



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

NATHALIA SANTOS CARVALHO

**CONTRIBUIÇÃO DA EXPRESSÃO DE COX-2 DE NEUTRÓFILOS
NO MODELO DE HIPERALGESIA INFLAMATÓRIA EM
CAMUNDONGOS.**

**CONTRIBUTION OF NEUTROPHIL COX-2 EXPRESSION IN THE
INFLAMMATORY HYPERALGESIA MODEL IN MICE.**

CAMPINAS

2022

NATHALIA SANTOS CARVALHO

**CONTRIBUIÇÃO DA EXPRESSÃO DE COX-2 DE NEUTRÓFILOS
NO MODELO DE HIPERALGESIA INFLAMATÓRIA EM
CAMUNDONGOS.**

**CONTRIBUTION OF NEUTROPHIL COX-2 EXPRESSION IN THE
INFLAMMATORY HYPERALGESIA MODEL IN MICE.**

*Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas como parte dos requisitos
exigidos para a obtenção do Título de
Doutora em Biologia Funcional e
Molecular – área de Fisiologia.*

*Thesis presented to the Institute of
Biology of the University of Campinas
in partial fulfillment of the
requirements for the degree of Doctor
in Functional and Molecular Biology –
area of Physiology.*

Orientador: PROF. DR. CARLOS AMILCAR PARADA

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA TESE
DEFENDIDA PELO ALUNA
NATHALIA SANTOS CARVALHO E
ORIENTADA PELO PROF. DR.
CARLOS AMILCAR PARADA.

CAMPINAS

2022

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

C253c Carvalho, Nathalia Santos, 1991-
Contribuição da expressão de COX-2 de neutrófilos no modelo de hiperalgesia inflamatória em camundongos / Nathalia Santos Carvalho. – Campinas, SP : [s.n.], 2022.

Orientador: Carlos Amilcar Parada.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Dor. 2. Inflamação. 3. Ciclooxigenase 2. 4. Carragenina. 5. Citocinas. I. Parada, Carlos Amilcar, 1960-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Contribution of neutrophil COX-2 expression in the model of inflammatory hyperalgesia in mice

Palavras-chave em inglês:

Pain

Inflammation

Cyclooxygenase 2

Carrageenan

Cytokines

Área de concentração: Fisiologia

Titulação: Doutora em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Carlos Amilcar Parada [Orientador]

Cássia Regina da Silva

Daniela Carlos Sartori

Eric Schmidt Rondon

Gilson Gonçalves dos Santos

Data de defesa: 25-03-2022

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-4975-7197>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/7477112848339215>

COMISSÃO EXAMINADORA

Membros titulares

Prof. Dr. Carlos Amilcar Parada

Prof.(a) Dra. Cássia Regina da Silva

Prof.(a) Dra. Daniela Carlos Sartori

Prof. Dr. Eric Schmidt Rondon

Prof. Dr. Gilson Gonçalves dos Santos

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do estudante.

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Biologia Funcional e Molecular do Instituto de Biologia.

*E como boa nordestina que
adora uma aventura, não liguei
pra vida dura e resolvi
acreditar. No talento no esforço
e competência, que tu não
compra, é de nascença, não tem
como disfarçar (...)
(...) Avoada com a cabeça lá na
lua Deus dizendo; não recua,
tua hora vai chegar (...)*

Bruno Gomes



Artista: Augusto Zambonato - Ilustração para Revista Pesquisa Fapesp. Edição 275. Janeiro/2019.

Agradecimentos

Início meus agradecimentos apontando minha fé. Ao meu Deus e a minha santa, Nossa Senhora Aparecida, que por minha crença e pelas orações de minha mãe, me auxiliaram e me trouxeram alento em todos os momentos necessários. Minha fé foi base, sua palavra foi sustento, tatuada em mim para que nunca esquecesse a ordem que nos foi dada:

“Não fui eu que ordenei a você? Seja forte e corajoso! Não se apavore nem desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar”.

Josué 1:9

À minha família. Minha mãe Aparecida e meu Pai Raimundo, que mesmo no pouco me deram o muito. Que mesmo sem a oportunidade do estudo, souberam compreender a importância de proporcionar a mim e ao meu irmão uma boa educação. Meu irmão Matheus, que sempre me deu amor e apoio incondicional. Ao Kiko, meu parceiro de vida em literalmente todos os âmbitos, não há palavras para agradecer o que você fez por mim e o quanto você faz parte dessa conquista.

Ao meu orientador, Carlos Parada, obrigada pela confiança e pelo aceite de seguir nesse trabalho comigo. Obrigada, pela oportunidade de ter aprendido com você e por ter aceitado dedicar-se a orientar esse trabalho.

Ao professor, Marcos Vinolo, que por inúmeras vezes foi solícito em me receber e auxiliar com minhas dúvidas, acerca de protocolos e neutrófilos. Aos seus alunos Laís e Zé, que assim como o orientador, foram sempre pacientes e solícitos em ensinar e auxiliar nos protocolos.

Aos meus amigos de laboratório. Kauê, Anna Lethicia, Ana Carolina, Cat, Fabi, Tássia que trouxeram alívio aos dias difíceis e compartilharam sorrisos nos momentos felizes! Em especial, obrigada a Júlia, minha amiga, parceira de experimentos e tantas histórias alegres e “perrengues” que depois de um tempo também viraram boas histórias.

Aos membros da banca, Cássia, Daniela, Eric, Gilson, César, Celina e Elayne. Muito obrigada, pela disponibilidade de tempo e conhecimento a fim de contribuir com esse trabalho.

À todos os membros e funcionários da Unicamp, que de forma direta ou indireta contribuíram para minha formação.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP – Processo 2017/ 07162-7 e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Resumo

A inflamação é um processo vital para a restauração do tecido lesado apresentado com uma importante característica a dor inflamatória. Nesse contexto, a via da ciclooxigenase (COX) está fortemente relacionada ao processo inflamatório e doloroso. Normalmente, a isoforma da COX-1 é descrita como homeostática, enquanto a COX-2 é caracterizada como induzível na condição inflamatória. Embora seja bem estabelecido que as células neutrofílicas estejam fortemente envolvidas no processo inflamatório, sendo as primeiras a chegar ao local inflamado, ainda não há evidências sobre o papel específico da COX-2 derivada de neutrófilos neste processo. Assim, no presente estudo, demonstramos pela primeira vez que a COX-2 derivada de neutrófilos desempenha um papel fundamental na hiperalgesia inflamatória periférica. Em nosso estudo, camundongos knockout condicional para Cox-2 em neutrófilos (Cox-2^{-/-}) exibiram maior sensibilidade à dor após injeção de carragenina (CG) e hiperalgesia induzida por IL-1 β de longa duração em comparação com o grupo controle (Cox-2^{+/+}). Além disso, a inflamação induzida por CG em camundongos Cox-2^{-/-} levou a superexpressão de COX-1, além do aumento da migração de neutrófilos e citocinas pró-inflamatórias (por exemplo, IL-1 β e CXCL-1). Em contraste, após estimulação *in vitro* com LPS, os neutrófilos Cox-2^{-/-} apresentaram níveis mais baixos de IL-1 β e CXCL-1 em comparação ao grupo controle. Nossos achados revelam que a COX-2 derivada de neutrófilos têm um papel importante na regulação do processo inflamatório e da hiperalgesia inflamatória.

Palavras-chave: Dor – inflamação – ciclooxigenase – Carragenina – Citocinas.

Abstract

Inflammation is a vital process for the injured tissue restoration and one of its hallmarks is inflammatory hyperalgesia. The cyclooxygenase (COX) pathway is strongly related to the inflammatory and pain process. Usually, COX-1 isoform is described as homeostatic, while COX-2 is characterized as inducible in inflammatory condition. Although it is well known that neutrophil cells are one of the main cells involved in inflammatory process, and the first to arrive at the inflamed site, there are still no evidence regarding the specific role of neutrophil-derived Cox-2 in this process. Thus, in the present study we demonstrate for the first time that neutrophil-derived COX-2 plays a key role in peripheral inflammatory hyperalgesia. Conditional knockout mice for Cox-2 in neutrophil (Cox-2^{-/-}) exhibited higher pain sensitivity after carrageenan (CG) injection and long-lasting IL-1 β -induced hyperalgesia compared with control group (COX-2^{+/+}). Also, CG-induced inflammation in Cox-2^{-/-} mice showed Cox-1 overexpression, and increased neutrophil migration and pro inflammatory cytokines (e.g., IL-1 β and CXCL1). In contrast, after *in vitro* LPS stimulation, Cox-2^{-/-} neutrophil showed lower levels of IL-1 β and CXCL-1 compared to the control group. These findings revealed that neutrophils COX-2 has an important role in regulation the inflammatory process and the inflammatory hyperalgesia.

