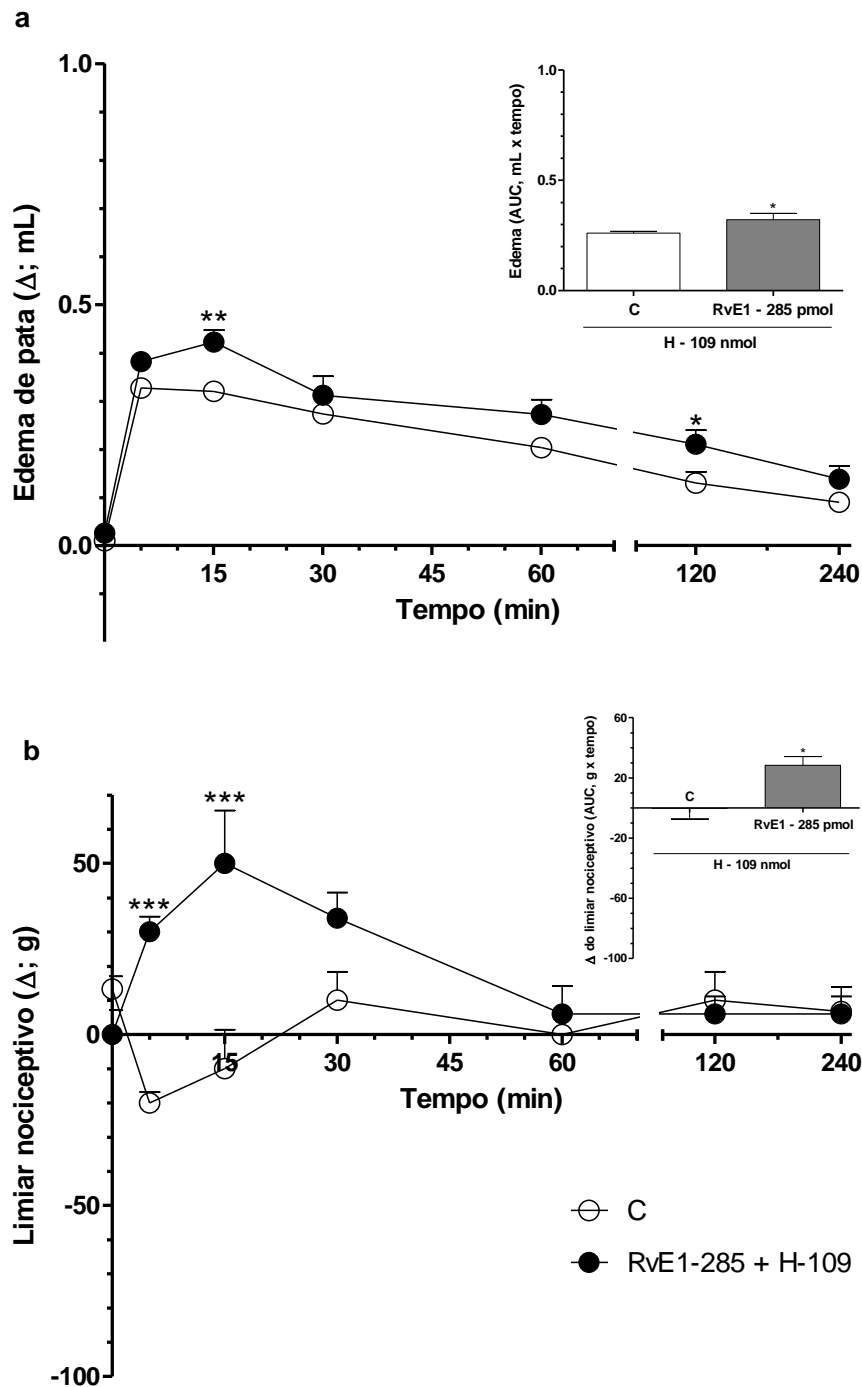


Figura 19. Efeito do pré-tratamento com resolvina E1 sobre o edema e nociceção induzidos por histamina na pata de ratos. Resolvina E1 (285 pmol / 0,1 mL) foi administrada 10 minutos antes da histamina (109 nmol / 0,1 mL), ambas injetadas por via subcutânea na pata posterior direita do rato. Os animais do grupo controle (C) receberam o veículo da RvE1 (etanol 5%) no mesmo tempo e pela mesma via, e a histamina na zero hora. Os dados são apresentados como a média \pm

EPM da diferença de volume (edema) em **(a)** e da diferença na latência de retirada da pata em resposta ao estímulo mecânico em **(b)** entre a pata direita e a esquerda nos diferentes tempos de medida. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. N=5 / grupo. Os insertos a direita mostram as mesmas respostas na pata, expressa como área sob a curva (AUC).

5.2.1.3 Serotonina

A serotonina foi o próximo mediador inflamatório estudado diante do pré-tratamento com 285 pmol de RvE1. Como pode ser observado na Figura 20, com essa dose de RvE1, a resposta edematogênica também se mostrou aumentada em 24% após 15 minutos da administração de 5 nmol (1 μ g) de serotonina, bem como ocorreu uma redução de 64% na nocicepção após 30 minutos da administração desse agente.

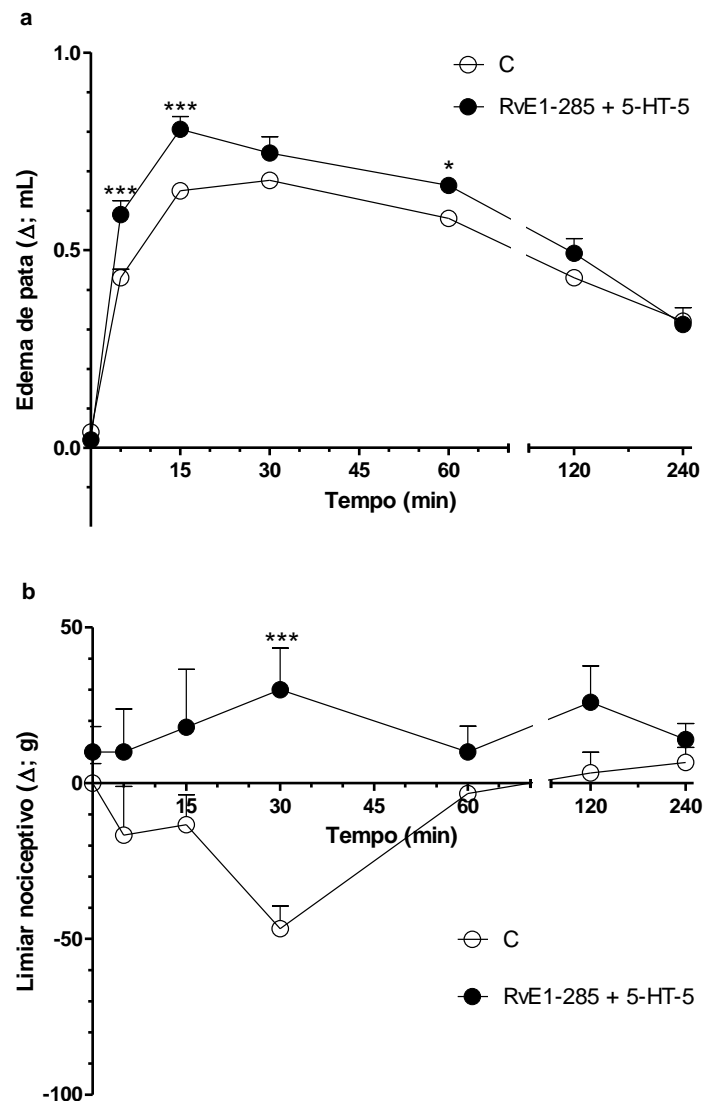


Figura 20. Efeito do pré-tratamento com resolvina E1 sobre o edema e nociceção induzidos por serotonina na pata de ratos. Resolvina E1 (285 pmol / 0,1 mL) foi administrada 10 minutos antes da serotonina (5 nmol / 0,1 mL), ambas injetadas por via subcutânea na pata posterior direita do rato. Os animais do grupo controle (C) receberam o veículo da RvE1 (etanol 5%) no mesmo tempo e pela mesma via, e a serotonina na zero hora. Os dados são apresentados como a média \pm EPM da diferença de volume (edema) em **(a)** e da diferença na latência de retirada da pata em resposta ao estímulo mecânico em **(b)** entre a pata direita e a esquerda nos diferentes tempos de medida. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. N=5 / grupo.

5.2.1.4 Substância P

O efeito do pré-tratamento com 285 pmol de RvE1 frente ao edema e nocicepção induzidos por 0,7 nmol (1 µg) de substância P também foi estudado. Como pode ser observado na Figura 21, nessa dose a RvE1 não alterou a resposta edematogênica induzida pela substância P. No entanto, promoveu o aparecimento de hipoalgesia, reduzindo em 115% a nocicepção após 5 minutos da administração desse agente.

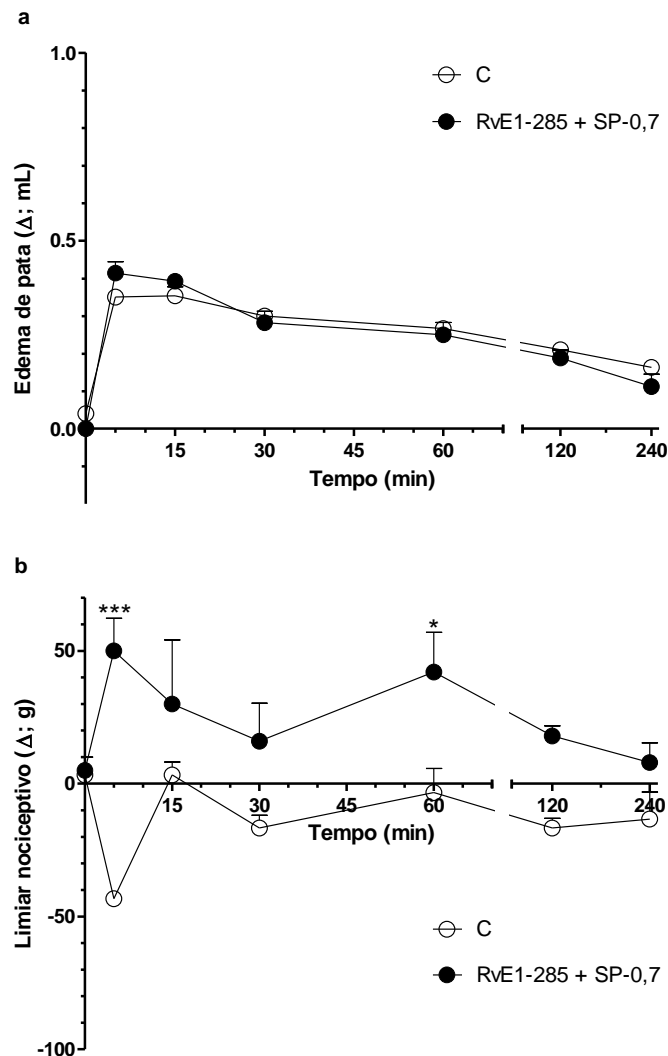


Figura 21. Efeito do pré-tratamento com resolvin E1 sobre o edema e nocicepção induzidos por substância P na pata de ratos. Resolvin E1 (285

pmol / 0,1 mL) foi administrada 10 minutos antes da substância P (0,7 nmol / 0,1 mL), ambas injetadas por via subcutânea na pata posterior direita do rato. Os animais do grupo controle (C) receberam o veículo da RvE1 (etanol 5%) no mesmo tempo e pela mesma via, e a substância P na zero hora. Os dados são apresentados como a média \pm EPM da diferença de volume (edema) em **(a)** e da diferença na latência de retirada da pata em resposta ao estímulo mecânico em **(b)** entre a pata direita e a esquerda nos diferentes tempos de medida. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. N=5 / grupo.

5.2.1.5 Prostaglandina E₂

O efeito do pré-tratamento com 285 pmol de RvE1 frente ao edema e nocicepção induzidos por 6 nmol (2 μ g) de prostaglandina E₂ foi estudado a seguir. Como pode ser observado na Figura 22, nessa dose a RvE1 não alterou a resposta edematogênica induzida pela prostaglandina E₂. No entanto, a RvE1 promoveu redução da nocicepção em 63% após 2h da administração desse agente.

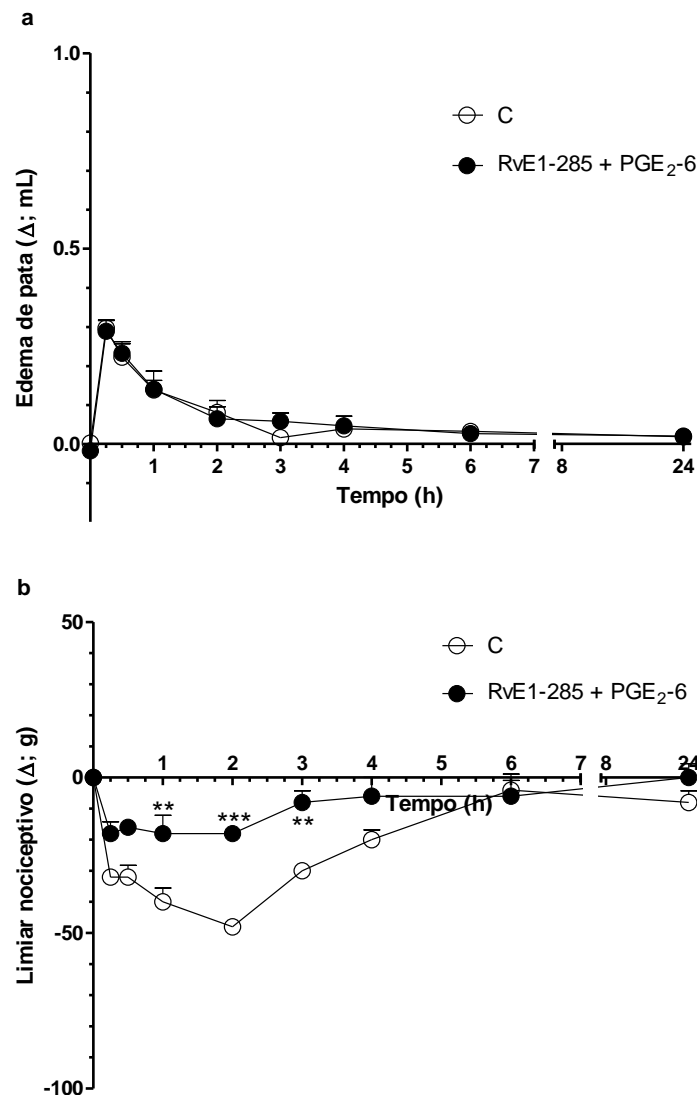


Figura 22. Efeito do pré-tratamento com resolvina E1 sobre o edema e nociceção induzidos por prostaglandina E₂ na pata de ratos. Resolvina E1 (285 pmol / 0,1 mL) foi administrada 10 minutos antes da prostaglandina E₂ (6 nmol / 0,1 mL), ambas injetadas por via subcutânea na pata posterior direita do rato. Os animais do grupo controle (C) receberam o veículo da RvE1 (etanol 5%) no mesmo tempo e pela mesma via, e a prostaglandina E₂ na zero hora. Os dados são apresentados como a média ± EPM da diferença de volume (edema) em **(a)** e da diferença na latência de retirada da pata em resposta ao estímulo mecânico em **(b)** entre a pata direita e a esquerda nos diferentes tempos de medida. ** p<0,01, ***

$p < 0,001$ indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. N=5 / grupo.

5.2.2 Resolvina D1

5.2.2.1 Carragenina

Foram construídas, também, curvas dose-resposta utilizando como pré-tratamento a RvD1 frente ao edema e nocicepção induzidos por carragenina (Figura 23). A dose inicial utilizada foi estimada a partir de uma equivalência molar com a dose eficaz de RvE1, ou seja, 285 pmol. Para o desenvolvimento da curva dose-resposta utilizaram-se então, as seguintes doses: 285 (107 ng), 570 (214 ng) e 1140 pmol (430 ng) por pata.

Analisando-se o efeito do pré-tratamento com diferentes doses de RvD1 frente ao edema e nocicepção induzidos por carragenina, pode-se observar que apenas a dose de 570 pmol foi capaz de induzir resposta significativa tanto no edema quanto na nocicepção. A redução do edema teve início com 15 min após a administração da carragenina, apresentando 29% de redução na segunda hora. Já a redução da nocicepção se iniciou com 30 min após a administração da carragenina, sendo obtida uma redução de 39% na segunda hora.

Com base nos resultados descritos acima e apresentados na Figura 23, fixou-se a dose de 570 pmol (214 ng) de RvD1 para a realização dos ensaios subsequentes, pois foi nesta dose que houve redução do edema e da nocicepção induzidos por carragenina.

É importante ressaltar que, assim como na administração de RvE1, a injeção de RvD1 sem a presença de um estímulo flogogênico não alterou as respostas edematogênica e nociceptiva fisiológicas nos animais de experimentação, conforme apresentado na Figura 24.

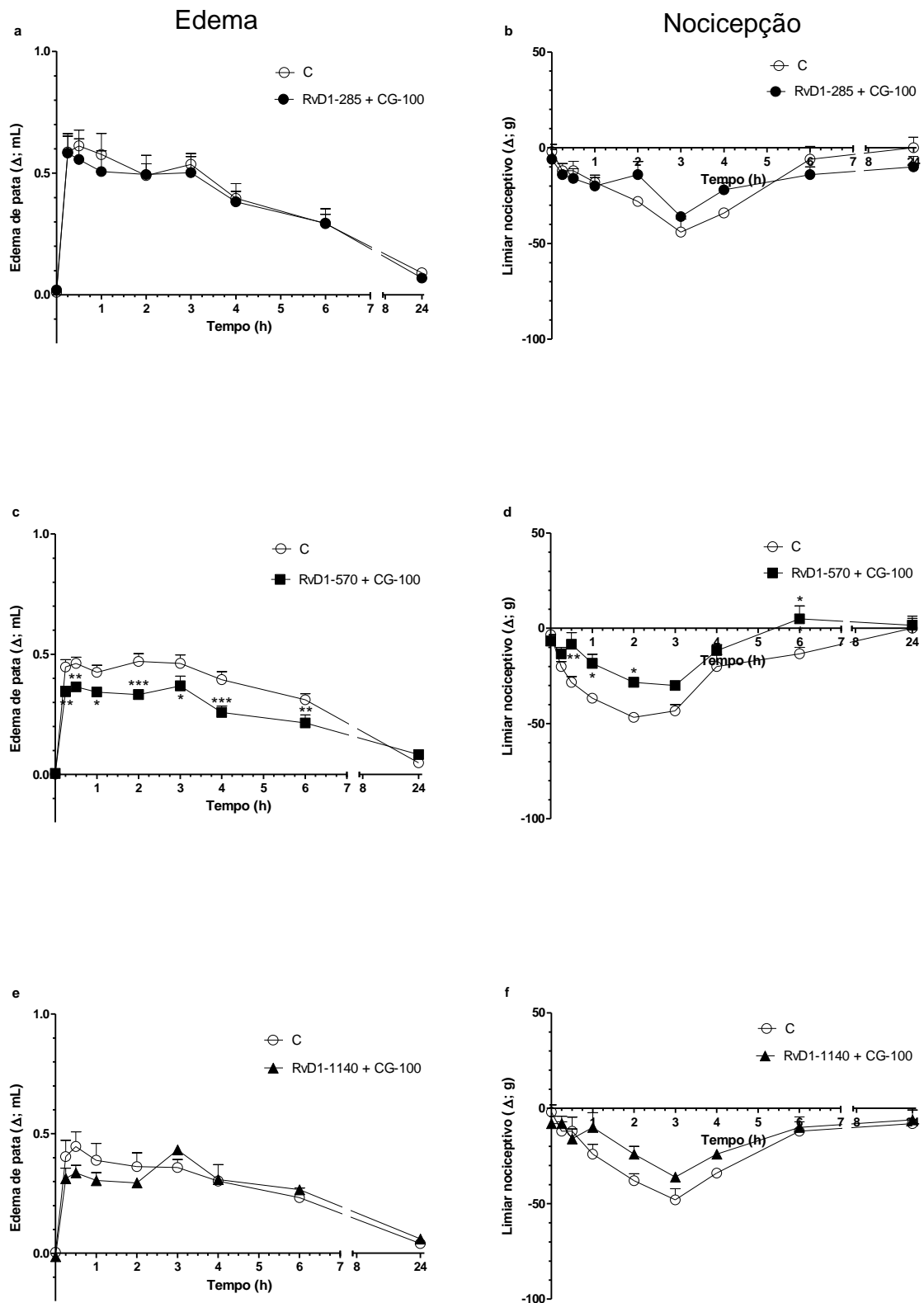


Figura 23. Efeito dose-dependente da resolvina D1 sobre o edema e nociceção induzidos por carragenina na pata de ratos. Resolvina D1 (RvD1 285, 570 e 1140 pmol / 0,1 mL) foi administrada 10 minutos antes da carragenina

(100 μg / 0,1 mL), ambas injetadas por via subcutânea na pata posterior direita do rato. Os animais do grupo controle (C) receberam o veículo da RvD1 no mesmo tempo e pela mesma via, e a carragenina na zero hora. Em **(a)** e **(b)** o veículo utilizado foi o etanol 1,07%, em **(c)** e **(d)** etanol 2,1%, e em **(e)** e **(f)** etanol 4,3%. Os dados são apresentados como a média \pm EPM da diferença de volume (edema) em **(a)**, **(c)** e **(e)** e da diferença na latência de retirada da pata em resposta ao estímulo mecânico em **(b)**, **(d)** e **(f)** entre a pata direita e a esquerda nos diferentes tempos de medida. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. N=5 / grupo.