Keywords: Pain – inflammation – cyclooxygenase – Carrageenan – cytokines.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Migração leucocitária para o sítio inflamado	15
Figura 2. Principais mecanismos de ação dos neutrófilos frente a patógenos na região do sítio inflamatório.	17
Figura 3. Anatomia dos nociceptores.	24
Figura 4. Cascata inflamatória induzida pela carragenina/LPS.	29
Figura 5. Via das ciclooxygenases na formação de prostanóides.....	31
Figura 6. Marcação para identificação dos animais.	37
Figura 7. As três fases resultantes da centrifugação do tecido. com o trizol.	44
Figura 8. Intensidade da hiperalgesia após injeção de CG na pata	48
Figura 9. Intensidade da hiperalgesia após GC+FC e GC+VS..	50
Figura 10. Resposta inflamatória induzida por CG.....	53
Figura 11. Quantificação da migração celular após injeção de CG.....	55
Figura 12. Neutrófilos estimulados por LPS in vitro.	58
Figura 13. Representação gráfica dos principais resultados obtidos na tese.	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

COX – Ciclooxygenase

CG – Carragenina

FC – Fucoidan

IL – Interleucina

i.p – Intraperitoneal

KO – knockout

LPS – Lipopolissacarídeo

MPO – Mieloperoxidase

NSAIDs – Drogas Anti-inflamatórias não esteroidais

PGs – Prostaglandinas

SAL - Salina

TNF – Fator de necrose tumoral

VS – Valeril Salicilato

Sumário

1. INTRODUÇÃO	13
2.1. Inflamação.....	13
2.1.1. Mecanismos da inflamação.....	13
2.1.2. Neutrófilos: As primeiras células a migrarem para o local da inflamação.....	15
2.2. Dor.....	20
2.2.1. Fibras nociceptivas	21
2.2.2. Dor de origem inflamatória.....	25
2.2.3. Modelos de hiperalgesia inflamatória.....	26
2.2.4. Carragenina: Modelo padrão ouro da hiperalgesia inflamatória.....	27
2.3. Eicosanóides: Síntese e metabolismo.	29
2.3.1. Prostaglandinas na hiperalgesia inflamatória.	32
3. OBJETIVO GERAL:	35
3.1. Objetivos específicos.....	35
4. METODOLOGIA	36
4.1. Materiais	36
4.2. Animais.....	36
4.2.1. Identificação do animal transgênico pela técnica de PCR.....	37
4.2.1.1. Extração do DNA genômico (gDNA)	37
4.2.1.2. PCR Convencional.....	38
4.3. Desenho experimental	38
4.3.1. Teste de hiperalgesia mecânica – <i>Von Frey</i> eletrônico	38
4.3.2. Indução da hiperalgesia por agentes inflamatórios.....	39
4.3.3. Modulação da via e da hiperalgesia inflamatória por agentes farmacológicos..	40
4.4. Ensaio molecular	40
4.4.1. Isolamento de neutrófilos da medula óssea.	40
4.4.1.1. Separação por gradiente de densidade - Percoll	41
4.4.2. Estimulação dos neutrófilos com LPS.....	41
4.4.3. Mensuração da atividade de mieloperoxidase.....	42
4.4.4. Mensuração de citocinas.....	42
4.4.5. Análise da expressão gênica dos genes COX por PCR-rt	43
4.4.5.1. Extração de RNA a partir do tecido da pata.	43
4.4.5.2. Síntese do cDNA	44

4.4.5.3. PCR-RT	45
4.5. Análise estatística.....	46
5. RESULTADOS	47
5.1. Camundongos Cox-2 ^{-/-} mostram hiperalgesia induzida por CG mais intensa e hiperalgesia induzida por IL-1 β por tempo mais prolongado.	47
5.2. A hiperalgesia induzida por CG em camundongos Cox-2 ^{-/-} depende da COX-1 e da migração de neutrófilos.	49
5.3. Camundongos Cox-2 ^{-/-} apresentam superexpressão de cox-1 e citocinas pró-inflamatórias e expressão não detectada de cox-2 no tecido após injeção de CG.....	51
5.4. Camundongos Cox-2 ^{-/-} apresentam aumento na migração neutrofílica e após inflamação induzida por CG quando comparados aos Camundongos Cox-2 ^{+/+}	54
5.5. Neutrófilos Cox-2 ^{-/-} mostram superexpressão de cox-1, redução nos níveis de citocinas pró-inflamatórias e expressão não detectada de cox-2 após estímulo com LPS in vitro.....	56
6. DISCUSSÃO	59
7. CONCLUSÃO	65
8. REFERÊNCIAS.....	66
APÊNDICE.....	79
APÊNDICE A.....	80
APÊNDICE B.....	81

1. INTRODUÇÃO

2.1. Inflamação

A inflamação pode ser definida como uma resposta inespecífica a estímulos nocivos, patógenos invasores, ou sinais endógenos relacionados a uma injúria, sendo caracterizada como um processo fisiológico vital (ASHLEY; WEIL; NELSON, 2012). De forma geral, a inflamação aguda apresenta uma série de eventos celulares e moleculares que visam a eliminação do estímulo danoso e a reparação tecidual de forma rápida e controlada. No entanto, em consequência de uma desregulação desse processo, o mesmo pode apresentar ação prolongada e exacerbada, podendo resultar em dano, inflamação persistente e retardo do reparo tecidual (WEISS, 2008). Essa desregulação, inclusive, pode estar relacionada com condições patológicas crônicas como, por exemplo, a dor crônica (WEISS, 2008).

2.1.1. Mecanismos da inflamação

O mecanismo relacionado à cascata inflamatória consiste da participação integrada e fortemente regulada de eventos celulares e microvasculares, os quais atuam articulados pela sinalização de moléculas denominadas citocinas (ASHLEY; WEIL; NELSON, 2012). Na imunidade inata, esse processo é iniciado por células imunes residentes presentes no tecido, tais como macrófagos, fibroblastos, mastócitos, eosinófilos e células dendríticas que, de forma inespecífica, reconhecem um estímulo nocivo através de receptores de reconhecimento de padrões intracelulares (ou expressos na superfície celular) denominados PRR's (NEWTON; DIXIT, 2012). Esses receptores identificam de forma direta ou indireta padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs)

ou a danos (DAMPs) e, uma vez ativados, iniciam a sinalização que promove a liberação de fatores recrutadores de leucócitos para o sítio inflamatório, processo denominado como quimioatração (CRUVINEL et al., 2010; NEWTON; DIXIT, 2012).

Após a chegada dos leucócitos, há interação dessas células com as células do endotélio através de proteínas (selectinas) expressas em suas membranas (HARJUNPÄÄ et al., 2019). Nessa fase, os leucócitos reduzem a velocidade e passam a margear e rolar na parede do vaso. A etapa seguinte está então relacionada com uma maior aderência dos leucócitos às células endoteliais do vaso através da interação com proteínas denominadas integrinas (HARJUNPÄÄ et al., 2019; NOURSHARGH; ALON, 2014). Após esse processo, ocorre a diapedese, definida como a transmigração das células leucocitárias para o tecido, e que ocorre através da interação de outras moléculas de adesão (PECAM) que facilitam a passagem das células através do endotélio (NOURSHARGH; ALON, 2014). Por fim, através de quimiotaxia e em consequência ao gradiente de concentração das quimiocinas, o leucócito chega ao foco da inflamação no tecido (fig.1) (IMHOF; DUNON, 1997).

Após a instauração do quadro inflamatório agudo, o mesmo pode ser caracterizado por 5 principais sinais: Rubor (vermelhidão), calor, tumor (inchaço), dor e perda de função. Os dois primeiros são consequência do aumento do fluxo sanguíneo para a região inflamada, o terceiro está relacionado ao acúmulo de fluidos, e a dor está relacionada com mediadores liberados nos terminais nervosos, levando a sensibilização dos nociceptores (PARAKRAMA T CHANDRASOMA; CLIVE R TAYLOR, 1998).

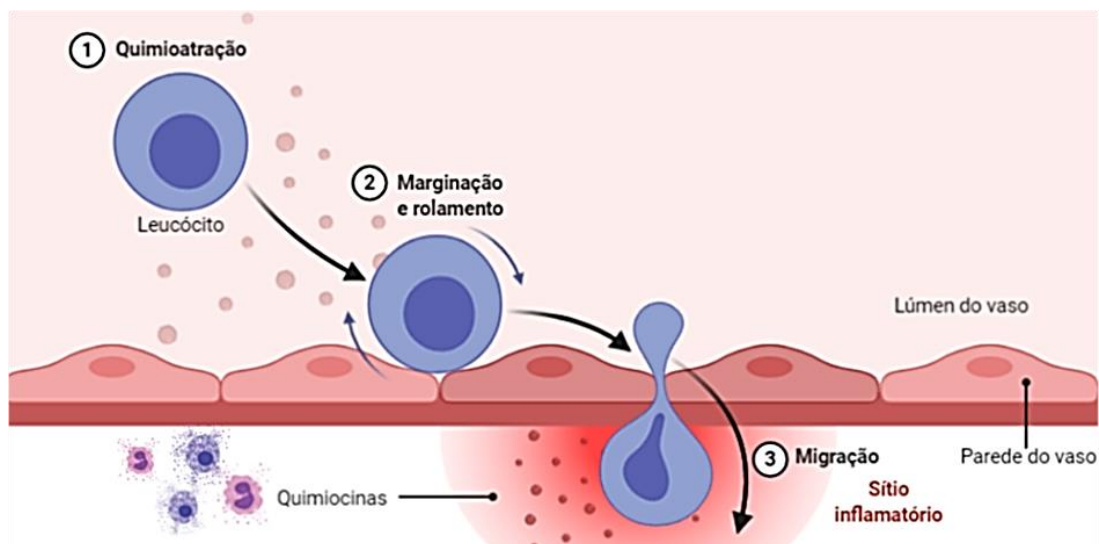


Figura 1. Migração leucocitária para o sítio inflamado. Citocinas e quimionas são liberadas no local, atraindo leucócitos. Nesse processo, as células endoteliais do vaso passam a expressar proteínas de adesão, que facilitam a aderência ao vaso das células imunes circulantes que, por fim, transmigram pelos espaços do endotélio chegando ao tecido inflamado. Criado com BioRender.com.

É válido ressaltar que nem sempre a inflamação será acompanhada de todos os sinais supracitados, podendo, em alguns casos, manifestar-se de forma "silenciosa". No entanto, a indicação ao indivíduo do possível comprometimento ou prejuízo tecidual está associada ao senso de preservação da área afetada e ao cuidado quanto a manifestação exacerbada desse processo inflamatório que, caso não seja controlado, pode relacionar-se com o surgimento de diversas patologias de natureza crônica em diferentes graus de severidade (INSTITUTE FOR QUALITY AND EFFICIENCY IN HEALTH CARE, 2006).

2.1.2. Neutrófilos: As primeiras células a migrarem para o local da inflamação.

Os neutrófilos, também conhecidos como leucócitos polimorfomonucleares (PMN), são descritos como uma das principais células envolvidas no processo inflamatório, sendo as primeiras a chegarem ao local inflamado para agir na eliminação de patógenos (MANTOVANI et al., 2011).