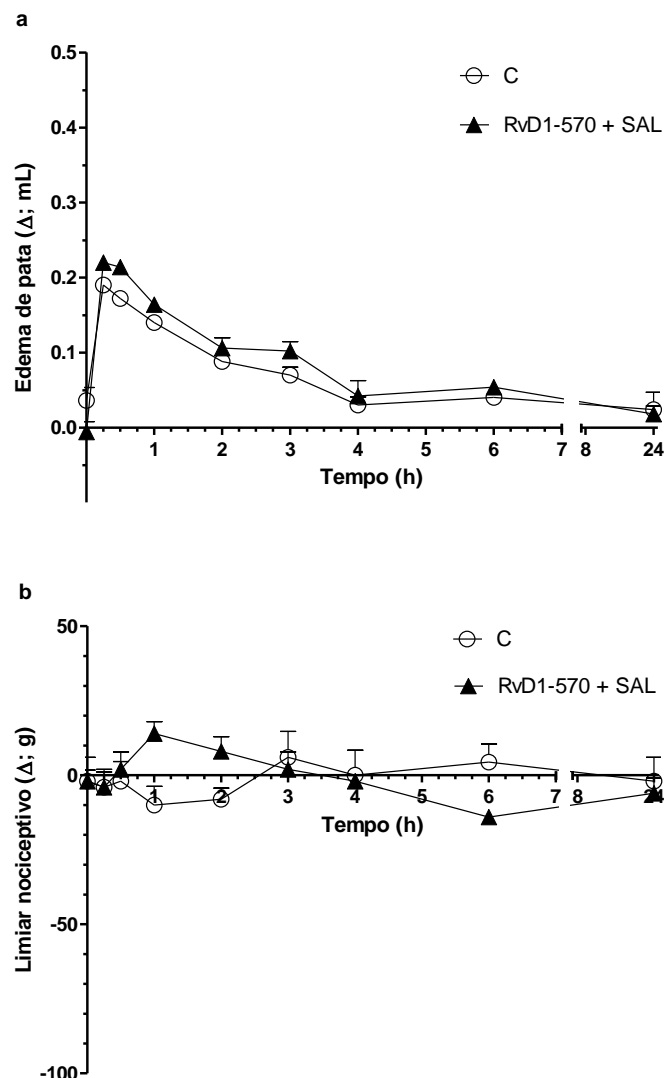


Figura 24. Efeito da administração de resolvina D1 em patas não inflamadas. Resolvina D1 (570 pmol / 0,1 mL) foi administrada 10 minutos antes da salina

fisiológica estéril (SAL, 0,1 mL), ambas injetadas por via subcutânea na pata posterior direita do rato. Os animais do grupo controle (C) receberam o veículo da RvD1 (etanol 2,1%) no mesmo tempo e pela mesma via, e a salina na zero hora. Os dados são apresentados como a média \pm EPM da diferença de volume (edema) em **(a)** e da diferença na latência de retirada da pata em resposta ao estímulo mecânico em **(b)** entre a pata direita e a esquerda nos diferentes tempos de medida. N= 3-5.

A partir da dose estabelecida de RvD1 (570 pmol) fez-se uma comparação do efeito obtido entre as linhagens Holtzman e Wistar. Como pode ser observado na Figura 25, não houve diferença das respostas anti-edematogênica e antinociceptiva entre as duas linhagens avaliadas.

Verificou-se também o efeito do pré-tratamento com 570 pmol de RvD1 frente ao edema e nocicepção induzidos por uma dose maior de carragenina (500 μ g). Porém, como observado na Figura 26, nessas condições a RvD1 não foi capaz de induzir resposta significativa em relação ao edema e nocicepção comparadas ao grupo controle.

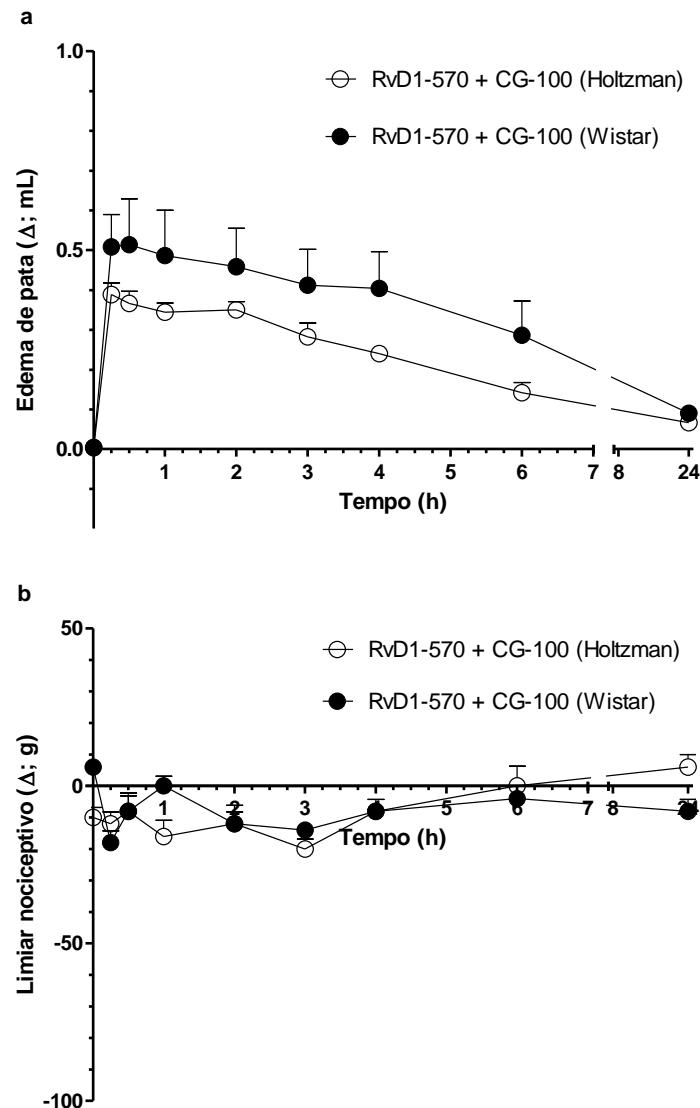


Figura 25. Comparação do efeito do pré-tratamento com resolvina D1 sobre o edema e nocicepção induzidos por carragenina na pata de ratos Holtzman e Wistar. Resolvina D1 (570 pmol / 0,1 mL) foi administrada 10 minutos antes da carragenina (100 μ g / 0,1 mL), ambas injetadas por via subcutânea na pata posterior direita de ratos Holtzman e Wistar. Os dados são apresentados como a média \pm EPM da diferença de volume (edema) em **(a)** e da diferença na latência de retirada da pata em resposta ao estímulo mecânico em **(b)** entre a pata direita e a esquerda nos diferentes tempos de medida. N=5 / grupo.

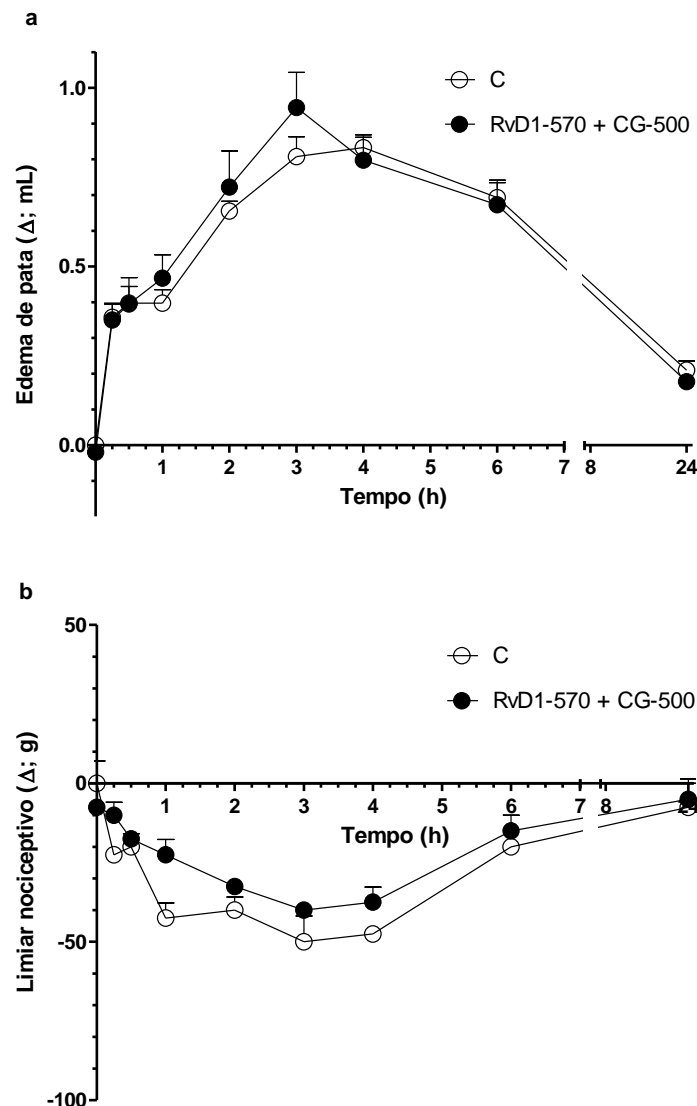


Figura 26. Efeito do pré-tratamento com resolvina D1 sobre o edema e nociceção induzidos por 500 μ g carragenina na pata de ratos. Resolvina D1 (570 pmol / 0,1 mL) foi administrada 10 minutos antes da carragenina (500 μ g / 0,1 mL), ambas injetadas por via subcutânea na pata posterior direita do rato. Os animais do grupo controle (C) receberam o veículo da RvD1 (etanol 2,1%) no mesmo tempo e pela mesma via, e a carragenina na zero hora. Os dados são apresentados como a média \pm EPM da diferença de volume (edema) em **(a)** e da diferença na latência de retirada da pata em resposta ao estímulo mecânico em **(b)** entre a pata direita e a esquerda nos diferentes tempos de medida. N=5 / grupo.

Além do pré-tratamento com a RvD1, também foi realizado o pós-tratamento com a dose estabelecida (570 pmol) a partir do ensaio no qual verificou-se o efeito dose-dependente da RvD1. Nesse caso, a RvD1 foi administrada 10 minutos antes da terceira hora após a administração de 500 μ g de carragenina (Figura 27), já que após 3h a carragenina exerce o pico do seu efeito edematogênico e nociceptivo. Como pode ser observado na Figura 27b, o pós-tratamento com a RvD1 reduziu em 33% a nocicepção induzida por 500 μ g de carragenina na terceira hora após sua administração.

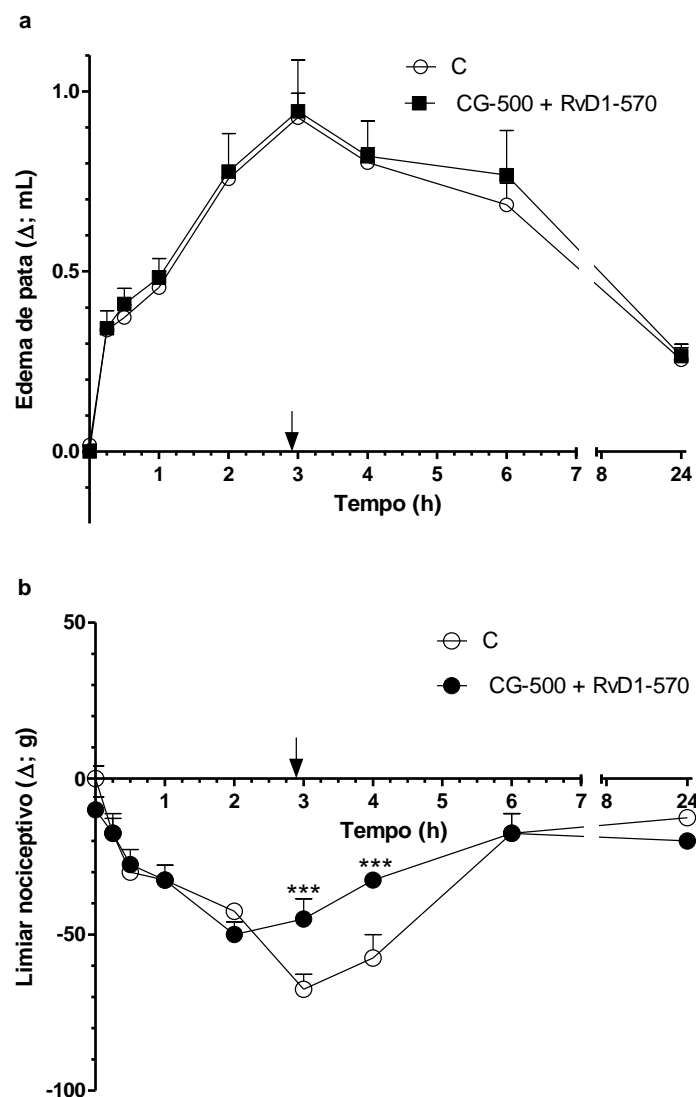


Figura 27. Efeito do pós-tratamento com resolvina D1 sobre o edema e nocicepção induzidos por 500 μ g carragenina na pata de ratos. Resolvina D1

(570 pmol / 0,1 mL) foi administrada 2h50min após a carragenina (500 µg / 0,1 mL), ambas injetadas por via subcutânea na pata posterior direita do rato. Os animais do grupo controle (C) receberam o veículo da RvD1 (etanol 2,1%) no mesmo tempo e pela mesma via, e a carragenina na zero hora. A seta indica o momento da administração da RvD1 ou de seu veículo. Os dados são apresentados como a média ± EPM da diferença de volume (edema) em **(a)** e da diferença na latência de retirada da pata em resposta ao estímulo mecânico em **(b)** entre a pata direita e a esquerda nos diferentes tempos de medida. *** $p < 0,001$ indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. N=5 / grupo.

5.2.2.2 Histamina

O efeito do pré-tratamento com 570 pmol de RvD1 também foi verificado frente ao estímulo dado por 109 nmol (20 µg) de histamina na pata. Como pode ser observado na Figura 28, nessa dose a RvD1 não alterou o edema induzido pela histamina. No entanto, promoveu uma redução de 50% na nocicepção após 15 minutos da administração desse agente.

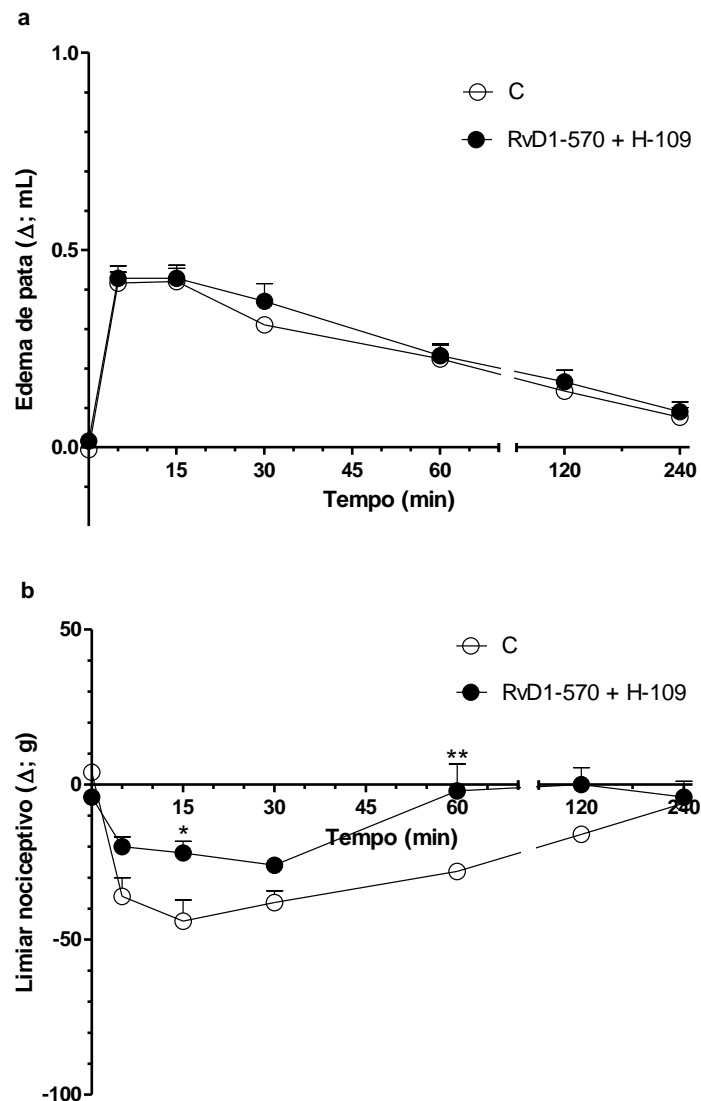


Figura 28. Efeito do pré-tratamento com resolvina D1 sobre o edema e nociceção induzidos por histamina na pata de ratos. Resolvina D1 (570 pmol / 0,1 mL) foi administrada 10 minutos antes da histamina (109 nmol / 0,1 mL), ambas injetadas por via subcutânea na pata posterior direita do rato. Os animais do grupo controle (C) receberam o veículo da RvD1 (etanol 2,1%) no mesmo tempo e pela mesma via, e a histamina na zero hora. Os dados são apresentados como a média \pm EPM da diferença de volume (edema) em **(a)** e da diferença na latência de retirada da pata em resposta ao estímulo mecânico em **(b)** entre a pata direita e a esquerda nos diferentes tempos de medida. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. N=5 / grupo.

5.2.2.3 Serotonina

A serotonina foi o próximo mediador inflamatório a ser estudado diante do pré-tratamento com 570 pmol de RvD1. Como pode ser observado na Figura 29, nessa dose a RvD1 reduziu o edema em 16% e promoveu uma redução de 56% da nocicepção após 15 e 30 minutos da administração de 5 nmol (1 µg) de serotonina, respectivamente.

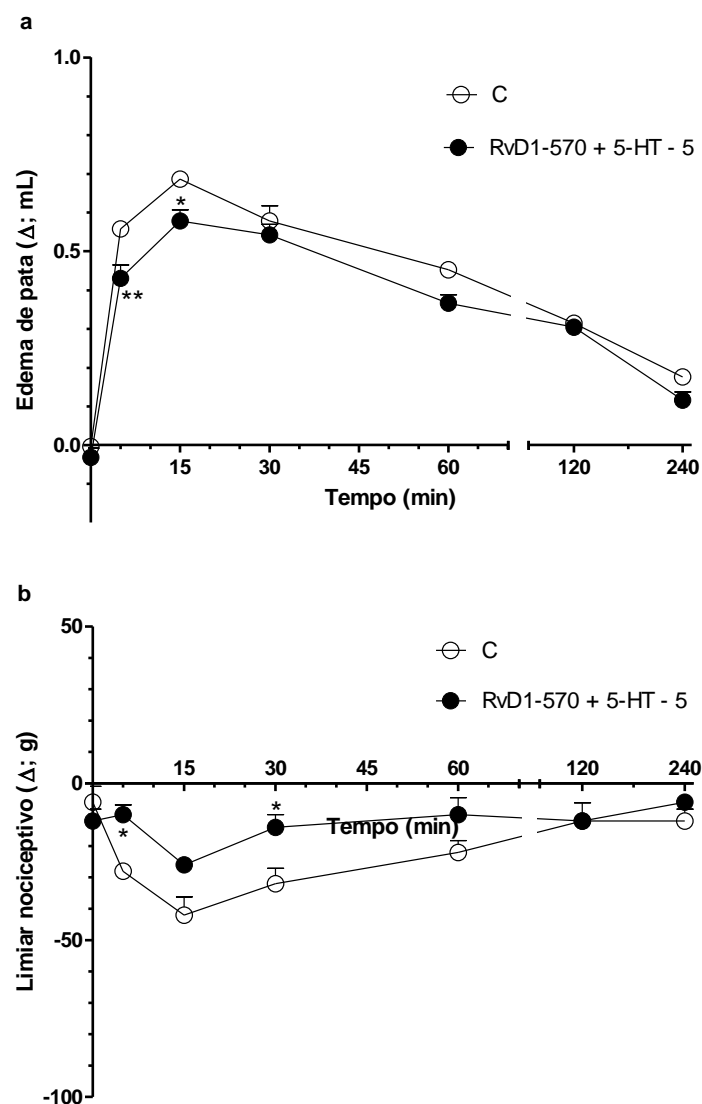


Figura 29. Efeito do pré-tratamento com resolvina D1 sobre o edema e nocicepção induzidos por serotonina na pata de ratos. Resolvina D1 (570 pmol / 0,1 mL) foi administrada 10 minutos antes da serotonina (5 nmol / 0,1 mL), ambas

injetadas por via subcutânea na pata posterior direita do rato. Os animais do grupo controle (C) receberam o veículo da RvD1 (etanol 2,1%) no mesmo tempo e pela mesma via, e a serotonina na zero hora. Os dados são apresentados como a média \pm EPM da diferença de volume (edema) em **(a)** e da diferença na latência de retirada da pata em resposta ao estímulo mecânico em **(b)** entre a pata direita e a esquerda nos diferentes tempos de medida. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. N=5 / grupo.

5.2.2.4 Substância P

O efeito do pré-tratamento com 570 pmol de RvD1 frente ao edema e nocicepção induzidos por 0,7 nmol (1 μ g) de substância P também foi estudado. Como pode ser observado na Figura 30, nessa dose a RvD1, surpreendentemente, aumentou o edema em 42% após 30 minutos da administração da substância P e não foi capaz de induzir resposta significativa em relação à nocicepção induzida por esse agente.

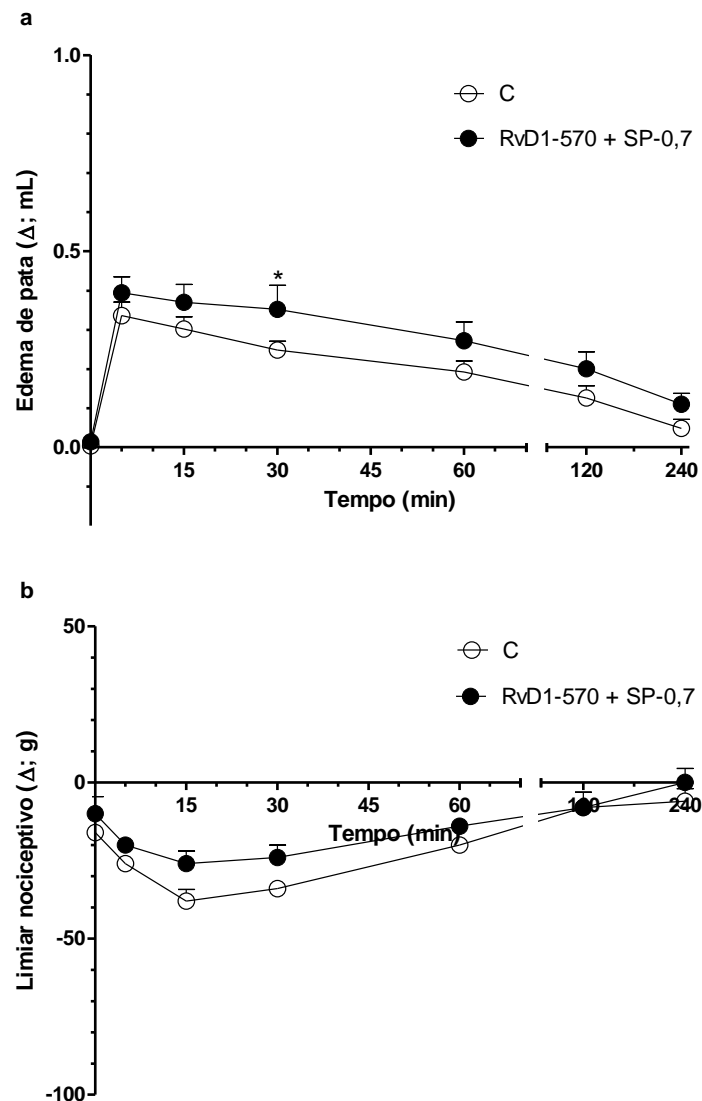


Figura 30. Efeito do pré-tratamento com resolvína D1 sobre o edema e nociceção induzidos por substância P na pata de ratos. Resolvína D1 (570 pmol / 0,1 mL) foi administrada 10 minutos antes da substância P (0,7 nmol / 0,1 mL), ambas injetadas por via subcutânea na pata posterior direita do rato. Os animais do grupo controle (C) receberam o veículo da RvD1 (etanol 2,1%) no mesmo tempo e pela mesma via, e a substância P na zero hora. Os dados são apresentados como a média \pm EPM da diferença de volume (edema) em **(a)** e da diferença na latência de retirada da pata em resposta ao estímulo mecânico em **(b)** entre a pata direita e a esquerda nos diferentes tempos de medida. * $p < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. N=5 / grupo.

5.2.2.5 Prostaglandina E₂

O efeito do pré-tratamento com 570 pmol de RvD1 frente ao edema e nocicepção induzidos por 6 nmol (2 µg) de prostaglandina E₂ foi estudado a seguir. Como pode ser observado na Figura 31, nessa dose a RvD1 não alterou as respostas edematogênica e nociceptiva induzidas pela prostaglandina E₂.

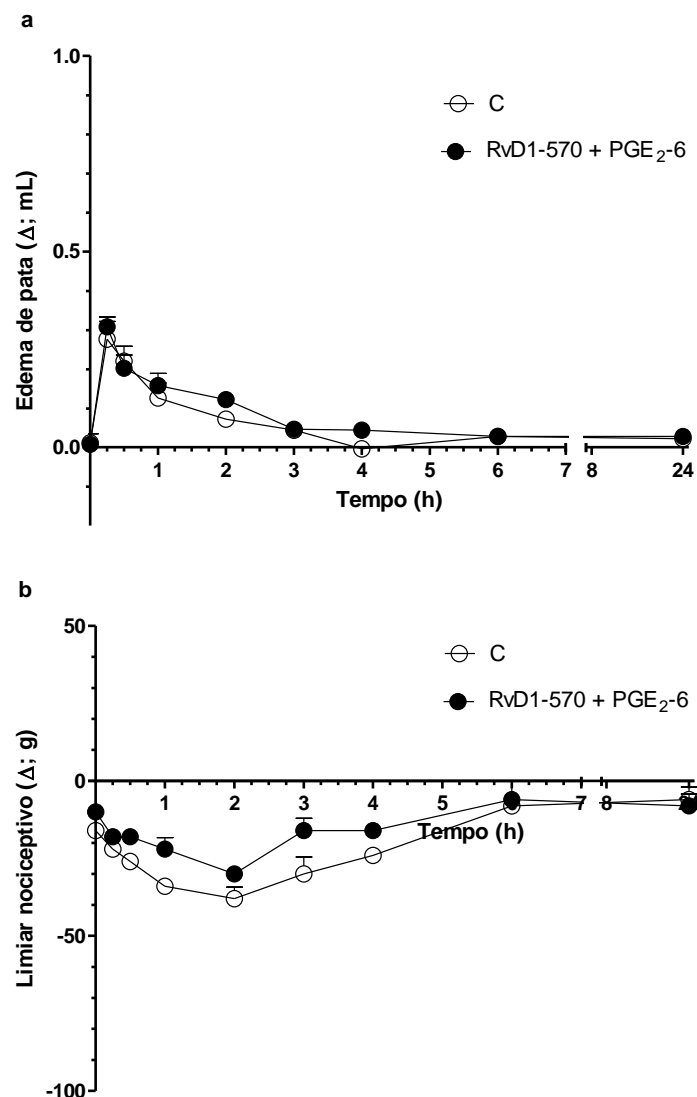


Figura 31. Efeito do pré-tratamento com resolvina D1 sobre o edema e nocicepção induzidos por prostaglandina E₂ na pata de ratos. Resolvina D1 (570 pmol / 0,1 mL) foi administrada 10 minutos antes da prostaglandina E₂ (6 nmol / 0,1 mL), ambas injetadas por via subcutânea na pata posterior direita do rato. Os

animais do grupo controle (C) receberam o veículo da RvD1 (etanol 2,1%) no mesmo tempo e pela mesma via, e a prostaglandina E₂ na zero hora. Os dados são apresentados como a média \pm EPM da diferença de volume (edema) em **(a)** e da diferença na latência de retirada da pata em resposta ao estímulo mecânico em **(b)** entre a pata direita e a esquerda nos diferentes tempos de medida. N=5 / grupo.

5.2.3 *Protectina DX*

5.2.3.1 Carragenina

Curvas dose-resposta utilizando o pré-tratamento com a PDX frente ao edema e nocicepção induzidos por carragenina também foram construídas (Figura 32). A dose inicial utilizada foi estimada a partir de uma equivalência molar com a dose eficaz de RvE1, ou seja, 285 pmol. Para a obtenção da curva dose-reposta utilizaram-se então, as seguintes doses: 70 (25 ng), 285 (103 ng) e 570 pmol (205 ng) por pata.

Analisando-se o efeito do pré-tratamento com diferentes doses de PDX frente ao edema e nocicepção induzidos por carragenina, pode-se observar que nenhuma das doses utilizadas reduziu o edema e a nocicepção induzidos pela carragenina. Sendo assim, optou-se por não prosseguir com os ensaios utilizando os demais agentes flogogênicos, visto que não foi obtida uma resposta positiva.

É importante ressaltar que, assim como na administração de RvE1 e RvD1, a injeção de PDX sem a presença de um estímulo flogogênico não alterou as respostas edematogênica e nociceptiva fisiológicas nos animais de experimentação, conforme apresentado na Figura 33.

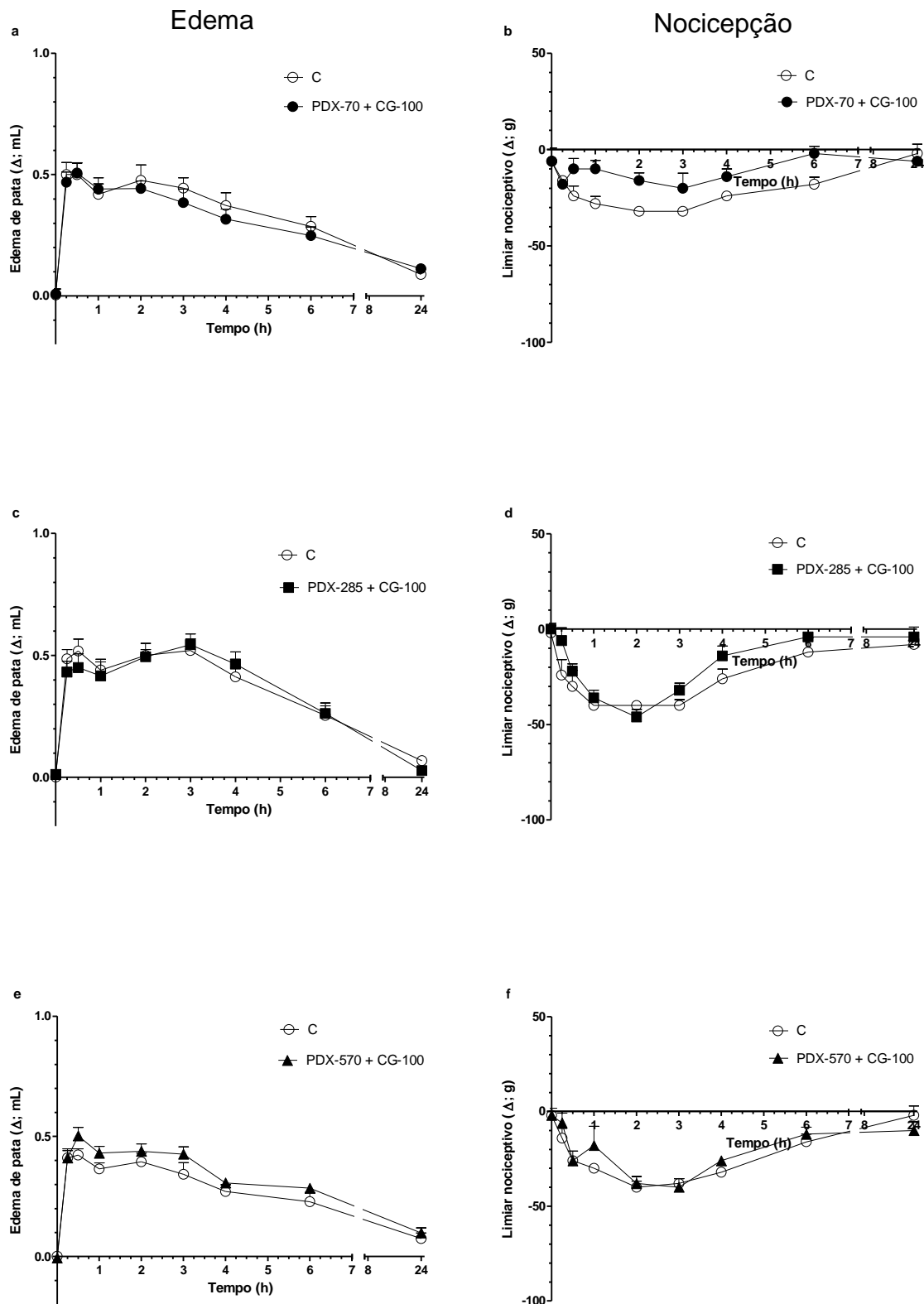


Figura 32. A protectina DX não altera o edema e a nociceção induzidos por carragenina na pata de ratos. Protectina DX (PDX 70, 285 e 570 pmol / 0,1 mL) foi administrada 10 minutos antes da carragenina (100 μ g / 0,1 mL), ambas injetadas

por via subcutânea na pata posterior direita do rato. Os animais do grupo controle (C) receberam o veículo da PDX no mesmo tempo e pela mesma via, e a carragenina na zero hora. Em **(a)** e **(b)** o veículo utilizado foi salina fisiológica estéril, em **(c)** e **(d)** etanol 1,03%, e em **(e)** e **(f)** etanol 2,05%. Os dados são apresentados como a média \pm EPM da diferença de volume (edema) em **(a)**, **(c)** e **(e)** e da diferença na latência de retirada da pata em resposta ao estímulo mecânico em **(b)**, **(d)** e **(f)** entre a pata direita e a esquerda nos diferentes tempos de medida. N=5 / grupo.

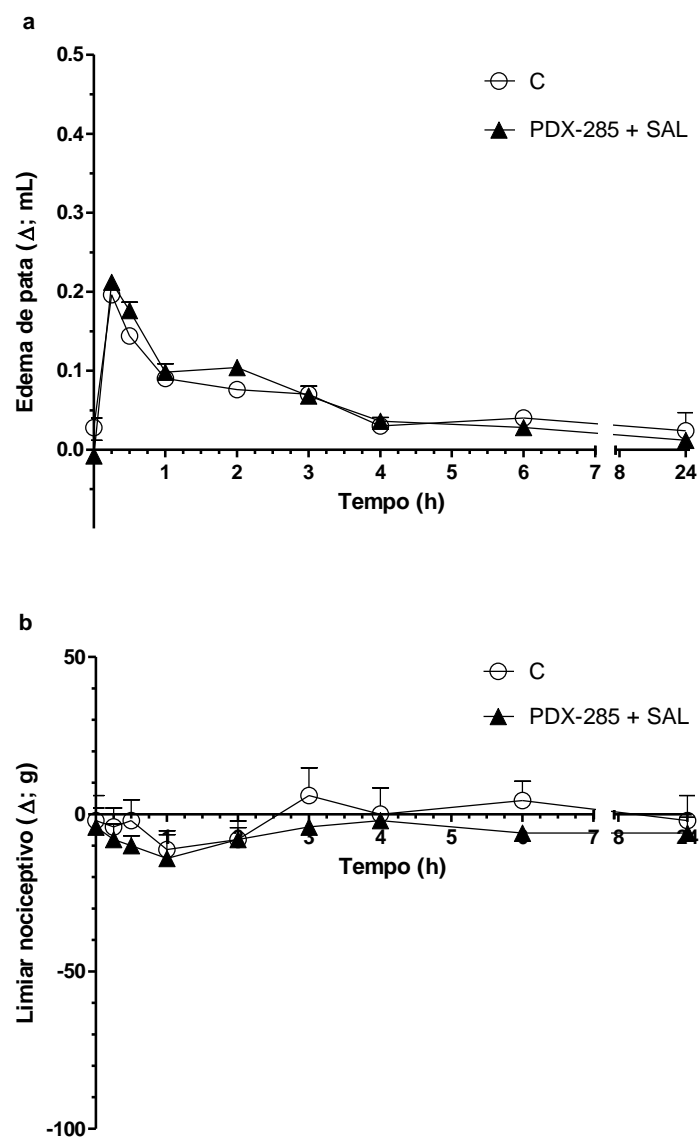


Figura 33. Efeito da administração de protectina DX em patas não inflamadas. Protectina DX (285 pmol / 0,1 mL) foi administrada 10 minutos antes da salina

fisiológica estéril (SAL, 0,1 mL), ambas injetadas por via subcutânea na pata posterior direita do rato. Os animais do grupo controle (C) receberam o veículo da PDX (etanol 1,03%) no mesmo tempo e pela mesma via, e a salina na zero hora. Os dados são apresentados como a média \pm EPM da diferença de volume (edema) em **(a)** e da diferença na latência de retirada da pata em resposta ao estímulo mecânico em **(b)** entre a pata direita e a esquerda nos diferentes tempos de medida. N= 3-5.

No intuito de facilitar a assimilação dos resultados obtidos com os fatores resolutivos, a seguir estão apresentadas duas tabelas contendo as principais alterações induzidas pelo tratamento com esses fatores frente aos diferentes agentes flogogênicos.

Tabela 2. Efeitos induzidos pelos fatores de resolução resolvina E1, resolvina D1 e protectina DX na resposta edematogênica a variados agentes flogogênicos.

| MAIOR ALTERAÇÃO NO EDEMA | | | | | | | | |
|-----------------------------|-----------|------------|------------|--------------|---------------|---------------|---------------------------|----|
| Fatores resolutivos (doses) | | CG - 100µg | CG - 500µg | H - 109 nmol | 5-HT - 5 nmol | SP - 0,7 nmol | PGE ₂ - 6 nmol | |
| RvE1 | 57 pmol | | ns | - | - | - | - | |
| | 285 pmol | Pré | ↓ 42% | ns | ↑ 32% | ↑ 24% | ns | ns |
| | | Pós | ns | ns | - | - | - | - |
| | 570 pmol | | ↓ 32% | - | - | - | - | - |
| RvD1 | 285 pmol | | ns | - | - | - | - | |
| | 570 pmol | Pré | ↓ 29% | ns | ns | ↓ 16% | ↑ 42% | ns |
| | | Pós | - | ns | - | - | - | - |
| | 1140 pmol | | ns | - | - | - | - | - |
| PDX | 70 pmol | | ns | - | - | - | - | |
| | 285 pmol | | ns | - | - | - | - | |
| | 570 pmol | | ns | - | - | - | - | |

pré – indica pré-tratamento com a administração do fator resolutivo 10 minutos antes do agente flogogênico; pós – indica pós-tratamento com a administração do fator resolutivo 2h50min após a injeção do agente flogogênico; ns – indica diferença não significativa; ↓ indica redução do edema; ↑ indica aumento do edema.

Tabela 3. Efeitos induzidos pelos fatores de resolução resolvina E1, resolvina D1 e protectina DX na resposta nociceptiva a variados agentes flogogênicos.

| MAIOR ALTERAÇÃO NA NOCICEPÇÃO | | | | | | | | |
|-------------------------------|-----------|------------|------------|--------------|---------------|---------------|---------------------------|-------|
| Fatores resolutivos (doses) | | CG - 100µg | CG - 500µg | H - 109 nmol | 5-HT - 5 nmol | SP - 0,7 nmol | PGE ₂ - 6 nmol | |
| RvE1 | 57 pmol | | ns | - | - | - | - | |
| | 285 pmol | Pré | ↓ 53% | ↓ 56% | hipo | ↓ 64% | hipo | ↓ 63% |
| | | Pós | ns | ↓ 37% | - | - | - | - |
| | 570 pmol | | ns | - | - | - | - | - |
| RvD1 | 285 pmol | | ns | - | - | - | - | |
| | 570 pmol | Pré | ↓ 39% | ns | ↓ 50% | ↓ 56% | ns | ns |
| | | Pós | - | ↓ 33% | - | - | - | - |
| | 1140 pmol | | ns | - | - | - | - | - |
| PDX | 70 pmol | | ns | - | - | - | - | |
| | 285 pmol | | ns | - | - | - | - | |
| | 570 pmol | | ns | - | - | - | - | |

pré – indica pré-tratamento com a administração do fator resolutivo 10 minutos antes do agente flogogênico; pós – indica pós-tratamento com a administração do fator resolutivo 2h50min após a injeção do agente flogogênico; ns – indica diferença não significativa; ↓ indica redução da nocicepção; ↑ indica aumento da nocicepção.

5.2.4 Combinação de resolvina E1 + resolvina D1

Utilizando as doses estabelecidas a partir da análise do efeito dose-dependente da RvE1 (285 pmol) e da RvD1 (570 pmol) frente ao edema e nocicepção induzidos por carragenina, avaliou-se o efeito da administração conjunta dessas substâncias frente ao edema e nocicepção induzidos por 100 µg de carragenina. Pode-se observar na Figura 34, que a combinação de RvE1 e RvD1 inibiu o edema em 33% e promoveu uma redução de 67% na nocicepção, ambos após 3h da administração da carragenina, sugerindo que não houve efeito sinérgico entre elas com relação a resposta edematogênica, porém esse efeito foi observado na resposta nociceptiva.

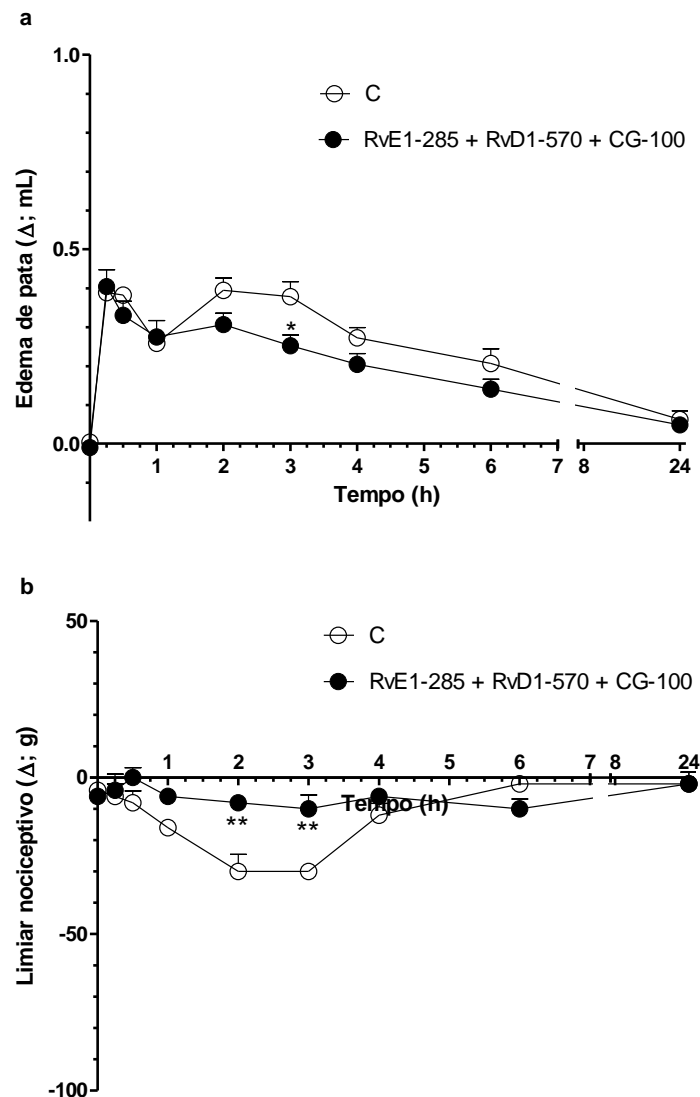


Figura 34. Efeito do pré-tratamento com a combinação de resveratrol E1 e resveratrol D1 sobre o edema e nociceção induzidos por carragenina na pata de ratos. Resveratrol E1 (285 pmol / 0,1 mL) imediatamente seguida de resveratrol D1 (570 pmol / 0,1 mL) foram administradas 10 minutos antes da carragenina (100 µg / 0,1 mL), todas injetadas por via subcutânea na pata posterior direita do rato. Os animais do grupo controle (C) receberam o veículo da RvE1 (etanol 5%) imediatamente seguido do veículo da RvD1 (etanol 2,1%) no mesmo tempo e pela mesma via, e a carragenina na zero hora. Os dados são apresentados como a média ± EPM da diferença de volume (edema) em **(a)** e da diferença na latência de retirada da pata em resposta ao estímulo mecânico em **(b)** entre a pata direita e a

esquerda nos diferentes tempos de medida. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. N=5 / grupo.

5.2.5 Efeito dos veículos utilizados nas respostas de edema e nocicepção na pata de ratos

O veículo utilizado para diluir as resolvinas E1 e D1 e a protectina DX foi o etanol em concentrações variadas (1-10% de etanol em salina fisiológica estéril). A Figura 35 apresenta o efeito ocasionado pelas várias concentrações de etanol utilizadas nos experimentos anteriores, de maneira comparativa. Como pode ser observado nessa figura, o etanol nas concentrações de 5 e 10% aumentou as respostas edematogênica e nociceptiva induzidas pela carragenina.

Com base nos resultados descritos acima, decidiu-se estudar o efeito do etanol na maior concentração utilizada, ou seja, etanol 10%, em patas não inflamadas. Como pode ser observado na Figura 36, o etanol administrado isoladamente não alterou as repostas edematogênica e nociceptiva dos animais de experimentação.

Também foi utilizado como veículo da resolvina E1 o dimetilsulfóxido (DMSO), porém não foi verificada nenhuma diferença da resposta obtida com esse veículo quando comparado à resposta obtida utilizando como veículo o etanol (Anexo II).