Nesse contexto, as células neutrofílicas contribuem para a fisiopatologia de doenças inflamatórias de diversas maneiras, incluindo seu arsenal extremamente tóxico de moléculas lesivas aos patógenos, síntese e liberação de uma ampla variedade de citocinas, quimiocinas e outras moléculas, sendo capazes, portanto, de orquestrar o início e o progresso do processo inflamatório (TECCHIO; MICHELETTI; CASSATELLA, 2014; WRIGHT; MOOTS; EDWARDS, 2014).

De forma geral, o mecanismo de eliminação de patógenos pelos neutrófilos no sítio da inflamação pode se dar a nível intracelular ou extracelular. No primeiro, os patógenos são fagocitados, encapsulados (fagossomas) e eliminados por dois mecanismos principais: a) Através da NADPH oxigenase, relacionado com a ação de espécies reativas do oxigênio (NGUYEN; GREEN; MECSAS, 2017) ou; b) Através de proteínas como catepsinas, defensinas, lactoferrinas e lisozimas, sendo importante mencionar que esses agentes bactericidas podem atuar tanto no interior das células, agindo diretamente nos fagossomas (fig.2-a) (SOEHNLEIN, 2009), como no ambiente extracelular, através de um processo denominado como degranulocitose no qual são liberados. Além dos agentes bactericidas, também há a liberação de enzimas, proteases, mieloperoxidase (MPO), collagenase entre outros (fig. 2-b) (CRISTOVAM et al., 2010).

Adicionalmente, como supracitado, os neutrófilos também podem atuar a nível extracelular através das chamadas armadilhas extracelulares de neutrófilos (NET's). Nesse processo, a célula expelle seu conteúdo nuclear composto de proteínas granulares e citoplasmáticas como, por exemplo, histonas, lactoferrinas, catepsinas e enzimas como a MPO e elastase. Nesse mecanismo

ocorre degranulação e netose (termo utilizado para designar a morte do neutrófilo resultante da formação de NET's), resultando na captura e inativação dos patógenos presentes no local da inflamação (fig.2 - c) (RADA, 2019).

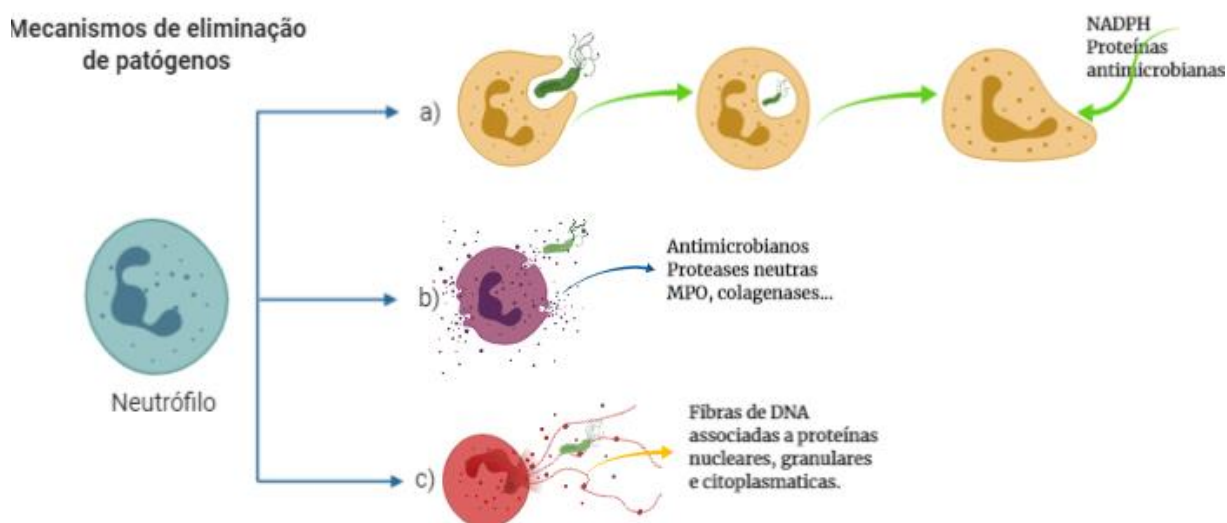


Figura 2. Principais mecanismos de ação dos neutrófilos frente a patógenos na região do sítio inflamatório. a) Formação de fagossomo através da fagocitose do patógeno e eliminação do mesmo no interior das células através da ação de enzimas e proteínas antimicrobianas. b) Desgranulação e liberação de vários componentes anti-patógenos no meio extracelular. c) Formação de NET's, captura e eliminação do patógeno advindas da netose. Criado com BioRender.com.

Além dos mecanismos acima mencionados, as células neutrofílicas também apresentam a importante função de regular os processos inflamatórios através da síntese de citocinas e prostaglandinas, pelas quais também podem ser influenciadas (TECCHIO; MICHELETTI; CASSATELLA, 2014; WRIGHT et al., 2010). A partir desse processo os neutrófilos produzem e orquestram um ambiente propício diante de um estímulo inflamatório (TECCHIO; MICHELETTI; CASSATELLA, 2014; WRIGHT et al., 2010).

Um dos mecanismos regulatórios da distribuição de neutrófilos, partindo da região da medula óssea até a periferia, se dá através da ação de células dendríticas. Estas células, atuam nesse mecanismo, controlando a síntese e

liberação de fatores do crescimento do tipo, fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF) e quimioatraentes de neutrófilos induzidos por citocinas (CXCL), como o CXCL-1 (descrita em camundongos como KC), CXCL-2 e CXCL10 (NAUSEEF; BORREGAARD, 2014).

Nesse contexto, também é importante ressaltar que os mediadores inflamatórios carragenina (CG) e lipopolissacarídeo (LPS), através da ativação de cascatas que induzem a liberação de citocinas como a IL-1 β e o TNF- α , também possuem a capacidade de estimular a produção de CXCL-1, induzindo a migração neutrofílica para a região da inflamação (WATANABE; KINOSHITA; NAKAGAWA, 1989). Quimiocinas como a CXCL, além de atuarem no recrutamento dos neutrófilos, também podem ser produzidas pelos mesmos, possuindo relevância no recrutamento de outros leucócitos e em mecanismos de *feedback* negativo, com consequente ação regulatória nos processos imunes (SCAPINI et al., 2000).

As citocinas, de um modo geral, constituem uma rede de componentes essenciais para a comunicação e interação de células, sendo fundamentais para a indução, manutenção e regulação dos processos relacionados à imunidade inata e adaptativa (KOTB; CALANDRA; ROMANI, 2003). Nesse contexto, os neutrófilos têm sido descritos como importante fonte de citocinas pró-inflamatórias e imunoreguladoras (TECCHIO; MICHELETTI; CASSATELLA, 2014). A IL-1 β , é uma importante citocina pró-inflamatória, já descrita como fator importante no processo de ativação e sobrevivência de células neutrofílicas, sendo liberada em modelos *in vivo* através da estimulação local com CG (CUNHA et al., 2000) e *in vitro* pela estimulação com LPS (HU et al., 2017). Além disso, desempenha papel fundamental na regulação do recrutamento de

neutrófilos, através da indução de moléculas de adesão na superfície endotelial e estimulação da produção de CXCL-1 (HIMI; YOSHIOKA; KATAURA, 1997). A IL-1 β ainda possui papel importante em modelos de hiperalgesia inflamatória que, classicamente, estimulam a infiltração neutrofílica (CUNHA et al., 2000; REN; TORRES, 2009).

Outra citocina de relevância para a ação dos neutrófilos no sítio inflamatório é o TNF- α , membro da super família dos TNF (CASSATEUA, 1999; VIEIRA et al., 2009). De fato, tem sido demonstrado o aumento de quimiocinas atraentes de neutrófilos induzidas por TNF- α no tecido inflamado (TESSIER et al., 1997). Além disso, ensaios *in vitro* indicam o aumento da expressão de integrinas do tipo CD11b/CD18 em neutrófilos provenientes da ação do TNF- α , levando ao aumento da capacidade de adesão dessas células ao endotélio e auxiliando o processo de transmigração (MONTECUCCO et al., 2008).

Neutrófilos, por fim, também são uma importante fonte de derivados da via das ciclooxygenases (COX), destacando-se nesse processo o leucotrieno (LT) B₄, derivado da ação das lipooxygenases, e a prostaglandina (PG) E₂, induzida pela COX (WRIGHT et al., 2010). Nesse contexto, o LTB₄ atua como quimioatraente, auxiliando também nos processos de transmigração leucocitária (GUERRERO et al., 2008). Já a PGE₂, tem seu papel na condução da inflamação e da dor bem estabelecido (NAKANISHI; ROSENBERG, 2013), tendo também sido descrita como agente anti-inflamatório, apresentando importante papel na resolução da ação inflamatória dos neutrófilos através da inibição da ação do LTB₄ (LEVY et al., 2001; LOYNES et al., 2017).

2.2. Dor

A dor, segundo a Associação Internacional de Estudos da Dor (IASP, 2020) é atualmente descrita como “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada, ou semelhante àquela associada, a uma lesão tecidual real ou potencial”. No entanto, é válido ressaltar que a complexidade, e indiscutível importância fisiológica e psicológica da dor, a coloca como objeto de discussão entre diversos grupos de estudos no mundo. Ainda, segundo a IASP (2020), a dor sempre se manifesta como uma experiência subjetiva, sendo, portanto, influenciada em diferentes graus, por fatores biológicos, psicológicos e sociais. Dessa forma, ao longo da vida, através das experiências e aprendizados, cada indivíduo assimila o seu próprio conceito de dor.