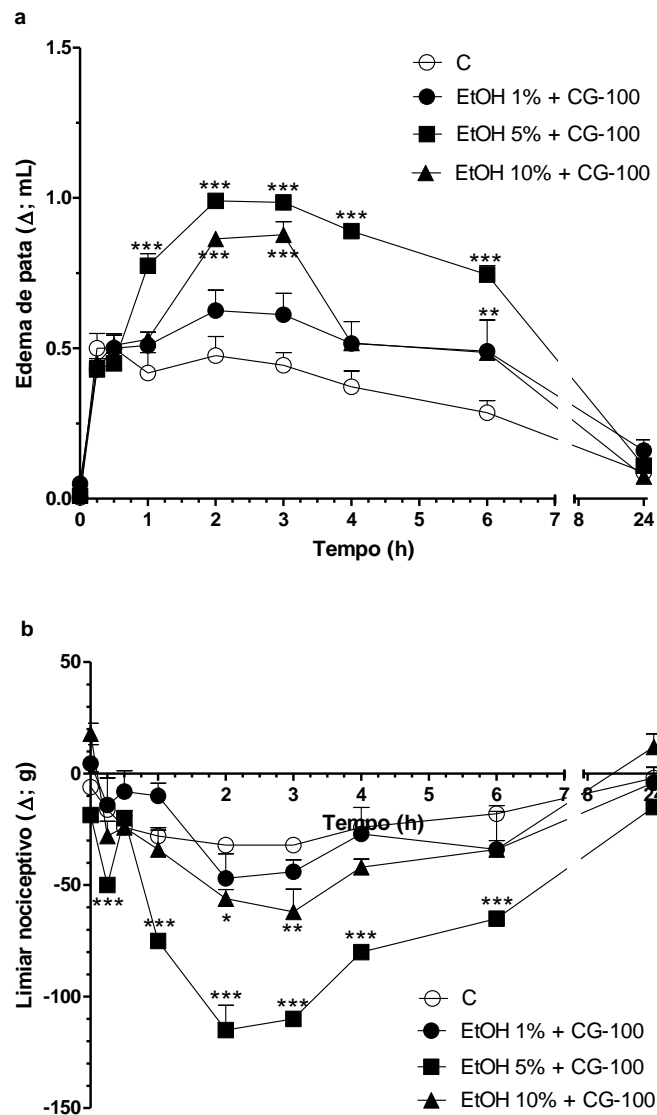


Figura 35. Efeito do etanol sobre o edema e nociceção induzidos por carragenina na pata de ratos. Etanol (1-10%, 0,1 mL) foi administrado 10 minutos antes da carragenina (100 μ g / 0,1 mL), ambos injetados por via subcutânea na pata posterior direita do rato. Os animais do grupo controle (C) receberam salina fisiológica estéril (0,1 mL) no mesmo tempo e pela mesma via, e a carragenina na zero hora. Os dados são apresentados como a média \pm EPM da diferença de volume (edema) em **(a)** e da diferença na latência de retirada da pata em resposta ao estímulo mecânico em **(b)** entre a pata direita e a esquerda nos diferentes tempos

de medida. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. N=5 / grupo.

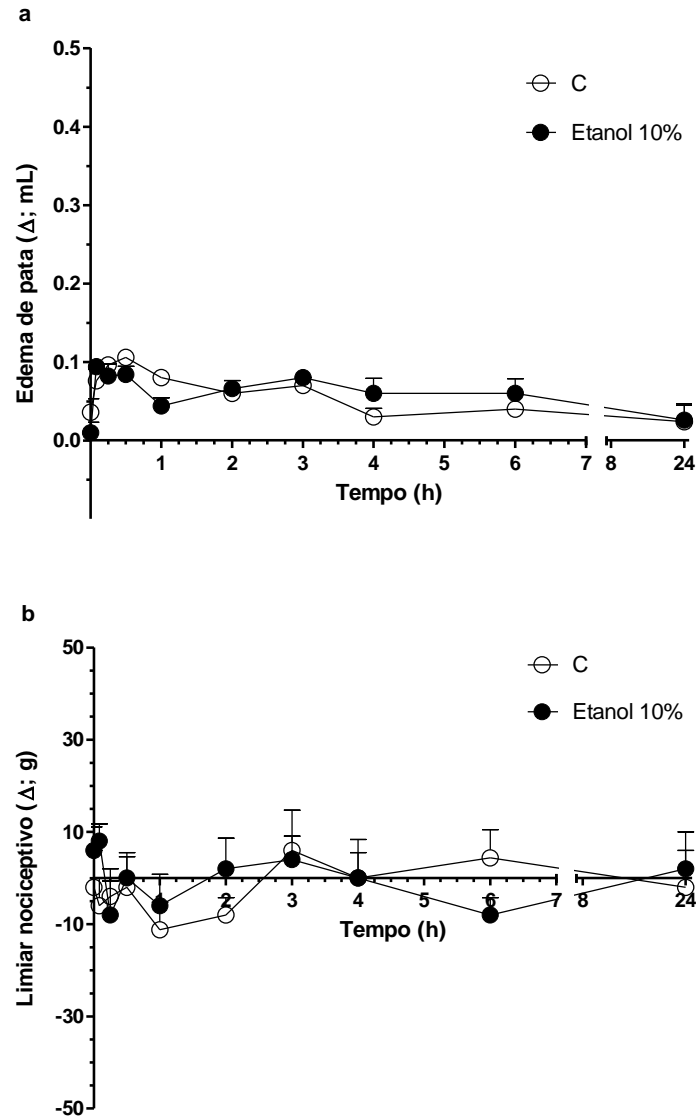


Figura 36. Efeito do etanol 10% nas respostas de edema e nociceção medidas em patas não inflamadas. Etanol 10% (0,1 mL) foi administrado por via subcutânea na pata posterior direita do rato. Os animais do grupo controle (C) receberam salina fisiológica estéril (0,1 mL) pela mesma via. Os dados são apresentados como a média \pm EPM da diferença de volume (edema) em **(a)** e da diferença na latência de retirada da pata em resposta ao estímulo mecânico em **(b)** entre a pata direita e a esquerda nos diferentes tempos de medida. N=5 / grupo.

5.3 Efeito de drogas anti-inflamatórias e/ou analgésicas utilizadas como padrão de referência nos ensaios de edema e nocicepção à carragenina

Drogas-padrão de diferentes classes foram utilizadas no modelo de edema e hiperalgesia da pata de ratos induzido por carragenina, para comparação dos efeitos anti-inflamatório e/ou analgésico obtidos com os diferentes fatores de resolução.

5.3.1 Indometacina

A indometacina, um anti-inflamatório não esteroidal não seletivo para COX, foi administrada sistemicamente na dose de 4 mg/kg (FRANÇA *et al.*, 2006), 30 minutos antes da indução do edema e nocicepção com a injeção de 100 e 500 µg de carragenina (Figuras 37 e 38, respectivamente).

A ação da indometacina foi avaliada pela redução do volume da pata e pelo aumento do limiar nociceptivo em relação ao grupo controle, tendo-se observado uma inibição de 50% do edema e 52% do limiar nociceptivo detectado, apenas com a dose de 500 µg de carragenina (Figura 38).

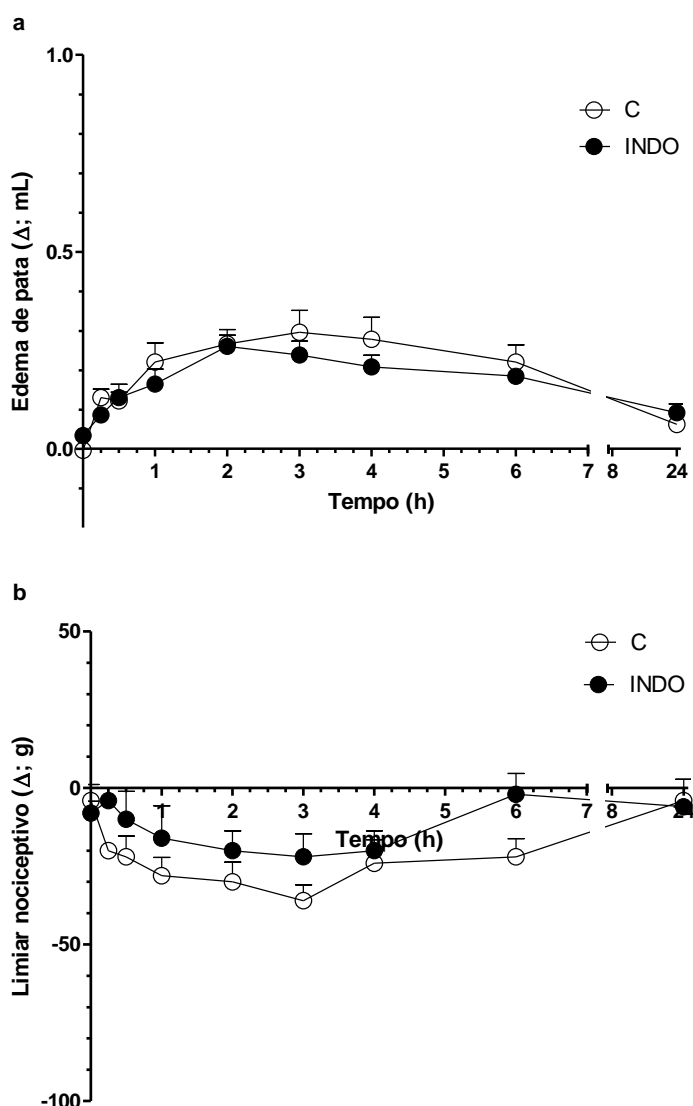


Figura 37. Efeito do pré-tratamento com indometacina sobre o edema e nociceção induzidos por 100 µg de carragenina na pata de ratos. Indometacina (INDO) 4 mg/kg foi administrada por via subcutânea 30 minutos antes da carragenina (100 µg / 0,1 mL), injetada também por via subcutânea na pata posterior direita do rato. Os animais do grupo controle (C) receberam TRIS no mesmo tempo e pela mesma via, e a carragenina na zero hora. Os dados são apresentados como a média ± EPM da diferença de volume (edema) em **(a)** e da diferença na latência de retirada da pata em resposta ao estímulo mecânico em **(b)** entre a pata direita e a esquerda nos diferentes tempos de medida. N=5 / grupo.

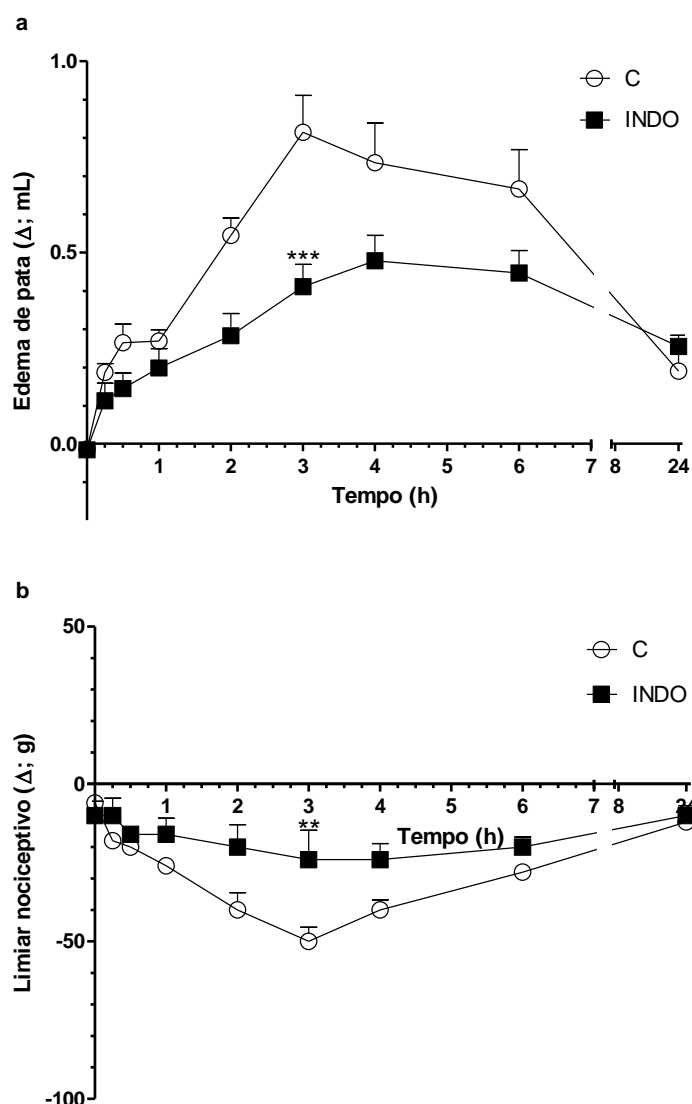


Figura 38. Efeito do pré-tratamento com indometacina sobre o edema e nociceção induzidos por 500 µg de carragenina na pata de ratos. Indometacina (INDO) 4 mg/kg foi administrada por via subcutânea 30 minutos antes da carragenina (500 µg / 0,1 mL), injetada também por via subcutânea na pata posterior direita do rato. Os animais do grupo controle (C) receberam TRIS no mesmo tempo e pela mesma via, e a carragenina na zero hora. Os dados são apresentados como a média ± EPM da diferença de volume (edema) em **(a)** e da diferença na latência de retirada da pata em resposta ao estímulo mecânico em **(b)** entre a pata direita e a esquerda nos diferentes tempos de medida. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. N=5 / grupo.

5.3.2 Celecoxibe

O celecoxibe, um anti-inflamatório não esteroideal inibidor seletivo da COX-2, foi administrado sistemicamente na dose de 30 mg/kg (FRANCISCHI *et al.*, 2002), 30 minutos antes da indução do edema e nocicepção com a injeção de 100 e 500 µg de carragenina (Figuras 39 e 40, respectivamente).

O celecoxibe não alterou o edema formado por nenhuma das doses de carragenina utilizadas nem a nocicepção com a menor dose. No entanto, reduziu em 33% a nocicepção induzida por 500 µg de carragenina (Figura 40b) após 3h da administração da mesma.

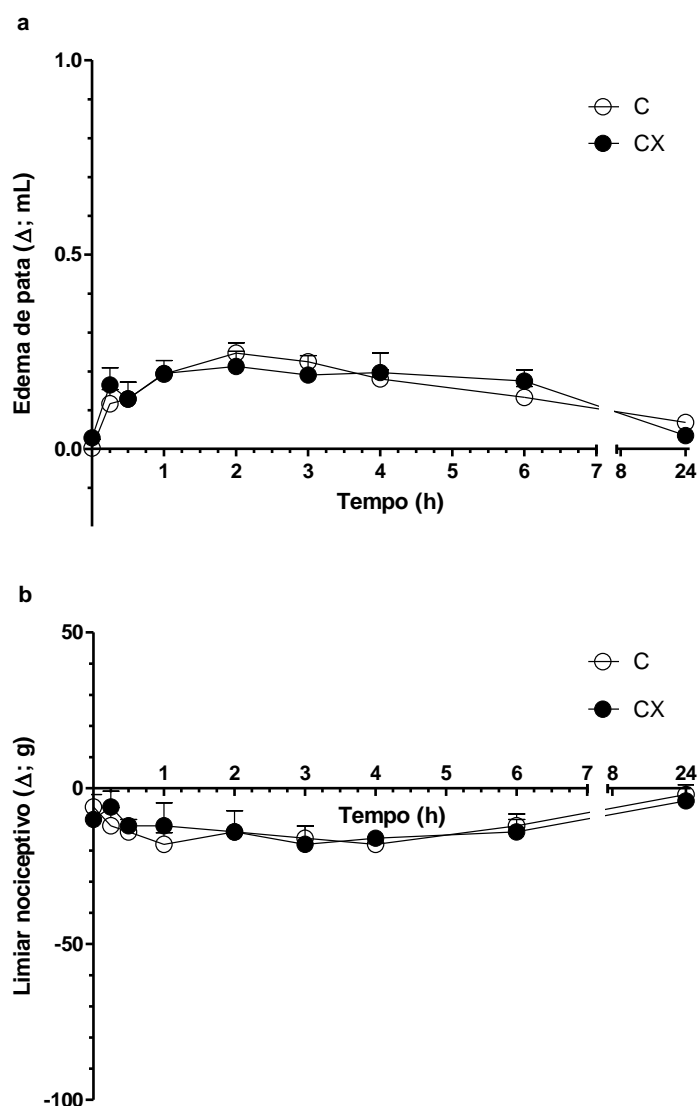


Figura 39. Efeito do pré-tratamento com celecoxibe sobre o edema e nocicepção induzidos por 100 μ g de carragenina na pata de ratos. Celecoxibe (CX) 30 mg/kg foi administrado por via subcutânea 30 minutos antes da carragenina (100 μ g / 0,1 mL), injetada também por via subcutânea na pata posterior direita do rato. Os animais do grupo controle (C) receberam salina fisiológica estéril no mesmo tempo e pela mesma via, e a carragenina na zero hora. Os dados são apresentados como a média \pm EPM da diferença de volume (edema) em **(a)** e da diferença na latência de retirada da pata em resposta ao estímulo mecânico em **(b)** entre a pata direita e a esquerda nos diferentes tempos de medida. N=5 / grupo.

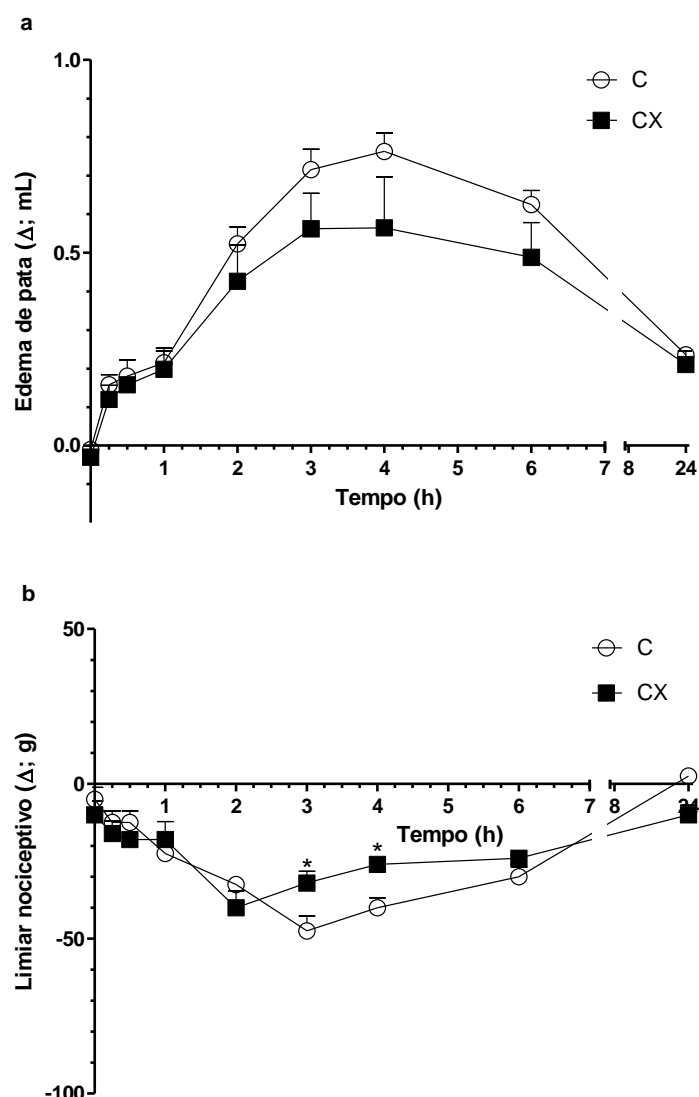


Figura 40. Efeito do pré-tratamento com celecoxibe sobre o edema e nociceção induzidos por 500 μ g de carragenina na pata de ratos. Celecoxibe (CX) 30 mg/kg foi administrado por via subcutânea 30 minutos antes da carragenina (500 μ g / 0,1 mL), injetada também por via subcutânea na pata posterior direita do rato. Os animais do grupo controle (C) receberam salina fisiológica estéril no mesmo tempo e pela mesma via, e a carragenina na zero hora. Os dados são apresentados como a média \pm EPM da diferença de volume (edema) em **(a)** e da diferença na latência de retirada da pata em resposta ao estímulo mecânico em **(b)** entre a pata direita e a esquerda nos diferentes tempos de medida. * $p < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. N=5 / grupo.

5.3.3 Dexametasona

A dexametasona, um anti-inflamatório esteroidal, foi administrada sistemicamente na dose de 1 mg/kg (FRANCISCHI *et al.*, 1996), 30 minutos antes da indução do edema e nocicepção com a injeção de 100 e 500 µg de carragenina (Figuras 41 e 42, respectivamente).

A DEXA foi o anti-inflamatório padrão que, em nossas mãos, apresentou melhores resultados de redução de edema e nocicepção. Houve redução do edema e nocicepção induzidos tanto por 100 como por 500 µg de carragenina, sendo uma redução de 51% no edema (Figura 41a) e 62% na nocicepção (Figura 41b) induzidos por 100 µg de carragenina após a terceira hora da administração da mesma. Com a maior dose desse agente flogogênico, houve uma redução de 72% no edema formado (Figura 42a) e 68% na nocicepção (Figura 42b), ambos após 3h da administração da carragenina.

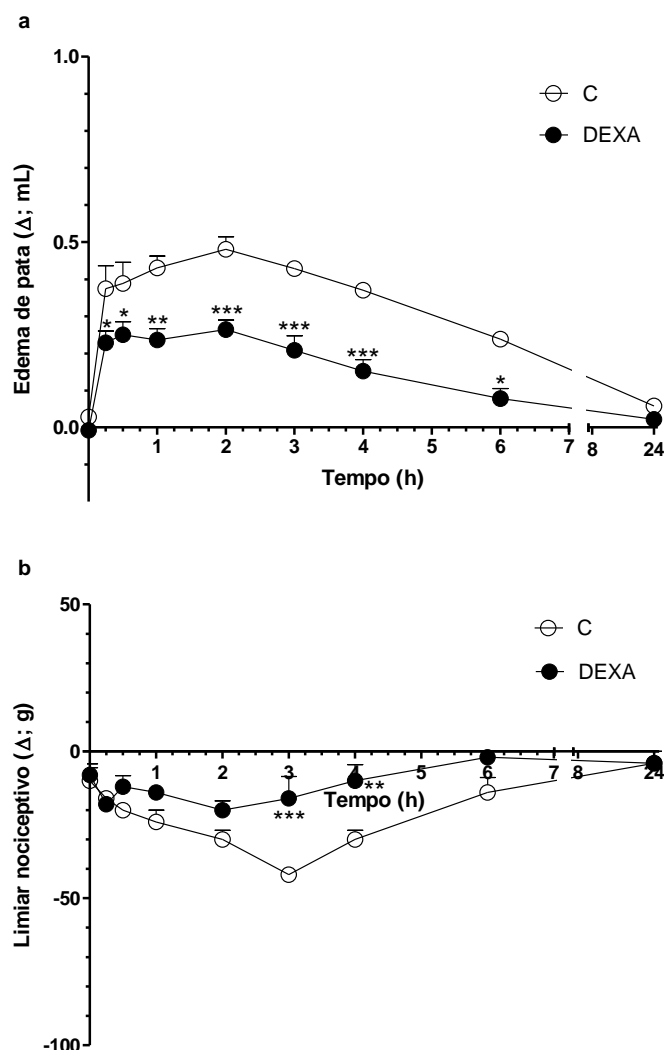


Figura 41. Efeito do pré-tratamento com dexametasona sobre o edema e nociceção induzidos por 100 µg de carragenina na pata de ratos. Dexametasona (DEXA) 1 mg/kg foi administrada por via subcutânea 30 minutos antes da carragenina (100 µg / 0,1 mL), injetada também por via subcutânea na pata posterior direita do rato. Os animais do grupo controle (C) receberam salina fisiológica estéril no mesmo tempo e pela mesma via, e a carragenina na zero hora. Os dados são apresentados como a média ± EPM da diferença de volume (edema) em **(a)** e da diferença na latência de retirada da pata em resposta ao estímulo mecânico em **(b)** entre a pata direita e a esquerda nos diferentes tempos de medida. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. N=5 / grupo.

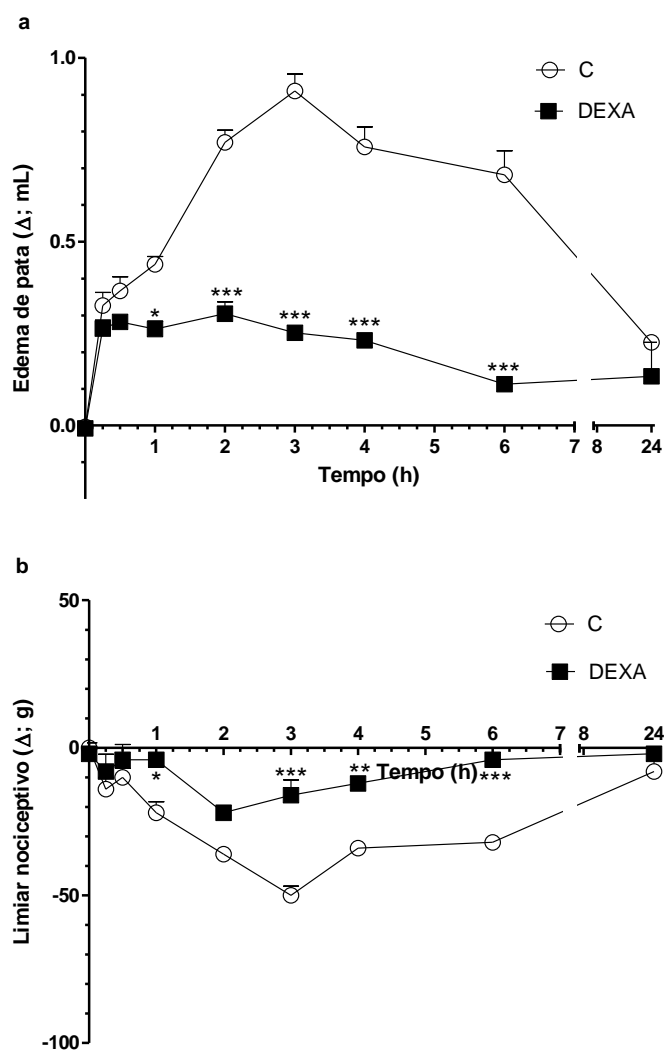


Figura 42. Efeito do pré-tratamento com dexametasona sobre o edema e nociceção induzidos por 500 μ g de carragenina na pata de ratos. Dexametasona (DEXA) 1 mg/kg foi administrada por via subcutânea 30 minutos antes da carragenina (500 μ g / 0,1 mL), injetada também por via subcutânea na pata posterior direita do rato. Os animais do grupo controle (C) receberam salina fisiológica estéril no mesmo tempo e pela mesma via, e a carragenina na zero hora. Os dados são apresentados como a média \pm EPM da diferença de volume (edema) em **(a)** e da diferença na latência de retirada da pata em resposta ao estímulo mecânico em **(b)** entre a pata direita e a esquerda nos diferentes tempos de medida. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. N=5 / grupo.

5.4 Estudo do envolvimento de receptores específicos no efeito anti-inflamatório e antinociceptivo da resolvina E1

Com a finalidade de descobrir se receptores específicos estão envolvidos nas ações da resolvina E1, diversos compostos experimentais foram estudados no efeito anti-inflamatório e analgésico da RvE1 sobre o edema e nocicepção induzidos por carragenina na pata de ratos.

5.4.1 U-75302

O U-75302, um antagonista seletivo do receptor BLT1 (receptor 1 de LTB₄), foi administrado por via intraplantar na dose de 8 nmol (3 µg) 5 minutos antes da injeção da RvE1 (285 pmol) (ARITA *et al.*, 2007; GOMIDES *et al.*, 2012), que por sua vez, foi administrada 10 minutos antes da indução do edema e nocicepção com 100 µg de carragenina. Como pode ser observado na Figura 43, o antagonismo com o U-75302 reverteu a redução do edema (em 66%) e da nocicepção (em 100%) induzidos por carragenina mediante o pré-tratamento com RvE1, após a segunda hora da administração da mesma.

A administração de U-75302 sem a presença de um estímulo flogogênico não alterou as respostas edematogênica e nociceptiva fisiológicas nos animais de experimentação, conforme apresentado na Figura 44.

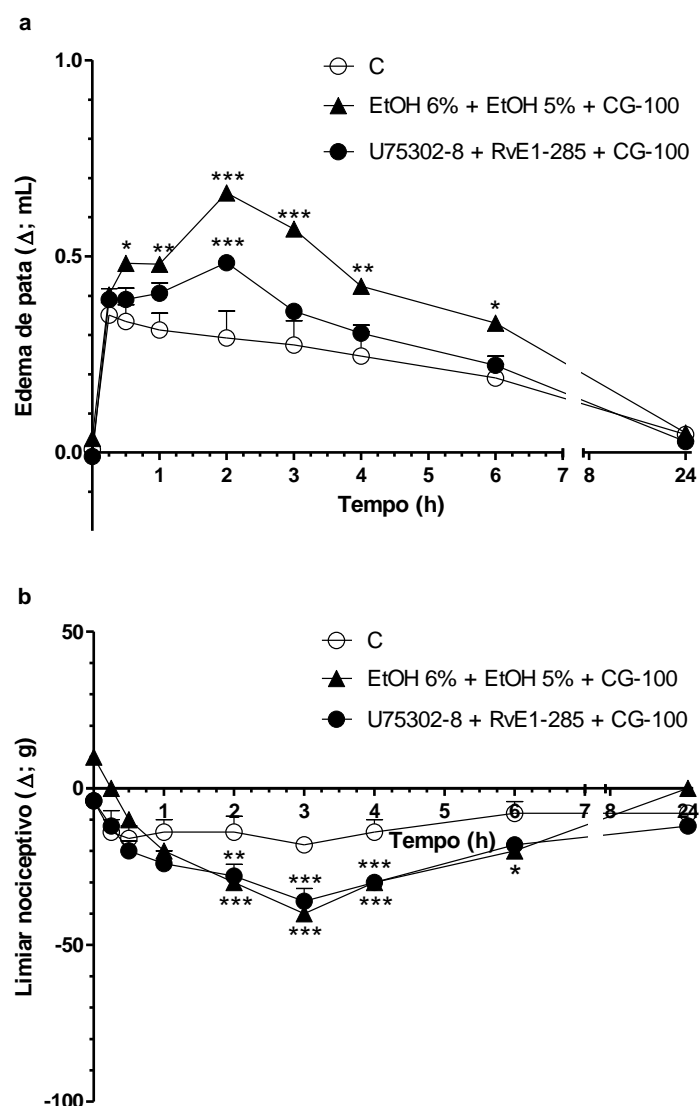


Figura 43. Efeito do U-75302 sobre o pré-tratamento com resolvina E1 frente ao edema e nocicepção induzidos por carragenina na pata de ratos. U-75302 (8 nmol / 0,1 mL) foi administrado 5 minutos antes da resolvina E1 (285 pmol / 0,1 mL), que por sua vez foi administrada 10 minutos antes da carragenina (100 µg / 0,1 mL), todos injetados por via subcutânea na pata posterior direita do rato. Outro grupo de animais recebeu o veículo do U-75302 (etanol 6%) e da RvE1 (etanol 5%) no mesmo tempo e pela mesma via, e a carragenina na zero hora. Os animais do grupo controle (C) receberam o veículo do U-75302 (etanol 6%) e a RvE1 no mesmo tempo e pela mesma via, e a carragenina na zero hora. Os dados são apresentados como a média ± EPM da diferença de volume (edema) em **(a)** e da diferença na latência de retirada da pata em resposta ao estímulo mecânico em **(b)** entre a pata

direita e a esquerda nos diferentes tempos de medida. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. N=3-5 / grupo.

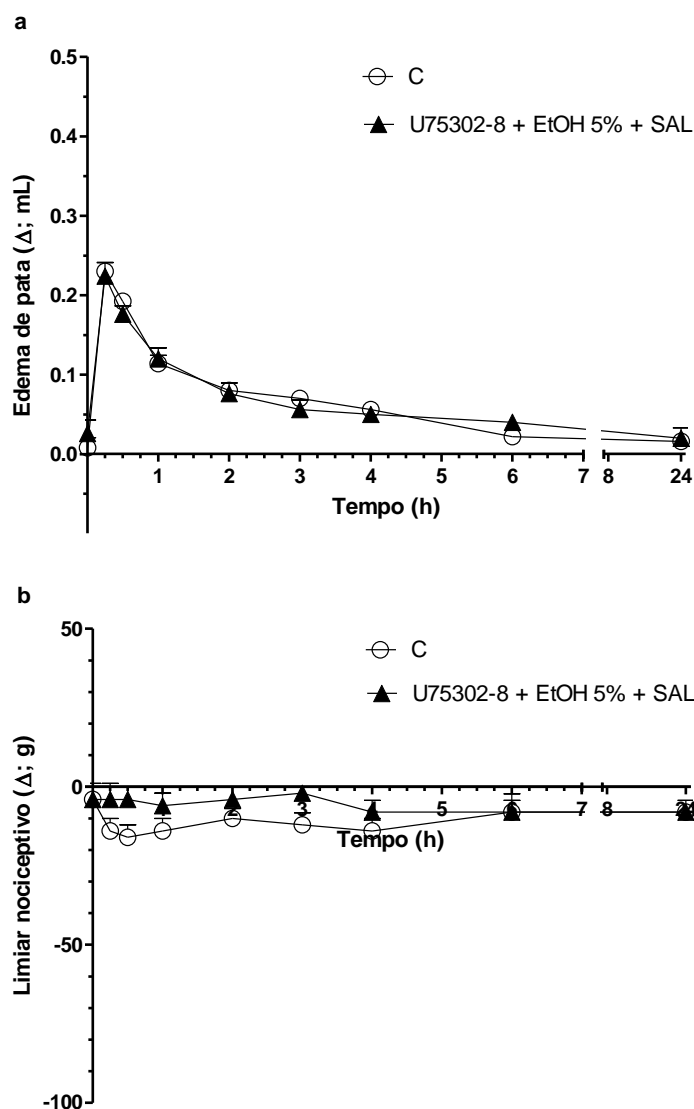


Figura 44. Efeito da administração de U-75302 em patas não inflamadas. U-75302 (8 nmol / 0,1 mL) foi administrado 5 minutos antes do etanol 5% (0,1 mL; veículo da RvE1) que por sua vez foi administrado 10 minutos antes da salina fisiológica estéril (0,1 mL; veículo da carragenina), todos injetados por via subcutânea na pata posterior direita do rato. Os animais do grupo controle (C) receberam o veículo do U-75302 (etanol 6%) e o etanol 5% no mesmo tempo e pela

mesma via, e salina na zero hora. Os dados são apresentados como a média \pm EPM da diferença de volume (edema) em **(a)** e da diferença na latência de retirada da pata em resposta ao estímulo mecânico em **(b)** entre a pata direita e a esquerda nos diferentes tempos de medida. N= 3-5.

5.4.2 GW 1100

O GW 1100, um antagonista seletivo do receptor FFAR1/GPR40, foi administrado por via intraplantar nas doses de 96 e 192 nmol (50 e 100 μ g, respectivamente) 15 minutos antes da injeção da RvE1 (285 pmol), que por sua vez, foi administrada 10 minutos antes da indução do edema e nocicepção com 100 μ g de carragenina. Como pode ser observado na Figura 45, o antagonismo com o GW 1100 não alterou as respostas edematogênica e nociceptiva comparada ao controle com nenhuma das duas doses utilizadas.

É importante ressaltar que assim como na administração de U-75302, a injeção de GW 1100 sem a presença de um estímulo flogogênico não alterou as respostas edematogênica e nociceptiva fisiológicas nos animais de experimentação, conforme apresentado na Figura 46.

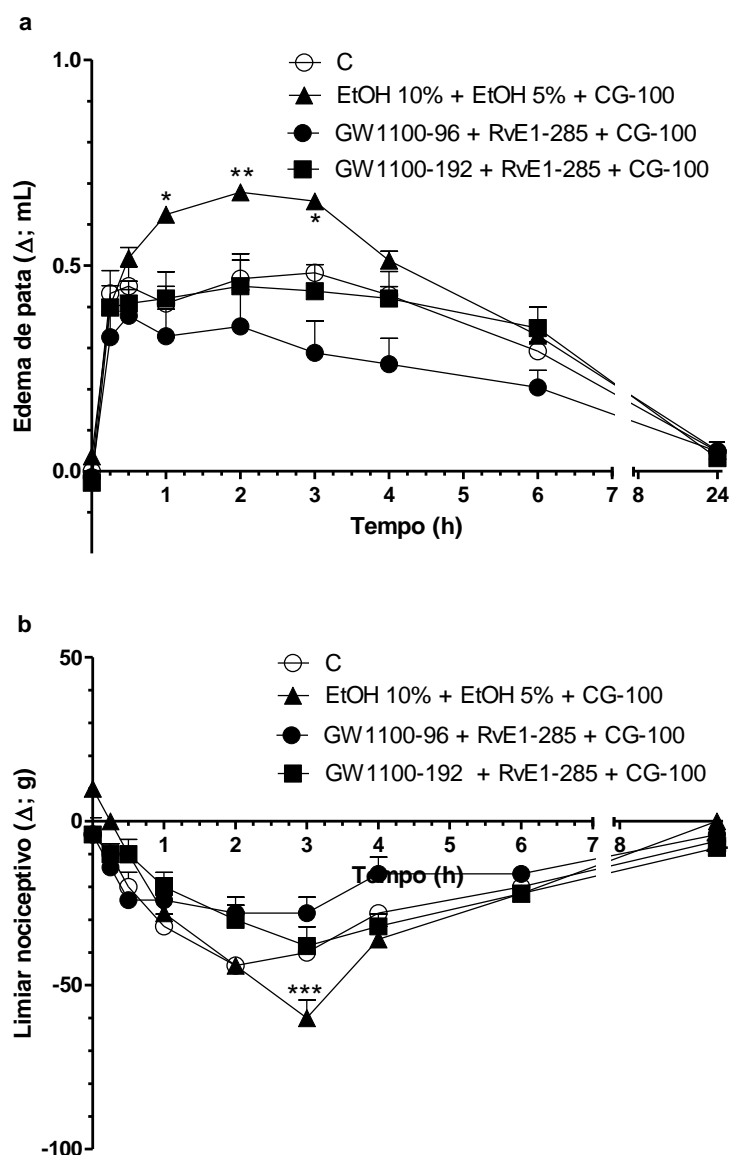


Figura 45. Efeito do GW 1100 sobre o pré-tratamento com resolvina E1 frente ao edema e nociceção induzidos por carragenina na pata de ratos. GW 1100 (96 e 192 nmol / 0,1 mL) foi administrado 15 minutos antes da resolvina E1 (285 pmol / 0,1 mL), que por sua vez foi administrada 10 minutos antes da carragenina (100 μ g / 0,1 mL), todos injetados por via subcutânea na pata posterior direita do rato. Outro grupo de animais recebeu o veículo do GW 1100 (etanol 10%) e da RvE1 (etanol 5%) no mesmo tempo e pela mesma via, e a carragenina na zero hora. Os animais do grupo controle (C) receberam o veículo do GW 1100 (etanol 10%) e a RvE1 no mesmo tempo e pela mesma via, e a carragenina na zero hora. Os dados são apresentados como a média \pm EPM da diferença de volume (edema) em **(a)** e

da diferença na latência de retirada da pata em resposta ao estímulo mecânico em **(b)** entre a pata direita e a esquerda nos diferentes tempos de medida. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. N=3-5 / grupo.

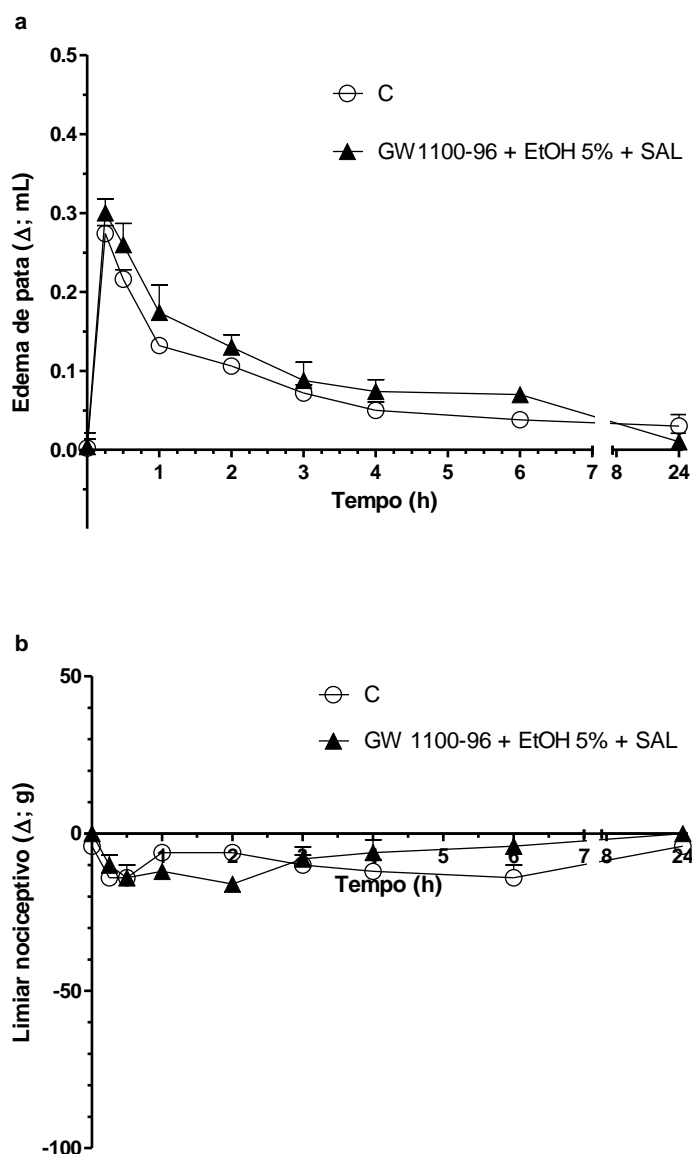


Figura 46. Efeito da administração de GW 1100 em patas não inflamadas. GW 1100 (96 nmol / 0,1 mL) foi administrado 15 minutos antes do etanol 5% (0,1 mL; veículo da RvE1) que por sua vez foi administrado 10 minutos antes da salina fisiológica estéril (0,1 mL; veículo da carragenina), todos injetados por via subcutânea na pata posterior direita do rato. Os animais do grupo controle (C)

receberam o veículo do GW 1100 (etanol 10%) e o etanol 5% no mesmo tempo e pela mesma via, e a salina na zero hora. Os dados são apresentados como a média \pm EPM da diferença de volume (edema) em **(a)** e da diferença na latência de retirada da pata em resposta ao estímulo mecânico em **(b)** entre a pata direita e a esquerda nos diferentes tempos de medida. N= 3-5.

5.4.3 AH 7614

O AH 7614, um antagonista seletivo do receptor FFAR4/GPR120, foi administrado por via intraplantar na dose de 99 nmol (34,8 μ g) 15 minutos antes da injeção da RvE1 (285 pmol), que por sua vez, foi administrada 10 minutos antes da indução do edema e nocicepção com 100 μ g de carragenina. Como pode ser observado na Figura 47, o AH 7614 não foi capaz de induzir resposta significativa em relação ao edema e nocicepção comparadas ao grupo controle.

Além disso, a injeção de AH 7614 sem a presença de um estímulo flogogênico também não alterou as respostas edematogênica e nociceptiva fisiológicas nos animais de experimentação, conforme apresentado na Figura 48.