Aprofundando no conceito, sabe-se que a dor pode ser classificada com base nos mecanismos envolvidos em sua origem, tais como sua patofisiologia, duração, localização anatômica, dentre outros aspectos (ABD-ELSAYED; DEER, 2019). Sabe-se também que a sensação da dor tem como objetivo alertar o mecanismo de defesa do indivíduo frente a um potencial estímulo lesivo, desencadeando respostas protetoras apropriadas, a fim de evitar maiores danos ao tecido (JULIUS; BASBAUM, 2001).

A dor aguda pode ser definida como uma resposta fisiológica a um estímulo nocivo, que pode vir a se tornar patológica. Possui tempo de duração limitado, motivando comportamentos de preservação da área afetada e sendo reduzida à medida que o tecido inicia sua cicatrização (SALLUM; GARCIA; MARIANA SANCHES, 2010). No entanto, o quadro de dor pode vir a se tornar crônico, frente a não resolução, ou resolução incorreta, do quadro inflamatório (TREEDE et al., 2015). A dor crônica, por sua vez, pode ser definida como a que persiste

além do tempo considerado normal de cura, durando pelo menos de 3 - 6 meses após o estímulo de origem, perdendo assim o papel de alerta que é atribuído à dor fisiológica (TREEDE et al., 2015).

Dados divulgados pela Sociedade Brasileira do Estudo da Dor (SBED, 2019) apontam que, no mundo, cerca de 20 a 40% da população apresenta queixa de dor crônica em alguma fase da vida. Já no Brasil, um estudo epidemiológico também realizado pela SBED (2015) revelou que 42% dos brasileiros relataram algum tipo de dor, onde cerca de 37% dos indivíduos comunicaram quadro de dor crônica há pelo menos 6 meses. No mais, dentre os principais fatores relacionados à cronificação da dor, pode-se destacar a sub-avaliação e sub-tratamento, a inadequada formação dos profissionais de saúde frente as abordagens terapêuticas para o tratamento da dor, além das crenças e a automedicação realizada pelos próprios pacientes (SALLUM; GARCIA; MARIANA SANCHES, 2010).

Tendo em vista a importância e a prevalência da dor, é evidente a necessidade de estudos que busquem a compreensão acerca dos fatores que possam modular a dor aguda e, conseqüentemente, evitar o processo de cronificação. Além disso, há grande relevância em aprimorar o conhecimento acerca das vias farmacológicas aplicadas para o controle e tratamento da dor (BONICA, 1987).

2.2.1. Fibras nociceptivas

Dor e nocicepção são dois termos distintos, assim, enquanto a dor de uma forma geral se refere a uma experiência subjetiva a um dano real ou eminente, a nocicepção se refere à ativação da via nociceptiva e, conseqüentemente, a habilidade do organismo em detectar estímulos potencialmente nocivos

(LOHMAN et al., 2015; MISCHKOWSKI et al., 2018). Sabe-se então, que a percepção dos estímulos potencialmente danosos que incidem nos tecidos se inicia com a ativação dos nociceptores – neurônios sensoriais primários (PRESCOTT; RATTÉ, 2017). Os nociceptores se diferenciam dos demais neurônios sensoriais, por apresentarem um limiar mais alto de ativação, sendo ativados por fatores relacionados ao calor nocivo, pressão intensa ou elementos químicos irritantes, enquanto os demais receptores respondem a estímulos inócuos, menos intensos (BURGESS, 1967; JULIUS; BASBAUM, 2001). Esses neurônios nociceptivos são capazes de traduzir os estímulos nocivos em impulsos elétricos (ROCHA et al., 2007).

Após a percepção e tradução do estímulo pelos nociceptores, a informação nociceptiva ascende ao SNC, sendo conduzida em forma de potenciais de ação unilaterais através das fibras nervosas (fig. 3). Essas, por sua vez, são formadas por neurônios do gânglio da raiz dorsal (DRG), um neurônio pseudo-unipolar, cujo corpo celular se encontra no próprio DRG, responsáveis pelos estímulos advindos do corpo (exceto a cabeça) (fig. 3b), ou no gânglio trigeminal, responsáveis pelos estímulos advindos da cabeça (fig. 3a) (PATAPOUTIAN 2010). Assim sendo, os dendritos do nociceptor (localizados no tecido periférico) recebem o estímulo e, a partir da zona de disparo (início do axônio), parte o potencial de ação até o corno posterior da medula espinhal (ou para o subnúcleo caudal do trigêmeo) (BASBAUM ET AL., 2009; DUBIN; PATAPOUTIAN 2010).

Adicionalmente, as fibras nervosas da via nociceptiva podem ser classificadas como fibras não mielinizadas e mielinizadas (LYNN, 1994). As fibras mielinizadas (fig. 3c) possuem maior velocidade de propagação da informação devido a presença dos chamados nós de Ranvier. Essas fibras são

classificadas como fibras A-delta polimodais e respondem tanto ao estímulo mecânico quanto ao térmico (DJOUHRI; LAWSON, 2004; DUBIN; PATAPOUTIAN, 2010). As fibras não mielinizadas são classificadas como fibras C (fig. 1b) e, por não apresentarem mielina, possuem menor diâmetro e velocidade de condução mais lenta quando comparada às fibras A-delta. Também são consideradas polimodais, respondendo a estímulos térmicos, mecânicos e químicos (DUBIN; PATAPOUTIAN, 2010).

Adicionalmente, ainda há a classificação dos nociceptores "silenciosos", fibras nociceptivas que não são ativadas por estímulos fisiológicos e nem por estímulos potencialmente danosos (MICHAELIS, 1996; PRATO et al., 2017). Os nociceptores silenciosos são apenas sensibilizados no decurso de um processo inflamatório quando expostos a algum mediador algio gênico, ou seja, substâncias capazes de reduzir o limiar de excitação dos nociceptores e aumentar os impulsos nas terminações nervosas presentes no tecido (SCHMIDT, 2013; STUMP; DALBEN, 2012). Apesar de raros na pele de roedores, as fibras silenciosas representam quase um quarto de todos os nociceptores de fibra C em humanos, podendo também ser representados por fibras A-delta (PRATO et al., 2017).

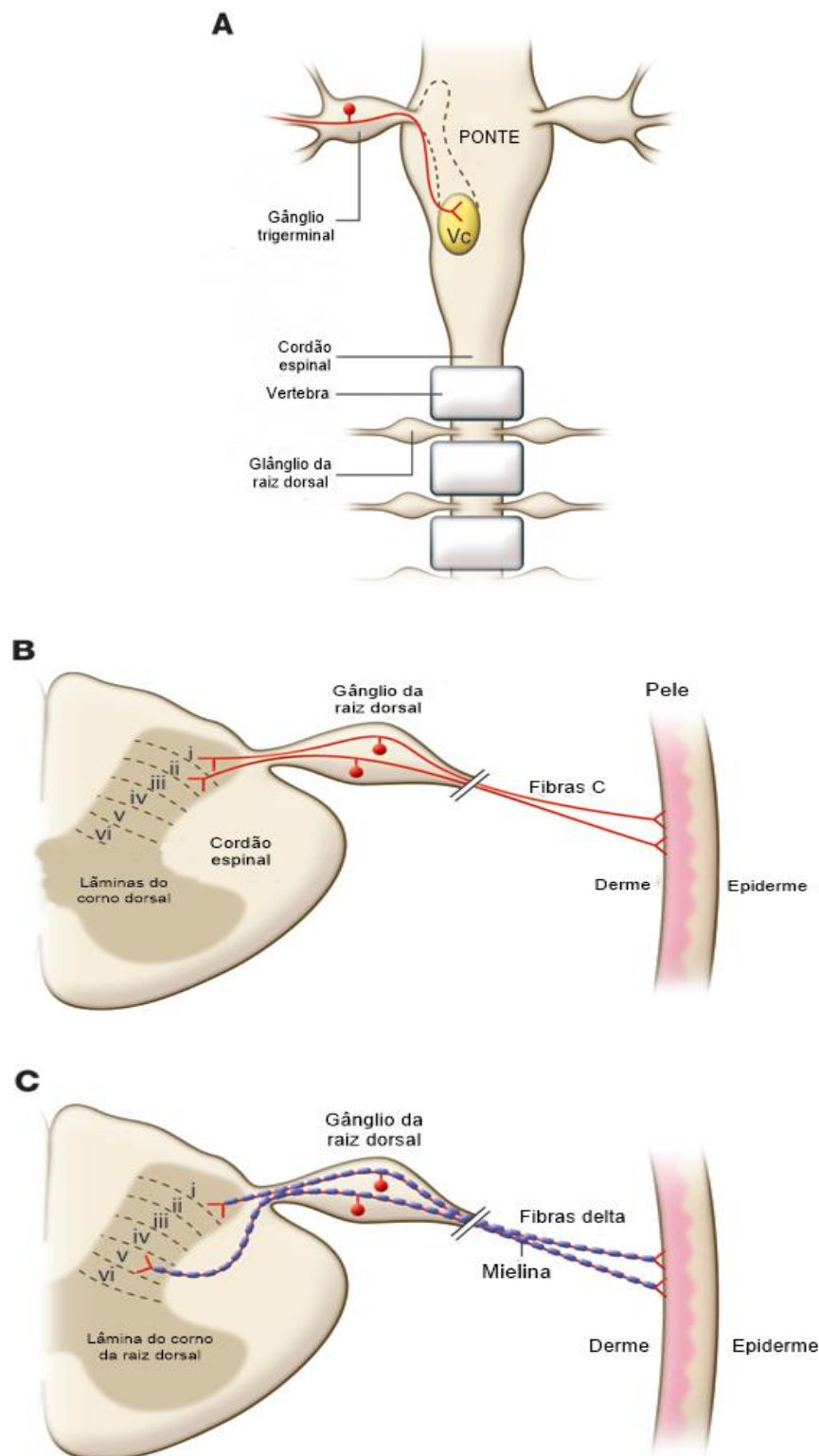


Figura 3. Anatomia dos nociceptores. a) Os neurônios somatossensitivos estão localizados em gânglios periféricos (gânglios da raiz trigeminal e dorsal) localizados ao lado da coluna vertebral e medula. b) A maioria dos nociceptores não são mielinizados apresentando axônios de pequeno diâmetro (fibras C, vermelhas). c) Nociceptores de fibras A δ são mielinizados e apresentam maior diâmetro quando comparados às fibras C. Figura e legenda adaptadas de Dubin e Patapoutian, 2010.