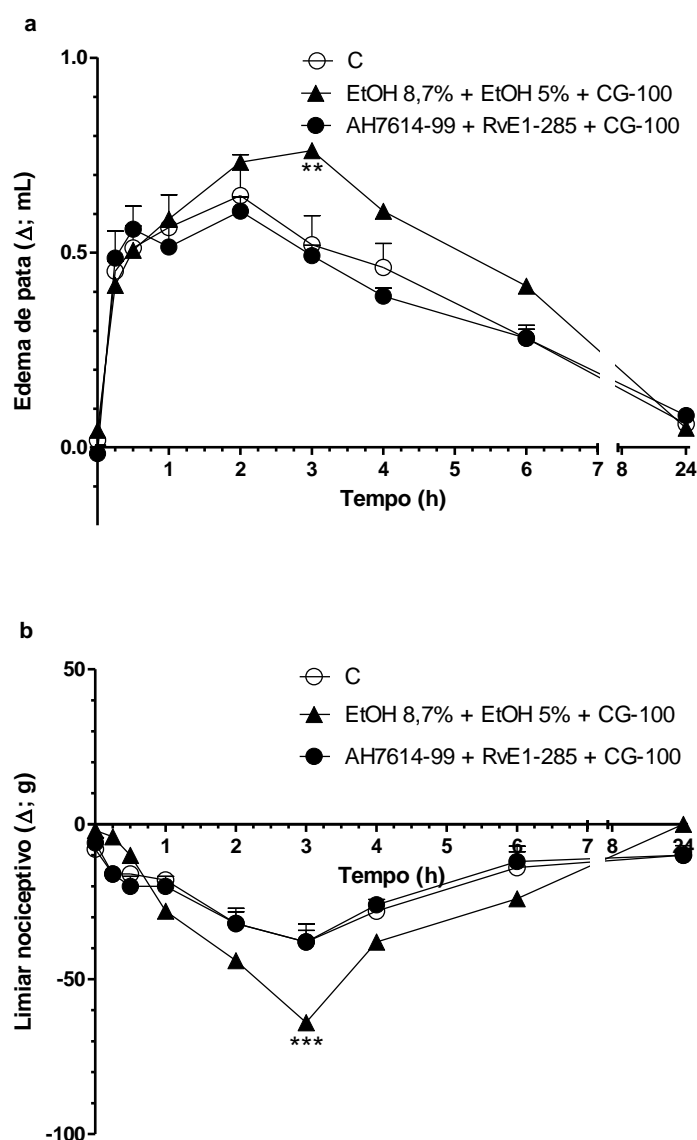


Figura 47. Efeito do AH 7614 sobre o pré-tratamento com resolvina E1 frente ao edema e nocicepção induzidos por carragenina na pata de ratos. AH 7614 (99 nmol / 0,1 mL) foi administrado 15 minutos antes da resolvina E1 (285 pmol / 0,1 mL), que por sua vez foi administrada 10 minutos antes da carragenina (100 µg / 0,1 mL), todos injetados por via subcutânea na pata posterior direita do rato. Outro grupo de animais recebeu o veículo do AH 7614 (etanol 8,7%) e da RvE1 (etanol 5%) no mesmo tempo e pela mesma via, e a carragenina na zero hora. Os animais do grupo controle (C) receberam o veículo do AH 7614 (etanol 8,7%) e a RvE1 no mesmo tempo e pela mesma via, e a carragenina na zero hora. Os dados são apresentados como a média ± EPM da diferença de volume (edema) em **(a)** e da diferença na latência de retirada da pata em resposta ao estímulo mecânico em **(b)**

entre a pata direita e a esquerda nos diferentes tempos de medida. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. N=3-5 / grupo.

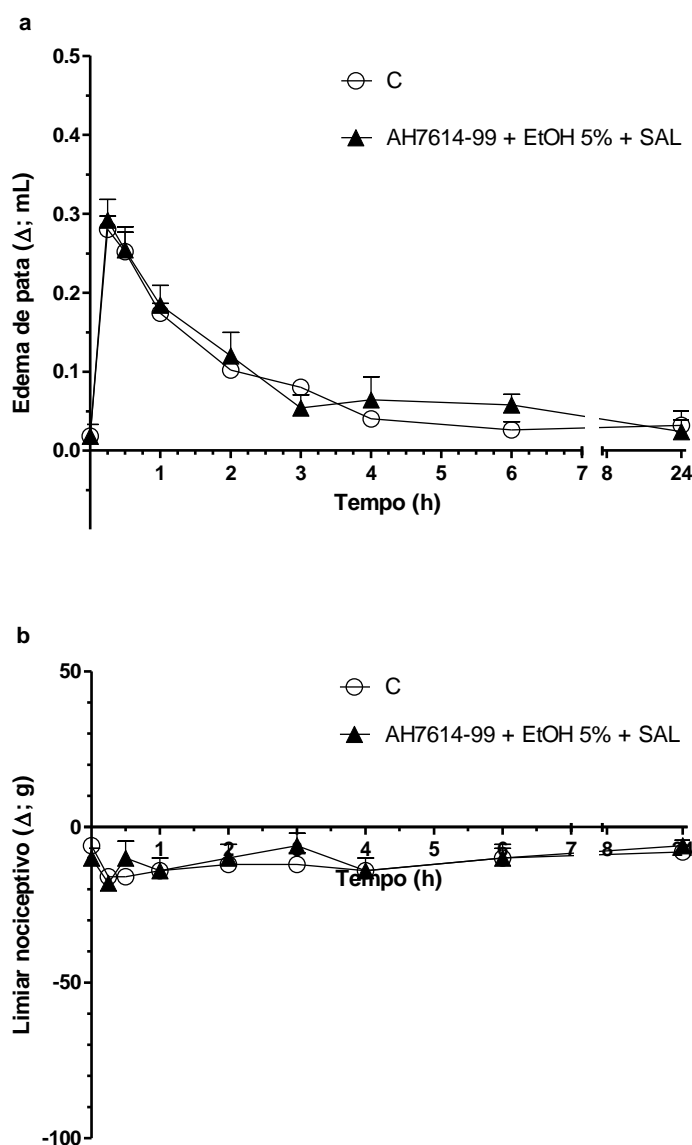


Figura 48. Efeito da administração de AH 7614 em patas não inflamadas. AH 7614 (99 nmol / 0,1 mL) foi administrado 15 minutos antes do etanol 5% (0,1 mL; veículo da RvE1) que por sua vez foi administrado 10 minutos antes da salina fisiológica estéril (0,1 mL; veículo da carragenina), todos injetados por via subcutânea na pata posterior direita do rato. Os animais do grupo controle (C) receberam o veículo do AH 7614 (etanol 8,7%) e o etanol 5% no mesmo tempo e

pela mesma via, e a salina na zero hora. Os dados são apresentados como a média \pm EPM da diferença de volume (edema) em **(a)** e da diferença na latência de retirada da pata em resposta ao estímulo mecânico em **(b)** entre a pata direita e a esquerda nos diferentes tempos de medida. N= 3-5.

5.5 Análise cromatográfica dos padrões de resolvina E1, resolvina D1 e protectina DX empregando cromatografia líquida de alta eficiência associada a detector de absorbância no ultravioleta visível arranjo de fotodiodos

A análise cromatográfica foi realizada com base em métodos descritos na literatura, para verificar a presença das substâncias de interesse nos nossos estudos, nas amostras de padrão comercial. Uma vez que não existe um número considerável de fornecedores e também que o laudo de pureza dessas substâncias não se encontrava disponível, foi preciso verificar a presença de outros compostos na solução padrão para descartar a possibilidade dos efeitos observados serem atribuídos a impurezas e não aos compostos de interesse neste estudo, no caso, a resolvina E1, resolvina D1 e a protectina DX.

Para isso, as amostras foram submetidas a uma separação cromatográfica empregando um cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado a um detector por absorbância na região do ultravioleta e visível com arranjo de fotodiodos (HPLC-DAD) com o objetivo de estimar a pureza dos padrões empregados. Com os dados de tempo de retenção, quantidade de picos presentes no cromatograma, coeluição, formato do pico e perfil do espectro de absorção é possível estimar a pureza dos padrões utilizados. Nos itens 5.5.1 a 5.5.3 estão apresentados os resultados dessas análises.

5.5.1 Resolvina E1

O cromatograma obtido para a RvE1 apresentou um pico majoritário de tempo de retenção de 8,84 minutos, relacionado com a RvE1, conforme ilustrado na Figura 49.

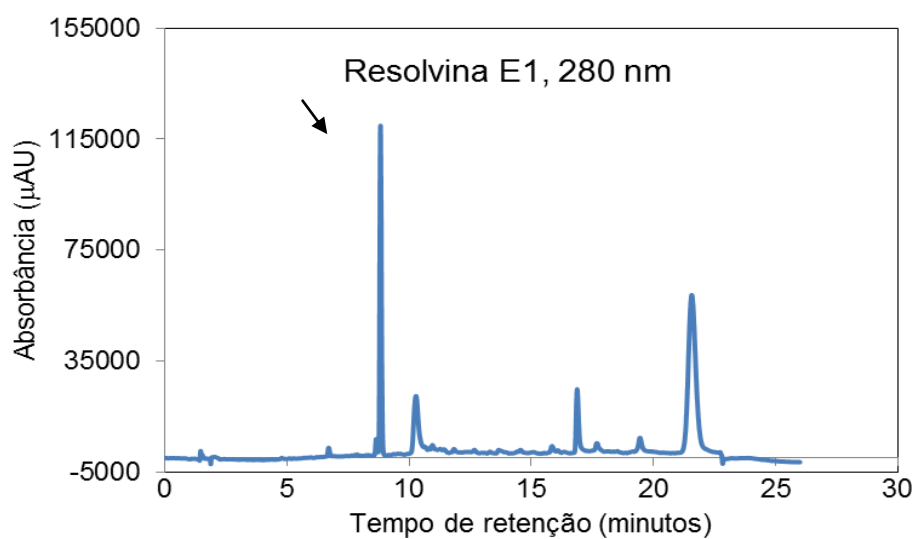


Figura 49. Cromatograma obtido pela análise do padrão da resolvina E1.

O espectro UV-Vis do pico de tempo de retenção de 8,84 minutos está apresentado na Figura 50.

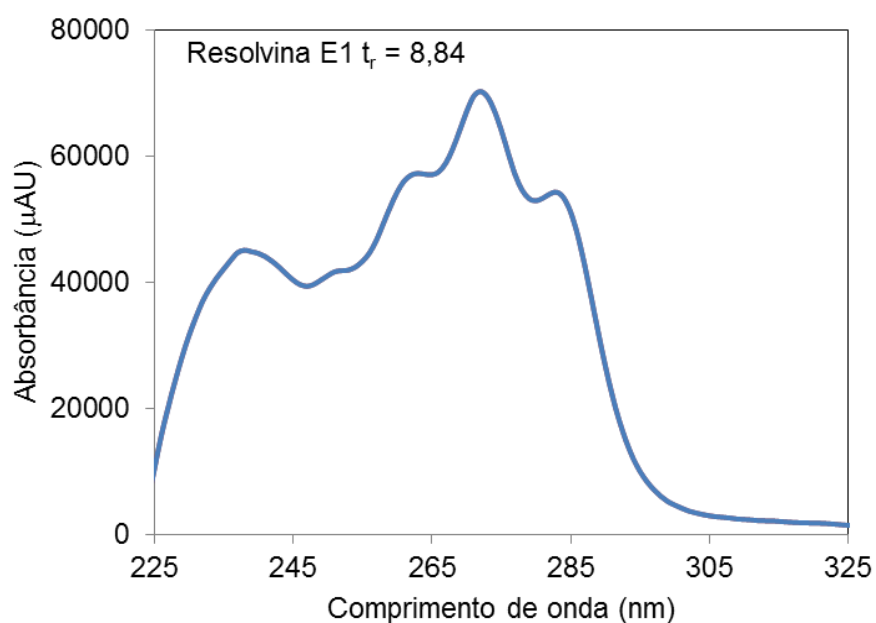


Figura 50. Espectro ampliado do pico de tempo de retenção de 8,84 minutos obtido na análise cromatográfica do padrão da resolvina E1.

5.5.2 Resolvina D1

O cromatograma obtido para a RvD1 apresentou um pico majoritário de tempo de retenção de 11,18 minutos, como ilustrado na Figura 51.

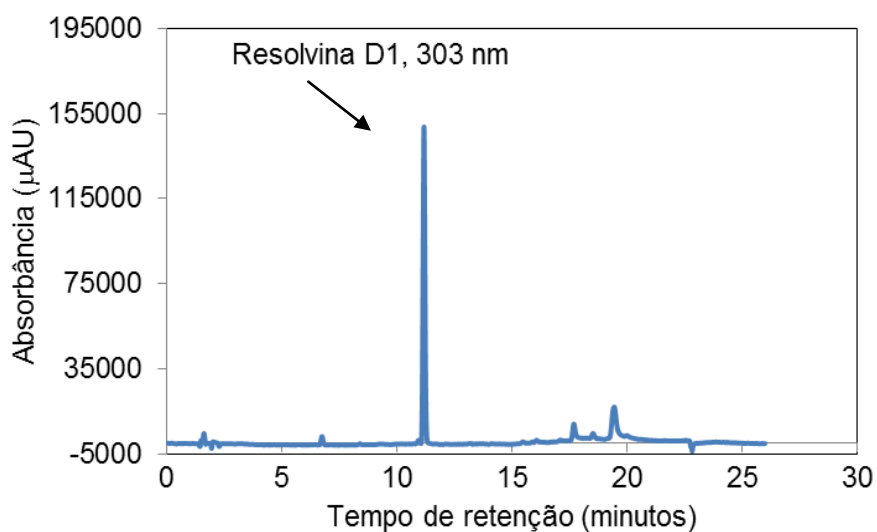


Figura 51. Cromatograma obtido pela análise do padrão da resolvina D1.

O espectro UV-Vis do pico de tempo de retenção de 11,18 minutos está apresentado na Figura 52.

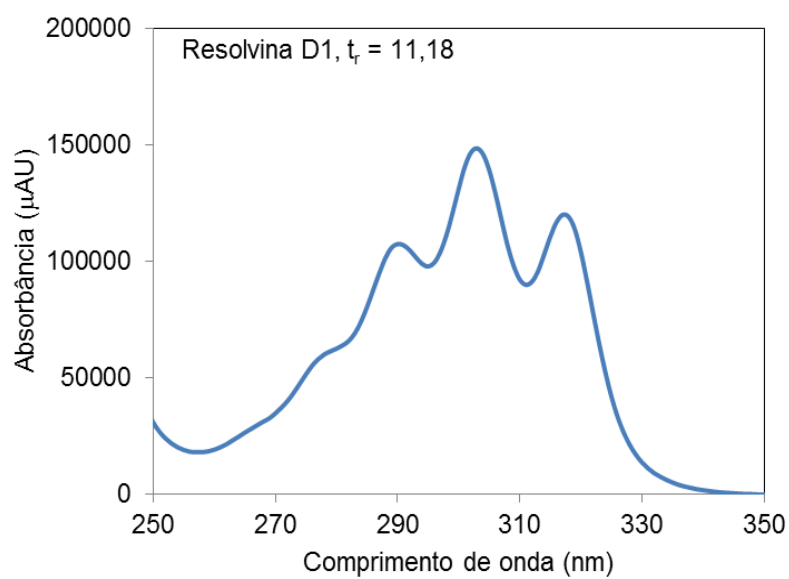


Figura 52. Espectro ampliado do pico de tempo de retenção de 11,18 minutos obtido na análise cromatográfica do padrão da resolvina D1.

5.5.3 *Protectina DX*

O cromatograma obtido para a PDX apresentou um pico majoritário de tempo de retenção de 12,96 minutos, conforme ilustrado na Figura 53.

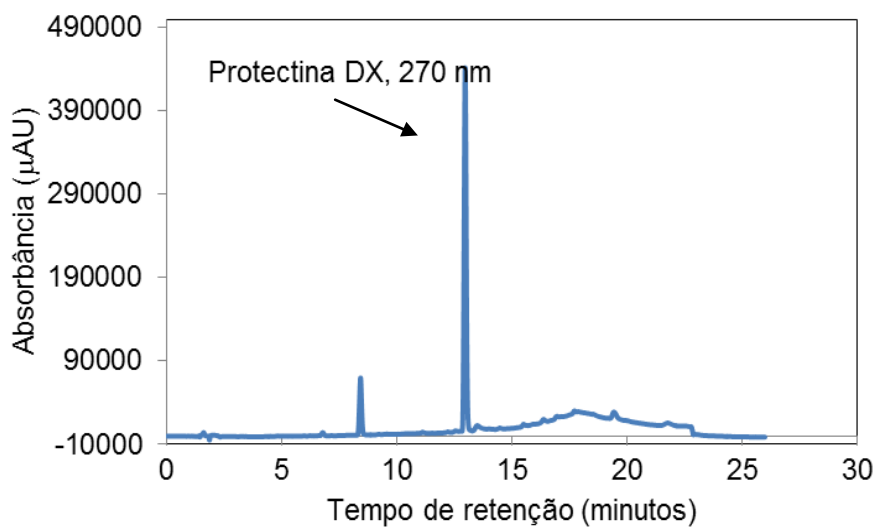


Figura 53. Cromatograma obtido pela análise do padrão da protectina DX.

O espectro UV-Vis do pico de tempo de retenção de 12,96 minutos está apresentado na Figura 54.

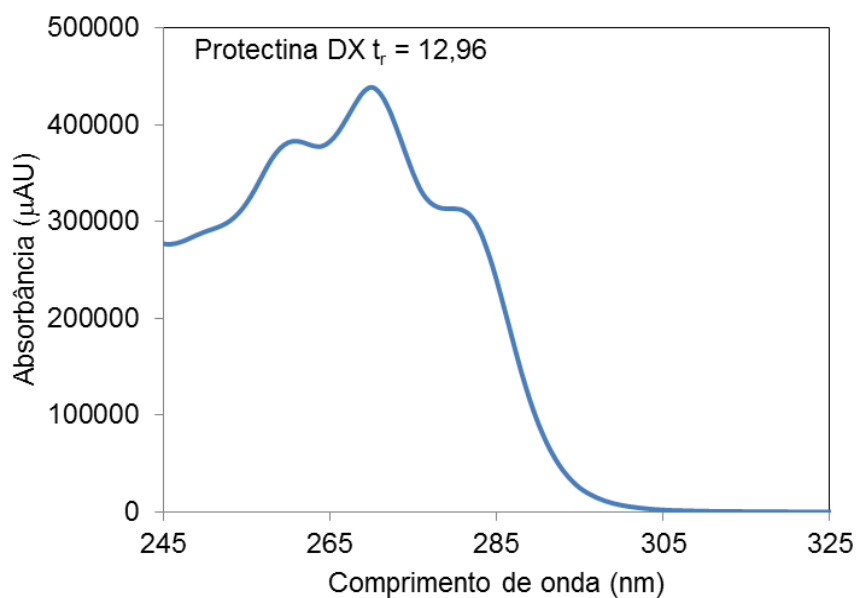


Figura 54. Espectro ampliado do pico de tempo de retenção de 12,96 minutos obtido na análise cromatográfica do padrão da protectina DX.

Ao compararmos os tempos de retenção dos três compostos de interesse (Figura 55) é possível verificar que houve uma completa separação entre os picos e também que nenhum outro pico interferente apresentou coeluição. Isso também foi comprovado ao comparar os espectros de absorção no começo, meio e final de cada pico cromatográfico em que, tanto para as resolvinas, quanto para a protectina eles apresentaram o mesmo perfil (Anexo III), indicando que a separação cromatográfica foi capaz de promover a separação completa de quaisquer interferentes presentes na solução.

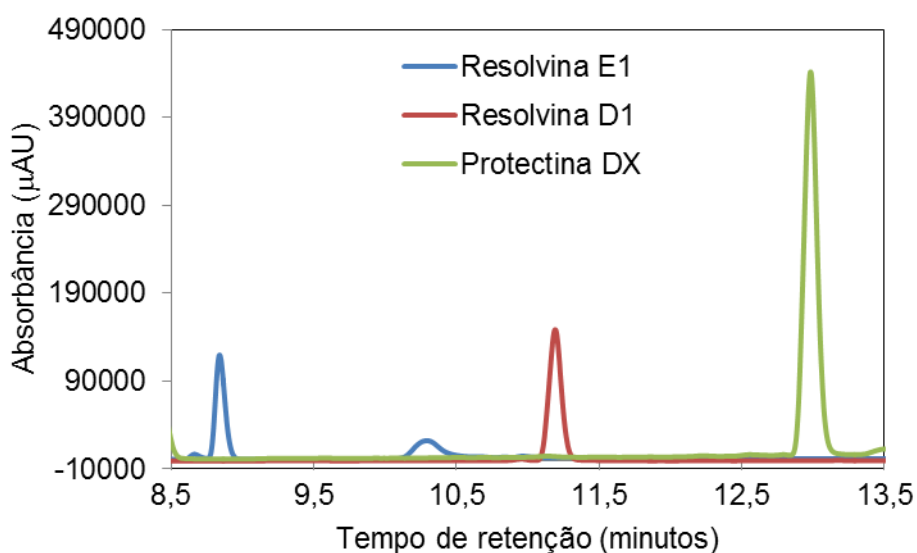


Figura 55. Cromatogramas sobrepostos obtidos pela análise dos padrões de resolvina e protectina.

Ao comparar os espectros de absorção dos picos das resolvinas e protectina com os espectro da literatura pode-se verificar a forte semelhança dos espectros o que indicou o alto teor de pureza do padrão empregado.

Além disso, não foram observados picos de intensidade significativa concomitantes nas amostras dos padrões dessas substâncias e aqueles que são apresentados nos cromatogramas das figuras 49, 51 e 53 foram atribuídos à impurezas dos solventes, frascos, injetor do equipamento, etc uma vez que também apareceram nas injeções de solvente puro no equipamento de HPLC-DAD.

6. DISCUSSÃO

A descoberta de que a resolução da inflamação é um processo ativo no qual atuam mediadores lipídicos pró-resolutivos especializados (SPMs) contribuiu para que novos estudos sobre a fisiopatologia da inflamação e resolução fossem iniciados, tendo como objetivo a sua utilização no tratamento farmacológico de diversas doenças inflamatórias.

No presente trabalho foi observado que dois dos SPMs estudados, a saber, a resolvina E1 e a resolvina D1 inibiram o desenvolvimento de edema e de nocicepção nos modelos experimentais de inflamação e dor agudas induzidos pela carragenina na pata traseira de ratos, enquanto a protectina DX se mostrou sem efeito nos mesmos modelos experimentais.

Várias substâncias químicas são conhecidas por induzir edema e hiperalgesia na pata de ratos, promovendo a liberação de diferentes mediadores inflamatórios. No estudo em questão, utilizou-se a carragenina, que é um polissacarídeo sulfatado extraído principalmente da alga *Chondrus crispus* (DI ROSA, 1972). A sua utilização como um agente capaz de induzir a formação de edema na pata de ratos foi primeiro introduzida por WINTER *et al.*, em 1962. Em 1987, VINEGAR *et al.* descreveram, adicionalmente, que o processo inflamatório induzido pela carragenina ocorria em quarenta e três etapas, com a participação de diferentes mediadores inflamatórios relacionados com sua ação edematogênica.

O modelo de edema de pata traseira em ratos induzido pela carragenina é o modelo mais indicado para avaliação da ação de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), segundo MUKHERJEE *et al.* (1996), sendo considerado ainda hoje o modelo preditivo para AINEs com atividade potencial no ser humano. Por esse motivo, utilizou-se esse modelo para realizar os estudos com os SPMs, bem como o modelo de hiperalgesia mecânica (RANDALL & SELITTO, 1957), também indicado com potencial preditivo para AINEs por MUKHERJEE *et al.* (1996).

Inicialmente, construíram-se curvas dose-reposta utilizando a carragenina como agente flogogênico nos modelos citados acima, sendo obtidos resultados semelhantes a dados já publicados na literatura (FRANCISCHI *et al.*, 2002).

Utilizando os mesmos modelos experimentais, pode-se observar que o pré-tratamento com as resolvinas E1 e D1 corroborou dados da literatura (XU *et al.*, 2010), uma vez que ambas foram capazes de reduzir o edema e a nocicepção induzidos por carragenina. No entanto, deve-se frisar que, apesar de ambos trabalhos terem avaliado o efeito periférico das resolvinas, no trabalho citado o modelo para avaliação da nocicepção utilizou como agente sensibilizante um estímulo térmico, enquanto o estímulo utilizado no presente trabalho foi mecânico. Além disso, neste trabalho a resolvina E1 se mostrou duas vezes mais potente que a D1.

Adicionalmente, observou-se que o pré-tratamento com as resolvinas E1 e D1, separadamente, foi capaz de reduzir o edema induzido apenas pela menor dose de carragenina (100 µg) e que o pós-tratamento com esses mediadores não foi eficaz em nenhuma dose. Com relação à nocicepção, observou-se que o pré e o pós-tratamento com ambas resolvinas, separadamente, reduziram a nocicepção induzida por 100 e 500 µg de CG, respectivamente. Além disso, observou-se que apenas o pré-tratamento com a RvE1 foi capaz de reduzir a nocicepção induzida pela maior dose de CG. Com base nessas observações, pode-se sugerir que os mecanismos fisiopatológicos envolvidos nas respostas edematogênica e nociceptiva a 100 e 500 µg de CG também são diferentes, visto que ambas resolvinas foram capazes de inibir apenas o edema induzido pela menor dose sob pré-tratamento. No entanto, a nocicepção foi inibida por ambas resolvinas com as duas doses utilizadas de CG, sendo a redução com a menor dose observada com o pré-tratamento, e com a maior dose sob pós-tratamento. Outro fato que corrobora essa diferença nos mecanismos envolvidos nas respostas edematogênica e nociceptiva à CG, é o fato de que a administração conjunta de RvE1 e RvD1 não demonstrou um efeito sinérgico em relação a resposta edematogênica, porém esse efeito foi observado na resposta nociceptiva.

Na investigação dos mecanismos envolvidos nas ações das resolvinas, Xu e seus colaboradores (2010) demonstraram que a ação anti-inflamatória da RvE1 se deve à sua capacidade de reduzir a expressão de citocinas pró-inflamatórias (como por exemplo, TNF- α , IL-1 β e IL-6) e a infiltração de neutrófilos em patas inflamadas. Nesse sentido, uma possível explicação para o efeito antinociceptivo dessa resolvina

possa ser a redução de TNF- α e IL-1 β , que são citocinas importantes para a patogênese da dor inflamatória (POOLE *et al.*, 1995; KAWASAKI *et al.*, 2008; SAMAD *et al.*, 2001; JUNGER and SORKIN, 2000). Essa explicação poderia justificar o efeito da RvE1 na redução do edema e da nocicepção induzidos pela menor dose de CG. No entanto, avaliando-se o edema e a nocicepção induzidos pela maior dose de CG, observou-se que o tratamento com a RvE1 induziu uma redução na nocicepção sem concomitante redução no edema. Tal fato sugere que outros fatores poderiam estar influenciando o efeito antinociceptivo da RvE1, e não apenas uma redução de TNF- α e IL-1 β .

O edema e a nocicepção induzidos pela carragenina na pata traseira de ratos ocorre mediante a participação de diferentes mediadores inflamatórios (VINEGAR *et al.*, 1987). Esse processo se caracteriza por apresentar três fases sendo a primeira (0-90 min) conduzida pela liberação de histamina e serotonina, seguida por uma segunda fase (60-150 min) na qual há a liberação de cininas. Após 150 minutos da administração de carragenina, estabelece-se a terceira fase, sustentada pela liberação de metabólitos do ácido araquidônico, principalmente prostaglandinas, proporcionando dessa forma o aumento do volume e da hiperalgesia da pata até a terceira e quarta horas (DI ROSA, 1972), também observados no presente trabalho.

Com base nesse conhecimento e no intuito de melhor entender os mecanismos e as fases envolvidas nas ações anti-edematogênica e antinociceptiva das resolvinas E1 e D1 frente à carragenina, utilizaram-se os modelos de edema e de hiperalgesia mecânica de pata induzidos pela injeção intraplantar de histamina (H), serotonina (5-HT), substância P (SP) e prostaglandina E₂ (PGE₂). Nesses modelos, observou-se que os efeitos máximos das resolvinas ocorriam até trinta minutos após a injeção de H, 5-HT e SP, e até duas horas após a injeção de PGE₂.

Analisando separadamente cada resolvina nos modelos citados acima, pode-se observar que: com relação ao edema, o pré-tratamento com a RvE1 não foi capaz de alterar a resposta induzida por SP e PGE₂ e, surpreendentemente, aumentou o edema induzido por H e 5-HT; já a RvD1 não alterou a resposta induzida por H e PGE₂, reduziu o edema induzido por 5-HT e, surpreendentemente, aumentou o edema induzido por SP. Com relação à nocicepção, o pré-tratamento com a RvE1 foi capaz de reduzir a nocicepção induzida por todos os agentes

utilizados; já a RvD1 não alterou a nocicepção induzida por SP e PGE₂, e foi capaz de reduzir a nocicepção induzida por H e 5-HT.

Baseando-se nos resultados obtidos, pode-se sugerir que os mecanismos envolvidos nas ações anti-edematogênica e antinociceptiva da RvE1 e da RvD1 nos modelos de edema e hiperalgesia mecânica na pata traseira de ratos são diferentes, haja visto a disparidade de respostas observadas com os diferentes mediadores estudados. Além disso, demonstra-se que é fundamental ter o conhecimento dos efeitos produzidos pelas resolvinas sobre as respostas aos diferentes mediadores pró-inflamatórios, uma vez que a utilização dessas substâncias em determinadas enfermidades poderá potencializar o quadro patológico. Por exemplo, a utilização de RvE1 em uma inflamação alérgica poderá agravar o quadro inflamatório devido à sua ação no edema induzido pela histamina (AKDIS and BLASER, 2003).

Para verificar se as respostas anti-inflamatórias e antinociceptivas apresentadas pelas resolvinas envolveriam inibição das ciclooxigenases, ou seja, se os SPMs aqui estudados apresentariam um mecanismo de ação comum aos AINEs, foi realizado um estudo comparativo para avaliar os efeitos da indometacina e do celecoxibe nos modelos de edema e hiperalgesia mecânica induzidos por carragenina na pata de ratos. Verificou-se que o pré-tratamento com a indometacina reduziu o edema e a nocicepção induzidos por 500 µg de CG, porém não o fez com a dose menor (100 µg), efeitos esses divergentes dos observados com as resolvinas. Em adição, esse dado ainda confirma a hipótese de que as respostas a 100 e 500 µg de CG são diferentes, como já proposto no trabalho de VINEGAR *et al.*, em 1987.

Utilizando o pré-tratamento com o celecoxibe, observou-se que houve uma redução apenas na nocicepção com a maior dose de CG. FRANCISCHI *et al.* em 2002 demonstraram que a mesma dose de celecoxibe utilizada no presente trabalho (30 mg/kg) era capaz de reduzir tanto o edema quanto a nocicepção induzidos por 250 µg de CG, sugerindo mais uma vez que as respostas a doses distintas de CG são diferentes.

E, por último, procuramos comparar as respostas dos SPMs aqui utilizados com um anti-inflamatório esteroidal (AIE), a dexametasona. Observou-se que esse

fármaco foi o mais eficiente dentre os tratamentos farmacológicos utilizados, reduzindo tanto o edema quanto a nocicepção induzidos por 100 e 500 µg de CG. Curiosamente, pode-se observar também que aumentando a dose do estímulo pró-inflamatório, houve um aumento da eficácia da dexametasona.

Confrontando esses dados, fica evidente que os mecanismos envolvidos nas ações das resolvinas e dos AINEs são diferentes, ou seja, a ação das resolvinas provavelmente não se deve à inibição das ciclooxigenases e, conseqüentemente, dos produtos gerados pelas mesmas, tais como as prostaglandinas, como ocorre com os AINEs. Além disso, observou-se que não deve haver uma produção significativa de prostaglandinas com a utilização de 100 µg de CG, uma vez que os AINEs não obtiveram sucesso na redução do edema e da nocicepção com essa dose de CG.

Comparando-se o efeito da dexametasona com o efeito produzido pelas resolvinas E1 e D1, observou-se que a DEXA obteve melhores resultados em relação à redução de edema e nocicepção, já que ela foi eficaz com as duas doses utilizadas de carragenina e, além disso, apresentou maiores porcentagens de redução do edema e da nocicepção induzidos pela CG. O mecanismo de ação da DEXA envolve a ligação dessa molécula a receptores intracelulares específicos e a estimulação da transcrição gênica para exercer as suas atividades anti-inflamatórias e imunossupressoras (ADCOCK, 2003). Esse fármaco também é responsável pela inibição da fosfolipase A₂, enzima responsável pela conversão dos fosfolipídios de membrana em ácido araquidônico e, conseqüentemente, acarreta em uma redução dos produtos formados a partir da metabolização desse ácido pelas ciclooxigenases, assim como ocorre com os AINEs. A utilização de AIEs deve ser feita com cautela devido aos vários efeitos adversos provocados por essa classe de medicamentos, uma vez que eles interferem no metabolismo geral do organismo.

Para verificar se receptores específicos estariam envolvidos nas ações anti-edematogênica e antinociceptiva das resolvinas nos modelos de edema e hiperalgisia mecânica induzida por carragenina na pata traseira de ratos, utilizou-se o U-75302, um antagonista seletivo de BLT1, um dos receptores ao qual a RvE1 se liga. Em 2007, ARITA *et al.* demonstraram que a RvE1 se liga ao BLT1 atenuando os sinais pró-inflamatórios induzidos pela ligação de LTB₄ a esse receptor, o que

poderia justificar a redução na migração de PMNs para o local inflamado. Outro fator que corrobora essa hipótese é a redução das ações anti-inflamatórias observadas em camundongos *knockout* para BLT1 e tratados com RvE1 em um modelo de peritonite induzida por zymosan (TAGER *et al.*, 2000; ARITA *et al.*, 2007). Nos modelos experimentais utilizados nesse estudo, o U-75302 reverteu a redução do edema e da nocicepção induzidos por carragenina sob tratamento com RvE1, sugerindo dessa forma, que os efeitos anti-edematogênico e antinociceptivo da RvE1 nesses modelos ocorram mediante a ligação dessa resolvina ao receptor BLT1.

Além desse antagonista, também foram utilizados os antagonistas dos receptores GPR40 e GPR120, que são receptores conhecidos por serem ativados por ácidos graxos livres (BROWN; JUPE and BRISCOE, 2005), tais como o ácido eicosapentaenóico, que é precursor da RvE1. A administração de GW1100 (antagonista seletivo do receptor GPR40) e de AH7614 (antagonista seletivo do receptor GPR120) não alterou as respostas edematogênica e nociceptiva induzidas por carragenina em animais pré-tratados com RvE1. Sendo assim, pode-se sugerir que a RvE1 não exerce as suas ações, nos modelos experimentais estudados, mediante a ativação desses receptores corroborando a hipótese de Oh *et al.* (2010), de que os metabólitos de ácidos graxos poliinsaturados do tipo ômega-3, tais como as resolvinas e as protectinas, não ativam os receptores GPR40 e GPR120.

As resolvinas, bem como os antagonistas, são diluídas em etanol e, portanto, também foi avaliado o efeito desse solvente. Observou-se que o etanol nas concentrações de 5 e 10% em salina fisiológica estéril (via intraplantar) aumentou as respostas edematogênica e nociceptiva induzidas pela carragenina. Esse achado corrobora dados da literatura, como no trabalho de TATSUO *et al.* (1997), no qual mostrou-se um efeito nociceptivo do etanol, via receptor GABA-A, administrado sistemicamente (via oral) no teste de retirada de cauda. Adicionalmente, FRANKLIN & ABBOTT (1993), apresentaram um efeito nociceptivo do etanol no teste da formalina, também mediado por receptores GABA-A. Em relação ao aumento de edema, a literatura apresenta trabalhos contraditórios. STRUBELT & ZETLER (1980) mostraram um efeito anti-inflamatório do etanol (via oral) no modelo de edema de pata e de pleurisia induzidos por carragenina. Em contrapartida, trabalhos

apresentaram um aumento de edema cerebral e respostas pró-inflamatórias após tratamento com etanol (KATADA *et al.*, 2009 e LIU *et al.*, 2014). O presente trabalho mostrou que, apesar desses efeitos observados em conjunto com a carragenina, a injeção intraplantar de etanol 10% isoladamente não alterou as repostas edematogênica e nociceptiva dos animais de experimentação. Com base nesses resultados e em dados obtidos da literatura, sugere-se um estudo detalhado acerca dos efeitos locais do etanol, já que nos trabalhos encontrados só há estudos envolvendo a administração sistêmica desse solvente.

Por fim, as resolvinas e protectinas, devido a características intrínsecas de suas moléculas, como por exemplo, grupamentos hidroxila e carboxila disponíveis, são substâncias passíveis de sofrerem degradação facilmente, gerando metabólitos inativos. Dessa forma, as amostras de padrão comercial de resolvina E1, resolvina D1 e protectina DX foram analisadas por HPLC-DAD e os espectros de absorção dos picos obtidos foram semelhantes aos espectros obtidos na literatura conforme apresentado por ARITA e seus colaboradores (2006) para a RvE1, por SUN e seus colaboradores (2007) para a RvD1, e por CHEN e seus colaboradores (2009) para a PDX. Nossos resultados indicaram um elevado teor de pureza das substâncias analisadas, sugerindo que as ações obtidas com a utilização desses mediadores nos modelos experimentais estudados se referem de fato às moléculas de resolvina E1, resolvina D1 e a protectina DX.

Enfim, ao final desse trabalho foi possível concluir que as resolvinas E1 e D1, administradas perifericamente, têm grande potencial de utilidade como substâncias analgésicas, mas seu uso prolongado pode estar associado ao desenvolvimento de efeitos adversos relacionados com a atividade pró-inflamatória detectada.

7. CONCLUSÕES

A) Principais

- 1) A resolvina E1 é duas vezes mais potente que a resolvina D1 nos modelos de edema e hiperalgisia mecânica na pata traseira de ratos;
- 2) Sugere-se que o perfil de atividade anti-edematogênica e antinociceptiva da RvE1 seja diferente da RvD1 nos modelos experimentais avaliados;
- 3) Os mecanismos envolvidos nas ações anti-inflamatórias e antinociceptivas das resolvinas e dos AINEs são diferentes;
- 4) Os receptores GPR40 e GPR120 não parecem estar envolvidos nas ações anti-edematogênica e antinociceptiva da RvE1 nos modelos experimentais estudados;
- 5) Provavelmente os efeitos anti-edematogênico e antinociceptivo da RvE1 nos modelos experimentais avaliados ocorra mediante a ligação da RvE1 ao receptor BLT1;
- 6) As resolvinas E1 e D1, administradas periféricamente, têm potencial para serem melhores candidatas a fármacos analgésicos do que a fármacos anti-inflamatórios.

B) Secundárias

- 1) A nocicepção induzida por carragenina nos ratos Holtzman é maior que na linhagem Wistar;
- 2) Os mecanismos envolvidos nas respostas edematogênica e nociceptiva a doses distintas de CG são diferentes;
- 3) Os espectros de absorção dos picos obtidos por HPLC-DAD indicaram um elevado teor de pureza das substâncias analisadas, a saber, resolvina E1, resolvina D1 e protectina DX.

REFERÊNCIAS

ADCOCK, I. M. Glucocorticoids: New Mechanisms and Future Agents. **Current Allergy and Asthma Reports**. v.3, p. 249–257, 2003.

AKDIS, C. A.; BLASER, K. Histamine in the immune regulation of allergic inflammation. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v. 112, n.1, p. 15-22, 2003.

AOKI, H.; HISADA, T.; ISHIZUKA, T.; UTSUGI, M.; KAWATA, T.; SHIMIZU, Y.; OKAJIMA, F.; DOBASHI, K.; MORI, M. Resolvin E1 dampens airway inflammation and hyperresponsiveness in a murine model of asthma. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 367, p. 509–515, 2008.

AOKI, H.; HISADA, T.; ISHIZUKA, T.; UTSUGI, M.; ONO, A.; KOGA, Y.; SUNAGA, N.; NAKAKURA, T.; OKAJIMA, F.; DOBASHI, K.; MORI, M. Protective effect of resolvin E1 on the development of asthmatic airway inflammation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 400, n. 1, p. 128–33, 2010

ARITA, M., BIANCHINI, F., ALIBERTI, J., SHER, A., CHIANG, N., HONG, S., YANG, R., PETASIS, N. A. SERHAN, C. N. Stereochemical assignment, antiinflammatory properties, and receptor for the omega-3 lipid mediator resolvin E1. **The Journal of Experimental Medicine**. v. 201, n. 5, p. 713-722, 2005a.

ARITA M., CLISH C. B., SERHAN C. N. The contributions of aspirin and microbial oxygenase in the biosynthesis of anti-inflammatory resolvins: novel oxygenase products from ω -3 polyunsaturated fatty acids. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 338, p. 149–157, 2005.

ARITA, M.; OH, F. S.; CHONAN, T.; HONG, S.; ELANGO VAN, S.; SUN, Y.; UDDIN, J.; PETASIS, N. A.; SERHAN, C. N. Metabolic Inactivation of Resolvin E1 and Stabilization of Its Anti-inflammatory Actions. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 32, p. 22847-22854, 2006.

ARITA, M.; OHIRA, T.; SUN, Y-P.; ELANGO VAN, S.; CHIANG, N.; SERHAN, C. N. Resolvin E1 Selectively Interacts with Leukotriene B4 Receptor BLT1 and ChemR23 to Regulate Inflammation. **The Journal of Immunology**. v. 178, p. 3912-3917, 2007.

ARITA, M.; YOSHIDA, M.; HONG, S.; TJONAHEN, E.; GLICKMAN, J. N.; PETASIS, N. A.; BLUMBERG, R. S.; SERHAN, C. N. Resolvin E1, an endogenous lipid

mediator derived from omega-3 eicosapentaenoic acid, protects against 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 102, n. 21, p. 7671-7676, 2005b.

BANNENBERG, G. L.; CHIANG, N.; ARIEL, A.; ARITA, M.; TJONAHEN, E.; GOTLINGER, K. H.; HONG, S.; SERHAN, C. N. Molecular circuits of resolution: formation and actions of resolvins and protectins. **The Journal of Immunology**. v. 74, p. 4345–4355, 2005.

BANNENBERG, G.; SERHAN, C. N. Specialized pro-resolving lipid mediators in the inflammatory response: an update. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1801, n. 12, p. 1260-1273, 2010.

BRISCOE, C. P.; PEAT, A. J.; MCKEOWN, S. C.; CORBETT, D. F.; GOETZ, A. S.; LITTLETON, T. R.; MCCOY, D. C.; KENAKIN, T. P.; ANDREWS, J. L.; AMMALA, C.; FORNWALD, J. A.; IGNAR, D. M.; JENKINSON, S. Pharmacological regulation of insulin secretion in MIN6 cells through the fatty acid receptor GPR40: identification of agonist and antagonist small molecules. **British Journal of Pharmacology**. v. 148, p. 619–628, 2006.

BRISCOE, C. P.; TADAYYON, M.; ANDREWS, J. L.; BENSON, W. G.; CHAMBERS, J. K.; ELIERT M. M.; ELLIS, C.; ELSHOURBAGY, N. A.; GOETZ, A. S.; MINNICK, D. T.; MURDOCK, P. R.; SAULS, H. R.; SHABON, U.; SPINAGE, L. D.; STRUM, J. C.; SZEKERES, P. G.; TAN, K. B.; WAY, J. M.; IGNAR, D. M.; WILSON, S.; MUIRL, A. I. The orphan G protein-coupled receptor GPR40 is activated by medium and long chain fatty acids. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 278, n. 13, p. 11303-11311, 2003.

BROWN, A. J.; JUPE, S.; BRISCOE, C. P. A family of fatty acid binding receptors. **DNA and Cell Biology**. v. 24, n.1, p. 54–61, 2005.

BUCKLEY, C. D.; GILROY, D. W.; SEHRAN, C. N.; STOCKINGER, B.; TAK P. P. Viewpoint: The resolution of inflammation. **Nature Reviews Immunology**. v. 13, p. 59-66, 2013.

BUTOVICH, I. A. On the structure and synthesis of neuroprotectin D1, a novel anti-inflammatory compound of the docosahexaenoic acid Family. **Journal of Lipid Research**. v. 46, p. 2311-2314, 2005.

CAMPBELL, E. L., LOUIS, N. A., TOMASSETTI, S. E., CANNY, G. O., ARITA, M., SERHAN, C. N. COLGAN, S. P. Resolvin E1 promotes mucosal surface clearance of

neutrophils: a new paradigm for inflammatory resolution. **The FASEB Journal**. v. 21, p. 3162-3170, 2007.

CHAN, C. C.; BOYCE, S.; BRIDEAU, C.; CHARLESON, S.; CROMLISH, W.; ETHIER, D.; EVANS, J.; FORD-HUTCHINSON, A. W.; FORREST, M. J.; GAUTHIER, J. Y.; GORDON, R.; GRESSER, M.; GUAY, J.; KARGMAN, S.; KENNEDY, B.; LEBLANC, Y.; LEGER, S.; MANCINI, J.; O'NEILL, G. P.; OUELLET, M.; PATRICK, D.; PERCIVAL, M. D.; PERRIER, H.; PRASIT, P.; RODGER, I.; TAGARI, P.; THERIEN, M.; VICKERS, P.; VISCO, D.; WANG, Z.; WEBB, J.; WONG, E.; XU, L. J.; YOUNG, R. N.; ZAMBONI, R.; RIENDEAU, D. Rofecoxib [Vioxx, MK-0966; 4-(49-Methylsulfonylphenyl)-3-phenyl-2-(5*H*)-furanone]: A Potent and Orally Active Cyclooxygenase-2 Inhibitor. Pharmacological and Biochemical Profiles. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics (JPET)**, v. 290, No. 2, p. 551-560, 1999.

CHEN, P.; FENET, B.; MICHAUD, S.; TOMCZYK, N.; VÉRICEL, E.; LAGARDE, M.; GUICHARDANT, M. Full characterization of PDX, a neuroprotectin/protectin D1 isomer, which inhibits blood platelet aggregation. **FASEB Letters**, v. 583, p. 3478–3484, 2009.

CHEN, P.; VÉRICEL, E.; LAGARDE, M.; GUICHARDANT, M. Poxyrins, a class of oxygenated products from polyunsaturated fatty acids, potently inhibit blood platelet aggregation. **The FASEB Journal**. v. 25, n. 1, p. 382-388, 2011.

CHRISTIE, W. W. Resolvins and protectins: Chemistry and Biology. **AOCS Lipid Library**. p. 1-6, 2014.