2.2.2. Dor de origem inflamatória

A dor inflamatória é descrita como o aumento da sensibilidade em resposta a um processo inflamatório associado a algum dano tecidual (GREGORY ET AL., 2013). Frente a essa sensibilização, um estímulo inócuo, antes incapaz de gerar dor, agora pode ser doloroso se aplicado na região da lesão, sendo esta condição descrita como alodinia (PRESCOTT; RATTÉ, 2017). Ainda, frente a um processo inflamatório, um estímulo que antes já induzia a dor, pode ser tornar mais intenso e duradouro, condição conhecida como hiperalgesia (PRESCOTT; RATTÉ, 2017).

Como já citado nos tópicos anteriores, após um dano tecidual ocorre a liberação de diversos mediadores quimioatraentes, citocinas inflamatórias e sensibilização dos nociceptores (HECK, 2005). Sabe-se também, que a dor de origem inflamatória é iniciada principalmente a partir da ação das PG's derivadas, em grande parte, da COX-2, onde no sítio da inflamação, de forma particular a PGE₂, ativa os receptores EP reduzindo o limiar de disparo das fibras sensoriais nociceptivas (RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011). Essa redução de limiar se dá por meio do aumento dos níveis de AMP cíclico e/ou liberação do cálcio intracelular estocado no retículo endoplasmático, aumentando assim a resposta aos estímulos tanto inócuos (alodinia) quanto nocivos (hiperalgesia), em um fenômeno definido como sensibilização periférica (JANG; KIM; HWANG, 2020). Adicionalmente, o processo inflamatório decorrente de lesão tecidual periférica leva à síntese de PGE₂ na região do corno dorsal da medula espinal, o que contribui para a chamada sensibilização central (VASKAR DAS, 2015).

Considerando as ações dos mediadores inflamatórios na instauração da dor, também é relevante destacar o importante papel desses agentes na indução

da migração leucocitária (CUNHA et al., 2008). Sabe-se que a migração dos leucócitos ocorre por meio do aumento da permeabilidade vascular após liberação de estímulos inflamatórios, o que induz a formação de edema e, indução e manutenção da dor (LEVINE et al., 1984). Nesse contexto, em um trabalho realizado por CUNHA e colaboradores (2008), foi demonstrada a importância das células neutrofílicas na instauração da hipernocicepção inflamatória. Adicionalmente, outros estudos também têm trabalhado com a finalidade de demonstrar e discutir a importância dos neutrófilos frente a gênese da dor de origem inflamatória, assunto já discutido no item 2.1.2. do presente trabalho (BENNETT et al., 1998; CUNHA; VERRI, 2006; LEVINE et al., 1984).

2.2.3. Modelos de hiperalgesia inflamatória

A dor, seja qual for sua origem, é um importante sinal clínico relacionado à modificação de diversos mecanismos tanto periféricos quanto centrais. Desse modo, é notória a importância de modelos que permitam a compreensão acerca dos aspectos multidimensionais desse processo (GREGORY R. POLSTON, 2013). De forma particular, a dor inflamatória tem sido objeto de pesquisas que dispõe de diversos modelos animais que buscam elucidar os efeitos de danos teciduais no desenvolvimento da dor aguda e persistente (REN; DUBNER, 1999).

Para acessar os mecanismos relacionados à dor inflamatória, os modelos mais populares utilizam a administração intradérmica de agentes inflamatórios na região plantar das patas traseiras de roedores (acessando o sistema sensorial do gânglio da raiz dorsal), ou ainda por meio de administrações na articulação temporomandibular (ATM) (acessando o sistema sensorial trigeminal) (BEREITER; HARGREAVES; HU, 2008; FEHRENBACHER; VASKO; DUARTE,

2012). A administração de agentes inflamatórios via intraperitoneal (i.p) também é descrita como um modelo padrão para avaliação de mediadores inflamatórios, migração leucocitária e padrões de nocicepção (CASH; WHITE; GREAVES, 2009; LONGHI-BALBINOT et al., 2012).

Os agentes inflamatórios comumente induzem dor inflamatória aguda, em um processo associado com o recrutamento de células neutrofílicas que pode progredir a um quadro persistente que irá envolver, conseqüentemente, a participação de macrófagos, mimetizando a cronificação da dor (GREGORY R. POLSTON, 2013). Dentre os agentes mais conhecidos e utilizados para o estudo da hiperalgesia inflamatória em camundongos podemos destacar, o adjuvante completo de Freund's (CFA), mais utilizado em modelos de dor inflamatória crônica relacionados a quadros de artrite reumatoide e tendinite (COBOS et al., 2012) e a CG, descrita como modelo padrão ouro para avaliação da hiperalgesia inflamatória aguda (CUNHA et al., 2005b).

2.2.4. Carragenina: Modelo padrão ouro da hiperalgesia inflamatória.

De forma geral, as CG's formam um grupo composto de polissacarídeos sulfatados derivadas de algas marinhas da família *Rhodophyceae*. Três principais tipos de CG são descritas: kappa (κ), iota (ι) e lambda (λ) e suas diferenças advêm do método de extração e do tipo de alga do qual está sendo extraída (DOS SANTOS; GRENHA, 2015). São comumente utilizadas como aditivos alimentares (WEINER, 2014) e como agente inflamatório em modelos animais (MICOV et al., 2010; OU et al., 2019). As CG's ativam respostas imunes inatas pela sua interação com o receptor toll like 4 (TLR-4) - receptor responsável pelo reconhecimento de patógenos e conseqüente ativação do sistema imune inato (SOKOLOVA et al., 2016). A inflamação induzida por CG caracteriza-se pelo

acúmulo de exsudato e migração leucocitária, sendo mediada pela ação de citocinas inflamatórias e outros agentes como a histamina, serotonina, bradicinina e as COX's (ANNAMALAI; THANGAM, 2017).

Os lipopolissacarídeos bacterianos (LPS), importantes componentes da membrana de quase todas as bactérias gram-negativas, também têm sido utilizados em modelos de estudo de parâmetros inflamatórios (NGKELO et al., 2012; SAMPATH, 2018). O uso de LPS assemelha-se aos efeitos da CG pela ligação da molécula a receptores TLR4 e secreção de agentes pró-inflamatórios (LU; YEH; OHASHI, 2008).

Após a administração de CG por via intraplantar, ocorre a instauração do processo inflamatório (fig .4), acompanhado do edema de pata, em consequência do extravasamento plasmático e vermelhidão, decorrente da dilatação dos capilares sanguíneos pela ação da bradicinina (FEHRENBACHER; VASKO; DUARTE, 2012; WINTER; RISLEY; NUSS, 1962). No mais, a hiperalgesia inflamatória induzida por CG é mediada pela ação de duas principais citocinas, TNF- α e CXCL-1, ambas atuam através da liberação de IL-1 β que, por sua vez, induz a síntese de prostanóides pela via COX. Além disso, em camundogos a CXCL-1 também atua na hiperalgesia inflamatória por meio das aminas simpatomiméticas. (CUNHA et al., 2005a; FERREIRA, 1993).

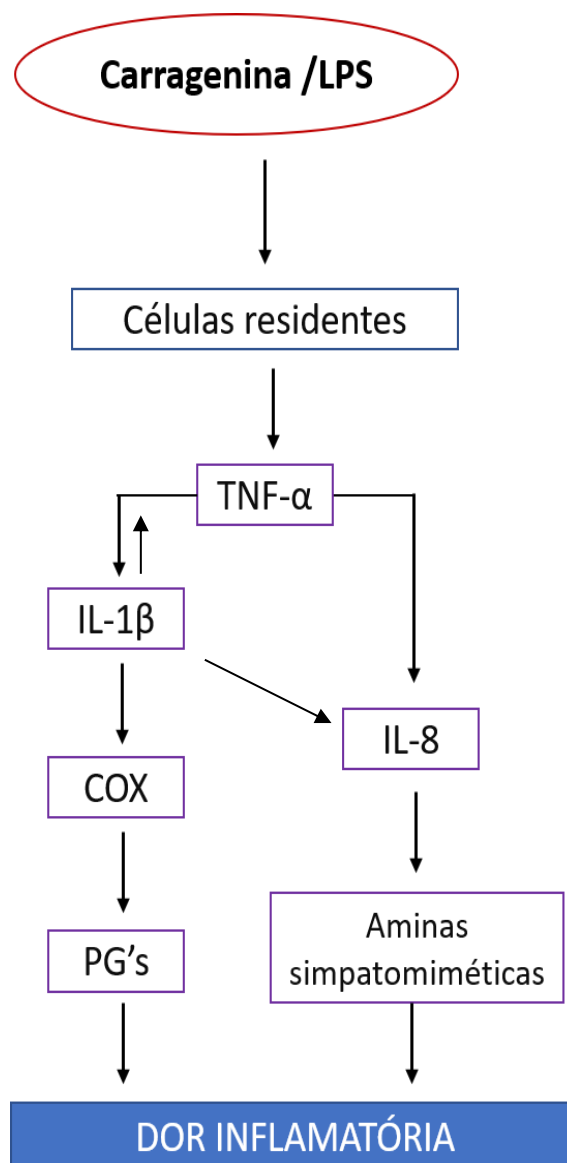


Figura 4. Cascata inflamatória induzida pela carragenina/LPS.

2.3. Eicosanóides: Síntese e metabolismo.

A síntese de eicosanóides inicia-se com a clivagem de fosfolipídios de membrana pela fosfolipase A2, disponibilizando o ácido araquidônico que abastece diferentes vias enzimáticas como as lipoxigenases (responsáveis pela síntese de LT) e as COX's (responsáveis pela síntese de PG's) (LONE; TASKÉN, 2013).