CONNOR, K. M.; SANGIOVANNI, J. P.; LOFQVIST, C.; ADERMAN, C. M.; CHEN, J.; HIGUCHI, A.; HONG, S.; PRAVDA, E. A; MAJCHRZAK, S.; CARPER, D.; HELLSTROM, A.; KANG, J. X.; CHEW, E.Y.; SALEM, N. JR.; SERHAN C. N.; SMITH, L. E. Increased dietary intake of omega-3-polyunsaturated fatty acids reduces pathological retinal angiogenesis. **Nature Medicine**. v.13, p. 868–873, 2007.

DE PAIVA, C. S.; SCHWARTZ, C. E.; GJORSTRUP, P.; PFLUGFELDER, S. C. Resolvin E1 (RX-10001) reduces corneal epithelial barrier disruption and protects against goblet cell loss in a murine model of dry eye. **Cornea**. v. 31, n. 11, p.1299-1303, 2012.

DI ROSA, M. Review: Biological properties of carrageenan. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 24, p. 89-102, 1972.

DUFFIELD, J. S.; HONG, S.; VAIDYA, V.; LU, Y.; FREDMAN, G.; SERHAN, C. N.; BONVENTRE, J. V. Resolvin D series and protectin D1 mitigate acute kidney injury. **The Journal of Immunology**. v. 177, p. 5902–5911, 2006.

FILHO, G. B. Inflamações. In: **Bogliolo: Patologia Geral**. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

FRANÇA, D. S.; FERREIRA-ALVES, D. L.; DUARTE, I. D. G.; RIBEIRO, M. C.; REZENDE, R. M.; BAKHLE, Y. S.; FRANCISCHI, J. N. Endogenous opioids mediate the hypoalgesia induced by selective inhibitors of cyclo-oxygenase 2 in rat paws treated with carrageenan. **Neuropharmacology**, v. 51, n. 1, p. 37–43, 2006.

FRANCISCHI, J. N.; CHAVES, C. T.; MOURA, A. C. L.; LIMA, A. S.; ROCHA, O. A.; FERREIRA-ALVES, D. L.; BAKHLE, Y. S. Selective inhibitors of cyclooxygenase-2 (COX-2) induce hypoalgesia in a rat paw model of inflammation. **British Journal of Pharmacology**, v. 137, n.6, p. 837-844, 2002.

FRANCISCHI, J. N.; DIAS, M. F.; ROCHA, O. A.; CASTRO, M. S. A.; TATSUO, M. A. K. F.; FARINELLI, P.; PACHECO, C. M. F.; FERREIRA-ALVES, D. L.; SIROIS, P. Pharmacological characterization of Sephadex-induced oedema in rat paws: Predominant role of serotonin and platelet-activating factor. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 109, n. 4, p. 398-406, 1996.

FRANKLIN, K. B. J.; ABBOTT, F. V. Pentobarbital, Diazepam, and Ethanol Abolish the Interphase Diminution of Pain in the Formalin Test: Evidence for Pain Modulation by GABAA Receptors. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**. v. 46, p. 661-666, 1993.

GILROY, D. W.; LAWRENCE, T.; PERRETTI, M.; ROSSI, A. G. Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. **Nature Reviews - Drug Discovery**. v. 3, p. 401–416, 2004.

GOMIDES, L. F.; DUARTE, I. D.; FERREIRA, R. G.; PEREZ, A. C., FRANCISCHI, J. N.; KLEIN, A. Proteinase-Activated Receptor-4 Plays a Major Role in the Recruitment of Neutrophils Induced by Trypsin or Carrageenan during Pleurisy in Mice. **Pharmacology**. v. 89, n. 5-6, p. 275-282, 2012.

HASTURK, H.; KANTARCI, A.; OHIRA, T.; ARITA, M.; EBRAHIMI, N.; CHIANG, N.; PETASIS, N. A.; LEVY, B. D.; SERHAN, C. N.; VAN DYKE, T. E. RvE1 protects from local inflammation and osteoclast-mediated bone destruction in periodontitis. **The FASEB Journal**. v. 20, p. 401-403, 2006.

HELLMANN, J.; TANG, Y.; KOSURI, M.; BHATNAGAR, A.; SPITE, M. Resolvin D1 decreases adipose tissue macrophage accumulation and improves insulin sensitivity in obese-diabetic mice. **The FASEB Journal**. v.25, p. 2399–2407, 2011.

HIRASAWA, A.; TSUMAYA, K.; AWAJI, T.; KATSUMA, S.; ADACHI, A.; YAMADA, M.; SUGIMOTO, Y.; MIYAZAKI, S.; TSUJIMOTO, G. Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. **Nature Medicine**. v. 11, n. 1, p. 90-94, 2005.

HUANG, L.; WANG, C. F.; SERHAN, C. N.; STRICHARTZ, G. Enduring prevention and transiente reduction of postoperative pain by intrathecal resolvin D1. **Pain**. v. 152, n. 3, p. 557-565, 2011.

HUME, D. A.; FAIRLIE, D. P. Therapeutic targets in inflammatory disease. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 25, p. 2925-9, 2005.

ITOH, Y.; KAWAMATA, Y.; HARADA, M.; KOBAYASHI, M.; FUJII, R.; FUKUSUMI, S.; OGI, K.; HOSOYA, M.; TANAKA, Y.; UEJIMA, H.; TANAKA, H.; MARUYAMA, M.; SATOH, R.; OKUBO, S.; KIZAWA, H.; KOMATSU, H.; MATSUMURA, F.; NOGUCHI, Y.; SHINOHARA, T.; HINUMA, S.; FUJISAWA, Y.; FUJINO, M. Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic beta cells through GPR40. **Nature**. v. 422, p.173–176, 2003.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**. v. 413, p. 203-210, 2001.

JUNGER, H.; SORKIN, L. S. Nociceptive and inflammatory effects of subcutaneous TNF α . **Pain**. v. 85, p.145-151, 2000.

KATADA, R.; NISHITANI, Y.; HONMOU, O.; OKAZAKI, S.; HOUKIN, K.; MATSUMOTO, H. Prior Ethanol Injection Promotes Brain Edema after Traumatic Brain Injury. **Journal of Neurotrauma**. v. 26, p. 2015–2025, 2009.

KAWASAKI, Y.; ZHANG, L.; CHENG, JK.; JI, RR. Cytokine mechanisms of central sensitization: distinct and overlapping role of interleukin-1beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in regulating synaptic and neuronal activity in the superficial spinal cord. **The Journal of Neuroscience**. v.28, p. 5189–5194, 2008.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; ASTER, J. C. Inflamação Aguda e Crônica. In: **Robbins & Cotran - Bases Patológicas das Doenças**. 8^a ed, Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

KLAUMANN, P. R.; WOUK, A. F. P. F.; SILLAS, T. Pathophysiology of pain. **Archives of Veterinay Science**. v. 13, n. 1, p. 1-12, 2008.

KOHLI, P.; LEVY, B.D. Resolvins and protectins: mediating solutions to inflammation. **British Journal of Pharmacology**. v. 158, p. 960-971, 2009.

KOPF, A.; PATEL, N. B. **Guide to Pain Management in Low-Resource Settings**. International Association for the Study of Pain. 371 p., 2010.

KRISHNAMOORTHY, S.; RECCHIUTI, A.; CHIANG, N.; YACOUBIAN, S.; LEE, C-H.; YANG, R.; PETASIS, N. A.; SERHAN, C. N. Resolvin D1 binds human phagocytes with evidence for proresolving receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 107, n. 4, p. 1660–1665, 2010.

LANGFORD, D. J.; BAILEY, A. L.; CHANDA, M. L.; CLARKE, S. E.; DRUMMOND, T. E.; ECHOLS, S.; GLICK, S.; INGRAO, J.; KLASSEN-ROSS, T.; LACROIX-FRALISH, M. L.; MATSUMIYA, L.; SORGE, R. E.; SOTOCINAL, S. G.; TABAKA, J. M.; WONG, D.; VAN DEN MAAGDENBERG, A. M.; FERRARI, M. D.; CRAIG, K. D.; MOGIL, J. S. Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. **Nature Methods**. v. 7, n. 6, p. 447-449, 2010.

LEE, C. H. Resolvins as new fascinating drug candidates for inflammatory diseases. **Archives of Pharmacal Research**. v. 35, n. 1, p. 3–7, 2012.

LEE, H.; SURH, Y. Review: Therapeutic potential of resolvins in the prevention and treatment of inflammatory disorders. **Biochemical Pharmacology**, v. 84, p. 1340-1350, 2012.

LI, N.; HE, J.; SCHWARTZ, C. E.; GJORSTRUP, P.; BAZAN, H. E. P. Resolvin E1 Improves Tear Production and Decreases Inflammation in a Dry Eye Mouse Model. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**. v. 26, n. 5, p.431-439, 2010.

LIU, H.; ZHENG, W.; YAN, G.; LIU, B.; KONG, L.; DING, Y.; SHEN, Z.; TAN, H. ZHANG, G. Acute Ethanol-Induced Changes in Edema and Metabolite Concentrations in Rat Brain. **BioMed Research International**. p. 1-8, 2014.

LIU, M.; BOUSSETTA, T.; MAKNI-MAALEJ, K.; FAY, M.; DRISS, F.; EL-BENNA, J.; LAGARDE, M.; GUICHARDANT, M. Protectin DX, a double lipoxygenase product of DHA, inhibits both ROS production in human neutrophils and cyclooxygenase activities. **Lipids**. v. 49, p. 49-57, 2014.

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

MUKHERJEE, A.; HALE, V. G.; BORGA, O.; STEIN, R. Predictability of the clinical potency of NSAIDs from the preclinical pharmacodynamics in rats. **Inflammation Research**, v. 45, p. 531-540, 1996.

OH D. A.; LAGAKOS W. S. The role of G-protein-coupled receptors in mediating the effect of fatty acids on inflammation and insulin sensitivity. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**. v. 14, p. 322-327, 2011.

OH D. Y.; TALUKDAR S.; BAE E. J.; IMAMURA T.; MORINAGA H.; FAN W.; LI P.; LU W. J.; WATKINS S. M.; OLEFSKY J. M. GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. **Cell**. v. 142, n. 5, p. 687-698, 2010.

PENNING, T. D.; TALLEY, J. J.; BERTENSHAW, S. R.; CARTER, J. S.; COLLINS, P. W.; DOCTER, S.; GRANETO, M. J.; LEE, L. F.; MALECHA, J. W.; MIYASHIRO, J. M.; ROGERS, R. S.; ROGIER, D. J.; YU, S. S.; ANDERSON, G. D.; BURTON, E. G.; COGBURN, J. N.; GREGORY, S. A.; KOBOLDT, C. M.; PERKINS, W. E.; SEIBERT, K.; VEENHUIZEN, A. W.; ZHANG, Y. Y.; ISAKSON P. C. Synthesis and Biological Evaluation of the 1,5-Diarylpyrazole Class of Cyclooxygenase-2 Inhibitors: Identification of 4-[5-(4-Methylphenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl]benzenesulfonamide (SC-58635, Celecoxib). **Journal of Medicinal Chemistry**, Vol. 40, No. 9, p. 1347-1365, 1997.

POOLE, S.; CUNHA, F. Q.; SELKIRK, S.; LORENZETTI, B. B.; FERREIRA, S. H. Cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-10. **British Journal of Pharmacology**. v. 115, p. 684-688, 1995.

RANDALL, L. D.; SELITTO, J. J. A Method for Measurement of Analgesic Activity of Inflamed Tissue. **Archives of International Pharmacodynamics**, v. 113, p. 233-249, 1957.

RANGE, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J.; HEMDERSON, G. **Rang & Dale: Farmacologia**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

RATHER, L. J. Disturbance of function (*functio laesa*): the legendary fifth cardinal sign of inflammation, added by Galen to the four cardinal signs of Celsus. **Bulletin of the New York Academy of Medicine**. v. 47, n.3, p. 303-322, 1971.

RYAN, G. B.; MAJNO, G. Acute Inflammation. A Review. **American Journal of Pathology**, v. 86, n.1, p.183-276, 1977.

SAMAD, T. A.; MOORE, K. A.; SAPIRSTEIN, A.; BILLET, S.; ALLCHORNE, A.; POOLE, S.; BONVENTREK, J. V.; WOOLF, C. J. Interleukin-1beta-mediated induction of Cox-2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity. **Nature**. v. 410, p. 471–475, 2001.

SCHOLZ, J.; WOOLF, C.J. Can we conquer pain? **Nature Neuroscience Supplement**. v. 5, p. 1062-1067, 2002.

SEKI, H.; TANI, Y.; ARITA, M. Omega-3 PUFA derived anti-inflammatory lipid mediator resolvin E1. **Prostaglandins and Other Lipid Mediators**. v. 89, p.126-130, 2009.

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

SERHAN, C. N.; BRAIN, S. D.; BUCKLEY, C. D.; GILROY, D. W.; HASLETT, C.; O'NEILL, L. A.; PERRETTI, M.; ROSSI, A. G; WALLACE, J. L. Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. **The FASEB Journal**. v.21, n.2, p. 325-332, 2007.

SERHAN, C. N.; CHIANG, N. Review: Endogenous pro-resolving and anti-inflammatory lipid mediators: a new pharmacologic genus. **British Journal of Pharmacology**, v.153, p. S200-S215, 2008.

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

SERHAN C. N., CLISH C. B., BRANNON J., COLGAN S.P., CHIANG N., GRONERT K. Novel functional sets of lipid-derived mediators with antiinflammatory actions generated from omega-3 fatty acids via cyclooxygenase 2-nonsteroidal antiinflammatory drugs and transcellular processing. **The Journal of Experimental Medicine**. v. 192, n. 8, p. 1197-1204, 2000.

SERHAN, C. N.; DALLI, J.; COLAS, R. A.; WINKLER, J. W.; CHIANG, N. Review: Protectins and maresins: New pro-resolving families of mediators in acute inflammation and resolution bioactive metabolome. **Biochimica et Biophysica Acta** **1851**, p. 397–413, 2015.

SERHAN, C. N.; GOTLINGER, K.; HONG, S.; LU, Y.; SIEGELMAN, J.; BAER, T.; YANG, R.; COLGAN, S. P.; PETASIS, N. A. Anti-Inflammatory Actions of Neuroprotectin 1/Protectin D1 and Its Natural Stereoisomers: Assignments of Dihydroxy-Containing Docosatrienes. **The Journal of Immunology**, v. 176, p. 1848-1859, 2006.

SERHAN, C. N., HONG, S., GRONERT, K., COLGAN, S. P., DEVCHAND, P. R., MIRICK, G. MOUSSIGNAC, R. L. Resolvins: a family of bioactive products of omega-3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter proinflammation signals. **The Journal of Experimental Medicine**. v. 196, n. 8, p. 1025-1037, 2002.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, v. 18, n. 3, p. 385 - 405, 2004.

STRUBELT, O.; ZETLER, G. Anti-inflammatory Effect of Ethanol and other Alcohols on Rat Paw Edema and Pleurisy. *Agents and Actions*. v. 10, n. 3, p. 279-286, 1980.

SUN, Y-P.; OH, S. F.; UDDIN, J.; YANG, R.; GOTLINGER, K.; CAMPBELL, E.; COLGAN, S. P.; PETASIS N. A.; SERHAN, C. N. Resolvin D1 and Its Aspirin-triggered 17R Epimer: stereochemical assignments, anti-inflammatory properties, and enzymatic inactivation. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 282, n. 13, p. 9323-9334, 2007.

TAGER, A. M.; DUFOUR, J. H; GOODARZI, K.; BERCURY, S. D.; VON ANDRIAN, U. H.; LUSTER, A. D. BLTR mediates leukotriene B4-induced chemotaxis and adhesion and plays a dominant role in eosinophil accumulation in a murine model of peritonitis. **The Journal of Experimental Medicine**. v. 192, n. 3, p. 439-446, 2000.

TATSUO, M. A. K. F.; YOKORO, C. M.; SALGADO, J. V.; PESQUERO, S. M. S.; SANTANA M. A. P.; FRANCISCHI, J. N. Hyperalgesic effect induced by barbiturates, midazolam and ethanol: pharmacological evidence for GABA-A receptor involvement. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 30, p. 251-256, 1997.

TAZOE H, OTOMO Y, KAJI I, ET AL. Roles of short-chain fatty acids receptors, GPR41 and GPR43 on colonic functions. **J. Physiological Pharmacology**. v. 59 (Suppl 2), p. 251-262, 2008.

TITOS, E.; RIUS, B.; GONZÁLEZ-PÉRIZ, A.; LÓPEZ-VICARIO, C.; MORÁN-SALVADOR, E.; MARTÍNEZ-CLEMENTE, M.; ARROYO, V.; CLÀRIA, J. Resolvin D1 and its precursor docosahexaenoic acid promote resolution of adipose tissue inflammation by eliciting macrophage polarization toward an M2-like phenotype. **The Journal of Immunology**. v. 187, n. 10, p. 5408-5418, 2011.

UGO BASILE – **Instruction manual: Analgesy-meter**. Disponível em: <http://www.ugobasile.com/media/catalogue/products/manuals/37215_R2.pdf>. Acesso em: 17 de março, 2016.

UGO BASILE – **Instruction manual: Plethysmometer**. Disponível em: <http://www.ugobasile.com/media/catalogue/products/manuals/37140_R2.pdf>. Acesso em: 17 de março, 2016.

VINEGAR, R.; TRUAX, J. F.; SELPH, J. L.; JOHNSTON, P. R.; VENABLE, A. L.; MCKENZIE K. K. Pathway to carrageenan-induced inflammation in the hind limb of the rat. **Federation Proceedings**, v. 46, n.1, p. 118-126, 1987.

XU, Z-Z.; ZHANG, L.; LIU, T.; PARK, J. Y.; BERTA, T.; YANG, R.; SERHAN, C. N.; JI, R-R. Resolvins RvE1 and RvD1 attenuate inflammatory pain via central and peripheral actions. **Nature Medicine**, v.16, n.5, p. 592-597, 2010.


WANG J, WU X, SIMONAVICIUS N, TIAN H, LING L. Medium chain fatty acids as ligands for orphan G protein-coupled receptor GPR84. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 281, p. 34457–34464, 2006.

WINTER, C. A.; RISLEY, E. A.; NUSS, G. W. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**. v. 111, p. 544-547, 1962.

WOOLF, C. J. Pain: Moving from Symptom Control toward Mechanism-Specific Pharmacologic Management. **Annals of Internal Medicine**. v. 140, n. 6, p. 441-451, 2004.

WOOLF, C. J. What is this thing called pain? **The Journal of Clinical Investigation**. v. 120, n. 11, p. 3742–3744, 2010.

ANEXOS**ANEXO I**

| | |
|--|--|
|  | UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS CEUA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS |
| CERTIFICADO Certificamos que o Protocolo nº. 199 / 2014, relativo ao projeto intitulado "FUTURO DO TRATAMENTO FARMACOLÓGICO DA INFLAMAÇÃO E DA DOR", que tem como responsável Janetti Nogueira de Francischi, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 19/11/2014. Este certificado espira-se em 19/11/2019. | |
| CERTIFICATE We hereby certify that the Protocol nº. 199 / 2014, related to the Project entitled "FUTURE OF THE PHARMACOLOGICAL TREATMENT OF INFLAMMATION AND PAIN", under the supervision of Janetti Nogueira de Francischi, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 19/11/2014. This certificate expires in 19/11/2019. | |
| Cleuza Maria de Faria Rezende Coordenador(a) da CEUA/UFMG Belo Horizonte, 19/11/2014. | |
| Atenciosamente. | |
| Sistema CEUA-UFMG https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/ | |
| Universidade Federal de Minas Gerais Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005 31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592 www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br | |

**UFMG**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº. 376 / 2014, relativo ao projeto intitulado "ESTUDO FARMACOLÓGICO DA ATIVIDADE ANALGÉSICA E ANTIINFLAMATÓRIA DOS LÍPIDES RESOLVINA E1 E PROTECTINA D1", que tem como responsável Janetti Nogueira de Francischi, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 18/08/2015. Este certificado espira-se em 18/08/2020.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 376 / 2014, related to the Project entitled "Pharmacological study of the analgesic and antiinflammatory activity of the antiinflammatory lipids Resolvin E1 and Protectin D1", under the supervision of Janetti Nogueira de Francischi, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 18/08/2015. This certificates expires in 18/08/2020.

Cleuza Maria de Faria Rezende
Coordenador(a) da CEUA/UFMG
Belo Horizonte, 18/08/2015.

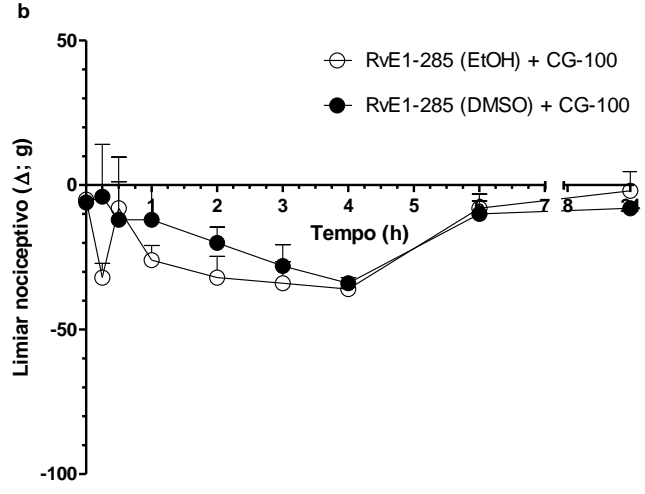
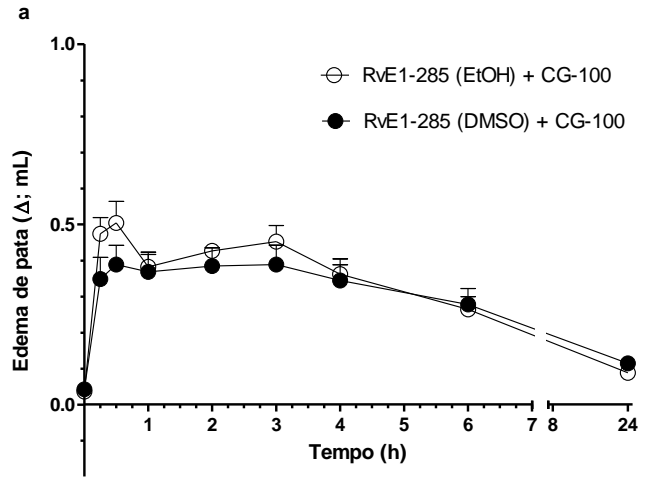
Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

ANEXO II



ANEXO III