As COX's são heterodímeros funcionais, possuindo 3 isoformas mais conhecidas (COX-1, 2 e 3) que, através de dois sítios catalíticos distintos, realizam duas etapas enzimáticas também distintas e sucessivas (fig. 5). Na primeira etapa, um sítio catalítico da COX converte o ácido araquidônico em PGG₂ em uma reação de biooxigenação. Na segunda etapa, a PGG₂ sofrerá uma reação de peroxidase em outro sítio catalítico, formando um intermediário instável chamado de PGH₂ (SMITH; URADE; JAKOBSSON, 2011). Posteriormente, a síntese dos variados prostanóides (PG's e tromboxanos) será determinada pela expressão de isomerases e síntases teciduais específicas, que completam o ciclo gerando PGD₂, PGE₂, PGF₂α, PGI₂ ou tromboxanos A₂ (SMITH, 1992).

Como resultado, os prostanóides atuam por intermédio de receptores específicos, assim, temos os receptores do tipo: DP, EP, FP, IP e TP. Nesse âmbito, ainda temos 4 subtipos de receptores EP: EP1, EP2, EP3, EP4, sendo esta subdivisão baseada na preferência/especificidade por agonistas e antagonistas sintéticos e suas vias de segundo mensageiros ativadas (FUJIKAWA et al., 2012). Os prostanóides, como definição, são caracterizados como lipídios autacóides, ou seja, moléculas sintetizadas a partir de ácidos graxos poli-insaturados que atuam como mediadores químicos celulares, os quais possuem diversas funções biológicas através de ação parácrina e autócrina (BOS et al., 2004; RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011).

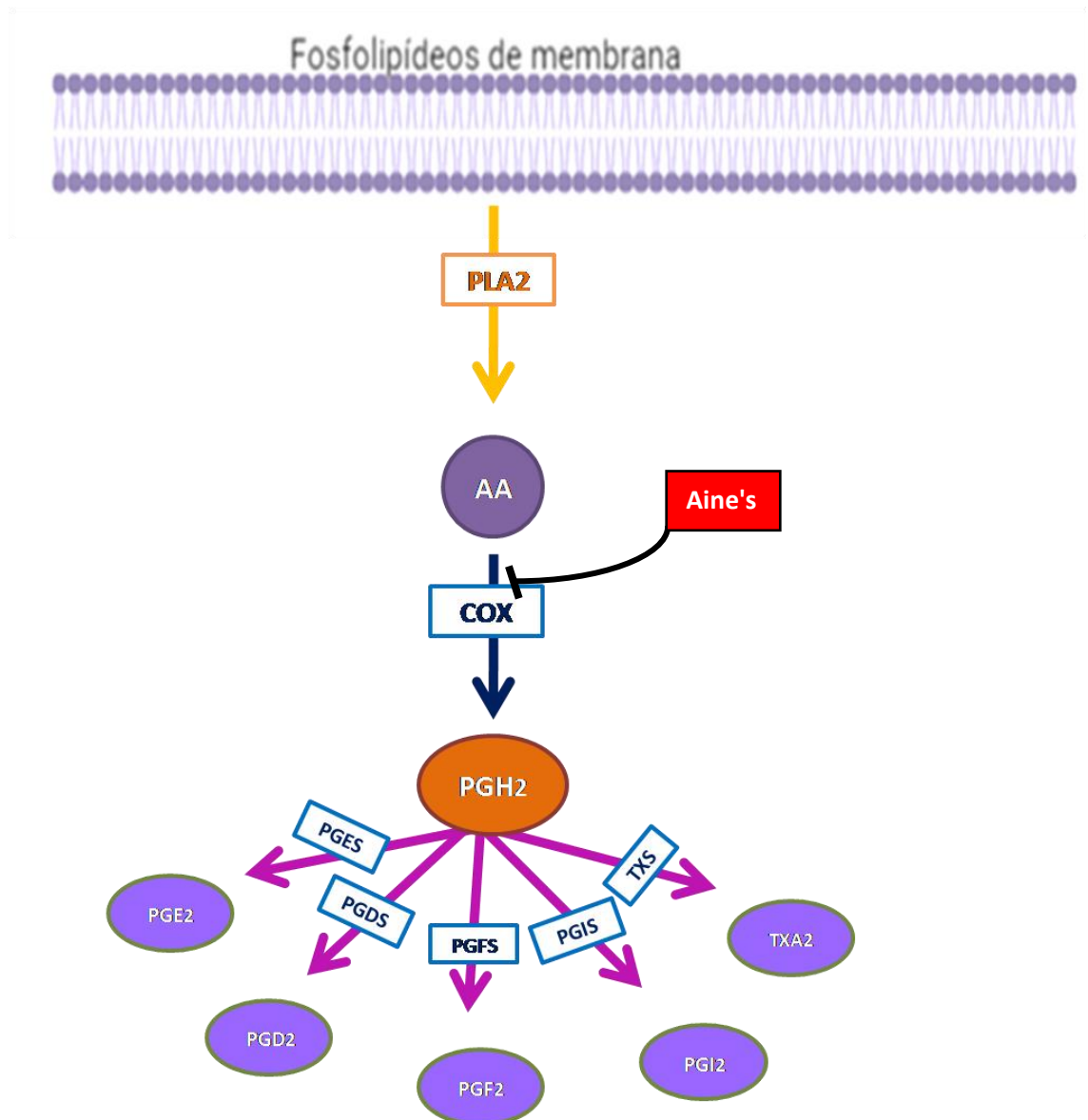


Figura 5. Via das ciclooxygenases na formação de prostanóides. O ácido araquidônico (AA) é sintetizado através dos fosfolípidios de membrana que sofrem a ação da fosfolipase A2 (PLA2). Em seguida, o AA é metabolizado pelas isoenzimas COX, gerando um intermediário instável PGH2 que, por sua vez, sofre a ação de sintasesPG específicas que geram como produtos as prostaglandinas (PG) e tromboxanos (TXA). Adicionalmente, a ação dos anti-inflamatórios não esteroidais (AINE`s) ocorre na isoenzima COX, inibindo a via da síntese das prostaglandinas.

Importante mencionar que, de modo geral, a isoenzima COX-1 é descrita como constitutiva, expressa na maioria das células em níveis basais, sendo responsável por regular diversos processos fisiológicos tais como: secreção gastrointestinal, fluxo sanguíneo renal, função glomerular e a homeostase vascular (KIRKBY et al., 2012; PANNUNZIO; COLUCCIA, 2018). Por outro lado,

a COX-2 é classificada como indutiva e, sendo assim, responsável pela síntese de prostanóides após insultos inflamatórios e condições patológicas (RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011).

No entanto, é importante levantar a discussão acerca da definição limitada das isoenzimas como somente "constitutiva" e "indutiva" para a COX-1 e 2, respectivamente. Desse modo, KIRKBY e colaboradores (2016) realizaram um estudo sistemático acerca da expressão constitutiva da COX-2, presente em diversos tecidos de órgãos como a bexiga, rins, pulmões sendo os níveis mais elevados presentes nas células do trato gastrointestinal e cérebro. Do outro lado, também temos trabalhos evidenciando o aumento indutivo da COX-1 em resposta à baixa ou total ablação da expressão de COX-2 em parâmetros inflamatórios (ISLAM et al., 2016; KIRTIKARA et al., 1998). Sendo assim, embora os eicosanóides representem um importante alvo no tratamento da inflamação e da dor, principalmente por meio da ação dos AINE's, sua expressão, biosíntese, modulação e atuação ainda necessitam serem melhor compreendidas.

2.3.1. Prostaglandinas na hiperalgesia inflamatória.

As PG's exercem papel essencial na instauração e desenvolvimento da resposta inflamatória, estando intimamente relacionadas com as manifestações dos sinais cardinais da inflamação aguda, dos quais podemos destacar a dor (RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011). Sabe-se que os anti-inflamatórios não esteroidais (AINE's), são um importante indicativo da participação das PG's na dor inflamatória. Isso se dá, pois a ação dos AINE's ocorre pela inibição das isoenzimas COX, impedindo assim a síntese de prostanóides, reduzindo a inflamação e, conseqüentemente, a dor. Isso demonstra que, de fato, as PG's

apresentam importante papel nos processos relacionados à dor inflamatória (FERREIRA, 1972; FERREIRA; MONCADA; VANE, 1973; FUJIKAWA et al., 2012).

Evidências têm apontado à ação das PG's por meio de dois principais processos: 1) sensibilização dos terminais nervosos dos nociceptores e 2) aumento do processamento da informação de dor a nível central (ITO; OKUDA-ASHITAKA; MINAMI, 2001). Também é importante ressaltar o aumento indutivo da expressão do gene associado à COX-2 antes do aumento da produção de PG's durante o curso dos processos inflamatórios (ISHIKAWA et al., 2007). No entanto, como já mencionado, ao menos em parte, a isoforma COX-1 pode também colaborar com a instauração de processos inflamatórios e dor (MARTINEZ et al., 2002).

A PGE₂ é descrita como o principal mediador lipídico relacionado aos processos de inflamação e dor (KAWABATA, 2011), sendo alvo indireto das ações dos principais AINE's que reduzem suas concentrações no organismo através da inibição da COX-2 (BURIAN; GEISLINGER, 2005; CHEN, 2016). Na inflamação aguda, a PGE₂ atua através da sua ação vasodilatadora, facilitando a migração de neutrófilos e macrófagos para o tecido, e estimulando diretamente os nociceptores (RAUD, 1990; ZHANG et al., 1997). Além disso, a PGE₂ também tem sido descrita como agente anti-inflamatório, apresentando importante papel na resolução da ação inflamatória dos neutrófilos através da inibição da produção do LTB₄ (LEVY et al., 2001). Essa ação ocorre pela capacidade que a PGE₂ tem de alterar a síntese, nos neutrófilos, de LTB₄ para Lipoxina A₄ que, de maneira oposta, atua inibindo a infiltração de células neutrofílicas para o local da inflamação (LEVY et al., 2001; LOYNES et al., 2017).

No trato gastrointestinal a PGE_2 e a PGI_2 apresentam papel cito protetor da mucosa gástrica, aumentando a produção de muco e do fluxo sanguíneo na região e reduzindo a secreção gástrica (CARVALHO et al., 2015). Adicionalmente, as prostaglandinas também apresentam importante função frente aos parâmetros renais, cardiovasculares e de agregação plaquetária (HILÁRIO; TERRERI; LEN, 2006). Dessa forma, é evidente a importância das PG's tanto no âmbito da dor inflamatória como também na manutenção de diversos processos fisiológicos, expondo ao mesmo tempo a eficácia clínica e o amplo espectro de efeitos colaterais relacionados ao uso de AINE's (BROOKS, 1998). Assim, é evidente a necessidade da realização de mais estudos que visem uma maior compreensão da via COX/PG tanto no âmbito das funções fisiológicas como também dos processos patológicos, buscando, assim, melhorar a ação dos medicamentos que atuam na via, potencializando, direcionando e refinando suas ações anti-inflamatórias e analgésicas a fim de reduzir seus efeitos adversos.

3. OBJETIVO GERAL:

Avaliar a contribuição da COX-2 de neutrófilos no modelo de hiperalgesia inflamatória induzida por CG em camundongos.

3.1. Objetivos específicos

- Avaliar o limiar hiperalgésico no modelo de hiperalgesia inflamatória induzida por CG em animais COX-2^{-/-} machos e fêmeas.
- Avaliar o limiar hiperalgésico induzido por il-1 β , nos animais COX-2^{-/-}.
- Investigar a relevância das células neutrofílicas na hiperalgesia inflamatória nos animais COX-2^{-/-}.
- Analisar a importância da COX-1 na hiperalgesia inflamatória mediante a ablação de COX-2 em neutrófilos.
- Quantificar citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , TNF- α e CXCL-1) e anti-inflamatória (IL-10) após indução da hiperalgesia inflamatória nos animais COX-2^{-/-} e estimulação de neutrófilos por LPS.
- Avaliar o perfil de expressão gênica para COX-1 e COX-2 tanto no tecido quanto na cultura de células neutrofílicas de animais COX-2^{-/-}, após indução da hiperalgesia inflamatória por CG ou estimulação da cultura por LPS.

4. METODOLOGIA

4.1. Materiais

Carragenina 1% Sigma Aldrich (St.Louis, MO, EUA); IL-1 β 0,5 pg/pata Farmafórmula® (Fagron, Brasil); Fucoidan 50 mg/Kg Sigma Aldrich (St.Louis, MO, EUA); Valeril Salicilato 50 mg/Kg Sigma Aldrich (St.Louis, MO, EUA), LPS 1 μ g/mL Thermo Fisher Scientific. As dissoluções de todas as drogas foram realizadas em solução salina 0,9%. Os outros produtos químicos utilizados no presente trabalho foram de grau analítico e obtidos a partir de fornecedores comerciais padrão.

4.2. Animais

Usamos duas linhagens de camundongos C57BL/6J geneticamente modificados: Cox-2^{fl/fl}, usado no presente estudo como grupo controle (Cox-2^{+/+}), e Cox-2^{fl/flMrp8cre+/-}, que é um camundongo knockout condicional para Cox-2 em neutrófilos (Cox-2^{-/-}), derivado do cruzamento entre camundongos Cox-2^{fl/fl} e Cox-2^{fl/fl:Mrp8cre+/-} (Divisão de Laboratório de Medicina Animal da Universidade da Califórnia, Los Angeles). Foram utilizados camundongos machos e fêmeas (25-30 g) com oito semanas de idade, com livre acesso à água e dieta padrão, alojados em gaiolas em ambiente com temperatura controlada e ciclo claro-escuro de 12h/12h. O Comitê de Ética em Pesquisa Animal – Universidade Estadual de Campinas (CEUA 4564-1/2017) aprovou todos os tratamentos, procedimentos e protocolos experimentais utilizados neste estudo (Apêndice A). O cuidado, manuseio e experimentos comportamentais com camundongos seguiram as diretrizes da Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) para o uso de animais na pesquisa da dor. Todos os esforços foram feitos para

garantir o uso mínimo de camundongos. Todos os experimentos comportamentais foram conduzidos de forma randomizada e duplo-cega.

4.2.1. Identificação do animal transgênico pela técnica de PCR.

4.2.1.1. Extração do DNA genômico (gDNA)

Inicialmente os animais foram numerados por perfuração na orelha seguindo o seguinte padrão (fig.6):

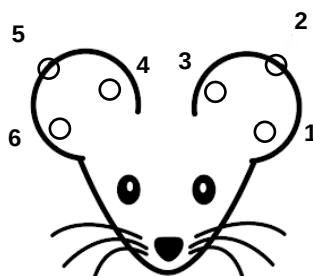


Figura 6. Marcação para identificação dos animais.

Essas marcações eram realizadas em concomitante retirada de cerca de 0,3 cm de cauda do animal, a qual foi estocada em eppendorfs (2ml) identificados e mantidos em gelo. Posteriormente, foram adicionados 200 µl de tampão de lise com proteinase K (50 µl de proteinase K para 2 ml de tampão de lise). Agitado rapidamente no vortex e encubado *overnight* a 50° sob agitação no *termomixer*.

Após incubar, foi adicionado 200 µl de tampão de lise (sem proteinase K) e levado ao vortex por 1 minuto, incubando novamente entre 15 – 20 minutos na temperatura ambiente. Logo após, centrifugou-se as amostras durante 20 min. a 10.000 rpm, 4° C e 200 µl do sobrenadante foi transferido para um novo tubo (2 ml).

Posteriormente, adicionamos 500 µl de etanol 100% gelado e homogeneizamos (levemente) por cerca de 30 segundo até a visualização de leves filamentos brancos – DNA) e então a amostra foi centrifugada por 10 minutos a 6.000 rpm, 4° e o sobrenadante desprezado por cuidadosa inversão

do tubo. Após a inversão, adicionamos 500 µl de etanol 70% gelado e novamente levamos as amostras para centrifugação por 10 minutos a 6.000 rpm, 4° e o sobrenadante desprezado por cuidadosa inversão do tubo. Os tubos foram então dispostos na bancada por cerca de 20 minutos (até a secagem do *pellet*) e, por fim, adicionamos 100 µl de água miliq agitando com a pipeta para ressuspensão do *pellet*. A mostra foi estocada até o processo de genotipagem a 4°.

4.2.1.2. PCR Convencional

A reação para a PCR foi realizada a partir do DNA total extraído, seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante PCR Super Mix 2X (GENEDIREX – Interprise), na proporção de 25µl de mix + 25µl de primer + 2 µl da amostra de DNA. Os microtubos foram levados ao termociclador e posteriormente as amostras foram dispostas em poços de gel de agarose 3% em uma cuba de eletroforese, coberta por TAE 1X e com a corrida programada a 110 V. Após a corrida dos produtos da amplificação, o gel foi fotovisualizado em um aparelho transiluminador sob radiação ultravioleta.

4.3. Desenho experimental

4.3.1. Teste de hiperalgesia mecânica – Von Frey eletrônico

Para avaliação do limiar de hiperalgesia mecânica dos animais, foi utilizado o teste de Von Frey eletrônico (EFF 301 Analgesímetro Digital, Insight, Brasil), adaptado para camundongos segundo método descrito por CUNHA et al. (2004). Nesse processo, através de um analgesímetro eletrônico temos a transdução da força aplicada na pata do animal, com uma ponteira descartável depolipropileno com 0.5 mm de diâmetro adaptada ao transdutor, até que o mesmo realize a retirada do membro. Através do analgesímetro obtemos a

informação da força (em gramas - g) necessária para que o animal retire a pata. Para a realização das medições, os animais foram inicialmente adaptados ao ambiente de 15 a 30 minutos antes do teste em uma sala silenciosa, dispostos individualmente em caixas de acrílico (12 x 10 x 17 cm) com piso de rede de arame não maleável com 1mm de espessura e espaços de 5mm². Para o procedimento experimental, o experimentador aplica uma força gradual com a ponteira em posição perpendicular à parte central da pata traseira do animal até que o mesmo realize um reflexo de retirada da pata, seguido de uma reposta caracterizada como tremor do membro (flinch). Essas medições são realizadas até que se obtenha 3 medidas similares (com margem de 10% para mais ou para menos). Os resultados foram calculados subtraindo os valores obtidos após o tratamento pela medição basal (antes do tratamento) e expressos como Δ do limiar nociceptivo mecânico.

4.3.2. Indução da hiperalgesia por agentes inflamatórios

A hiperalgesia inflamatória na pata dos animais induzida por CG foi realizada através de administração intraplantar de CG 1% (ou solução salina 0,9%, para controle) (25 μ l/pata) uma hora antes do início do teste comportamental. O pico de ação do reagente foi considerado na terceira hora após a administração, onde também foi coletado tecido da região intraplantar para análises moleculares. Adicionalmente, a hiperalgesia inflamatória induzida por IL-1 β foi também realizada através de administração intraplantar (0.5 pg/pata) ou solução salina 0,9% (25 μ l/pata) 20 minutos antes do início do teste comportamental. As injeções foram realizadas com agulha de 30 g conectada a uma seringa de insulina (1ml).

4.3.3. Modulação da via e da hiperalgesia inflamatória por agentes farmacológicos.

A influencia da migração de células neutrófilicas e o papel da *cox -1 in vivo* na hiperalgesia inflamatória induzida por CG foram avaliadas pela administração intraperitoneal (i.p) de fucoidam, e valeril salicilato (50 mg/kg) ou salina 0,9% (2ml/cavidade), respectivamente. As injeções foram realizadas com agulha de 30 g conectada a uma seringa de 1 ml. Todas as formulações foram administradas 30 minutos antes da administração de CG 1% na pata e amostras do tecido intraplantar foram coletadas no pico da ação do agente inflamatório para análises moleculares.

4.4. Ensaios moleculares

4.4.1. Isolamento de neutrófilos da medula óssea.

Após a eutanásia as patas traseiras dos camundongos foram limpas com álcool 70% e, com o auxílio de uma tesoura e de uma pinça (dente de rato), foi removida a pele em torno da perna, partindo da região da crista ilíaca até a pata. Posteriormente, toda a pele no entorno dos ossos foi removida com o auxílio de um bisturi, expondo apenas o fêmur conectado à tíbia. Ambos foram então separados por um corte na junção articular.

Após o processo da coleta, as epífises foram removidas e, com o auxílio de uma seringa (5 mL) e agulha (30G), foi realizada a lavagem da região interna do osso, coletando a medula óssea dentro de um tubo falcon (15 mL) com HBSS 1X. Posteriormente, o meio com a medula foi homogeneizado com o auxílio de uma pipeta Pasteur.

Em seguida, centrifugamos o tubo falcon a 1200 rpm, 10 min 22°. Descartamos o sobrenadante e ressuspendemos o pellet em 2 mL de tampão de

lise de hemácias. Encubamos por cerca de 5 minutos em temperatura ambiente e, posteriormente, centrifugamos a 1200 rpm, 10 min, 22°. Descartamos novamente o sobrenadante e ressuspendemos o pellet em 3 mL de HBSS 1x.

4.4.1.1. Separação por gradiente de densidade - Percoll

Após a lavagem das células no tubo falcon de 15 mL, inserimos na solução uma pipeta de vidro e adicionamos lentamente (de baixo para cima) 3 mL de percoll 55% e por fim, 6 mL de percoll 65%. Adicionamos as células ressuspendidas da etapa anterior no topo desse gradiente.

Centrifugamos o tubo com o gradiente e as células a 2400 rpm, 30 min. 20° (frenagem 0), formando-se então duas bandas no gradiente. A primeira contendo células mononucleares e uma pequena parte do Percoll 55% e, a segunda, contendo os neutrófilos. A segunda banda foi retirada e transferida para um tubo com 30 mL de PBS para lavagem. Centrifugamos a 2000 rpm, 10 min. 22° e ressuspendemos o pellet em 2-5 mL de meio RPMI completo. Por fim, aliquotamos 10µL do meio com células para contagem na câmara de Neubauer.

4.4.2. Estimulação dos neutrófilos com LPS.

No presente estudo, as células neutrofílicas foram plaqueadas em placas de 24 poços na quantidade de 4×10^5 células/poço e estimuladas com 10 µL de LPS 1µg/mL ou 10 µL de RPMI completo (controle) e incubadas em estufa por 4 horas a 37°. Por fim, as células foram coletadas dos poços e centrifugadas a 1200 rpm, 10 minutos à temperatura ambiente. Foram coletados e estocados no freezer (-80°C) o sobrenadante para ensaio de ELISA e as células para western blot e PCR-rt.

4.4.3. Mensuração da atividade de mieloperoxidase

A atividade da mieloperoxidase (MPO) foi medida de acordo com o método previamente descrito por BRADLEY ET al., (1982). Amostras de tecido da pata foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 6,0), com brometo de hexa-decil-trimetil-amônio (HTAB) 0,5%, na proporção de 1 ml/100 mg de tecido. O homogenato foi então centrifugado a 4500 rpm durante 20 min a 4° C. O sobrenadante então foi misturado com dihidrocloridrato de o-dionisidina e 1 % de peróxido de hidrogênio afim de parar a reação. A atividade de MPO na reação foi analisada através da medição da absorbância à 450 nm em espectrofotômetro. Os resultados foram então expressos como unidade de MPO por mg de tecido (UMPO/mg de tecido). A unidade da atividade de MPO foi definida pela conversão de 1 μ mol de H_2O_2 em água em 1 min a 22 ° C.

4.4.4. Mensuração de citocinas

Os níveis de IL-1 β , TNF- α , CXCL-1 e IL-10 foram determinados utilizando ensaio de imunoabsorbância ligado a enzima ELISA, Kit DuoSet (R&D Systems). Uma placa de microtitulação foi incubada a 4° C durante toda a noite com um anticorpo policlonal para IL-1 β , TNF- α , CXCL-1 ou IL-10 (10 μ g/ml). Posteriormente, as placas foram lavadas e os locais de ligação adicionais na superfície da placa foram bloqueados por incubação dos poços com albumina de soro bovino (BSA) a 1% durante 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram novamente lavadas e as amostras de teste e curva padrão foram adicionadas em várias diluições, postas em duplicata e incubadas a 4 ° C durante 2 h. As placas foram lavadas três vezes com tampão (0,01 M de fosfato, 0,05 M de NaCl, 0,1% de Tween 20, pH 7,2) e então os anticorpos policlonais

biotinilados anti TNF- α , CXCL-1 ou anti IL-1 β foram adicionados (50 μ l/poço). Foi feita então outra incubação à temperatura ambiente durante 2 h. Logo depois as placas foram lavadas e 100 μ l de Steptoavidina-HRP diluída 1:200 foi adicionada a todos os poços, após 20 min. as placas foram lavadas novamente e o reagente de cor H₂O₂ +Tetramethylbenzidinea (50c) foi adicionado durante 20 min. em ambiente escuro e temperatura ambiente. Posteriormente a reação da enzima foi interrompida com H₂SO₄-1M (50 μ l/poço) e a absorbância foi lida a 450 nM. Os resultados foram obtidos comparando a densidade óptica com as densidades da curva-padrão e expressos como picogramas de cada citocina por mililitro (pg/ml).

4.4.5. Análise da expressão gênica dos genes COX por PCR-rt

4.4.5.1. Extração de RNA a partir do tecido da pata.

O material de RNA extraído para o referido trabalho foi obtido do tecido intraplantar dos camundongos. Desta forma, todo o procedimento de extração foi realizado em uma bancada livre de ribonucleases e materiais de uso exclusivo para manipulação de RNA. Após a retirada dos tecidos, os mesmos eram dispostos em nitrogênio líquido e macerados com pistilo em um almofariz, até que o tecido apresentasse a aparência de um pó.

Após esse processo, o material foi transferido para um tubo contendo 500 μ l de trizol, homegeinizado e incubado em temperatura ambiente por 20 minutos. Logo em seguida, 100 μ l de clorofórmio foi adicionado no mesmo tubo, homogeinizado (vigorosamente) e novamente incubado em temperatura ambiente por 5 minutos, seguido de centrifugação a 12.000 x g por 15 min. a 4°. Após a centrifugação, o experimentador, através de uma angulação de 45° do

tubo (para que evite o contato da ponteira com a interface), removeu então o sobrenadante, fase aquosa incolor, transferindo-o para um novo tubo

Após a centrifugação com o trizol a mistura separa-se em 3 fases: a inferior (fenólcloreofórmio), interfase (DNA) e superior aquosa (RNA), sendo esta ultima próximo de 50% do total de todas as fases.(fig. 7).

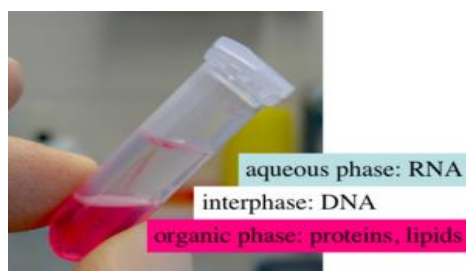


Figura 7. As três fases resultantes da centrifugação do tecido.

No novo tubo, foi então adicionado à fase aquosa 0,5 ml de isopropanol e incubado em temperatura ambiente por 10 minutos, seguido de centrifugação a 12.000 x g por 10 minutos a 4° C. Após esse procedimento, o sobrenadante foi descartado por inversão do tubo e o pellet lavado com 500 µl de etanol 75% (vortex) e novamente centrifugado a 7.500 x g por 5 minutos a 4° e descartado o sobrenadante. Os tubos foram dispostos na bancada por cerca de 5 - 10 minutos para secagem do pellet.

Por fim, o *pellet* foi ressuspensionado em 30µl de água *RNase-Free* em banho mariana temperatura de 55 – 60° C por 10 a 15 minutos, e então estocadas a - 70° C.

4.4.5.2. Síntese do cDNA

A síntese do cDNA foi realizada a partir do RNA total extraído e quantificado. Sendo assim, 2 µg de RNA foi diluído em um solução final de 20 µl para que ao final obtivéssemos o cDNA em uma concentração de 100 ng/µl. Nesse processo utilizamos o kit High Capacity (Applied – EUA) com hexâmetros

aleatórios, preparando a solução *master mix* seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante. Posteriormente pipetamos a solução e as amostras de RNA em microtubos e, por fim, levamos os mesmos ao termociclador seguindo os padrões também descritos pelo fabricante.

4.4.5.3. PCR-RT

Os níveis quantitativos da expressão gênica tanto da COX -1 quanto da COX-2 foram determinados através de PCR em tempo real realizado em um sistema StepOnePlus® Applied (AppliedBiosystems – EUA) utilizando o reagente SYBR® Green PCR Master Mix (AppliedBiosystems – EUA). Nesse processo utilizamos como controle endógeno o gene GAPDH. As seqüências dos mRNAs dos genes alvo foram obtidas no banco público de dados da NCBI e os respectivos primers foram desenhados utilizando o software BeaconDesigner™ v8.14 (Premier BiosoftInternational) e analisados pela ferramenta online Primer-blast (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast), garantindo que os primers tivessem %GC perto de 50%, temperatura de melting e de anelamento adequadas, para que então fossem extremamente específicos para a seqüência analisada e não formassem estruturas secundárias ou dímeros, tendo tamanho entre 75 e 150bp e não possuísem estruturas secundárias nem SNPs (single nucleotide polymorphisms) nas regiões de ligação dos primers. Na tabela 1 apresentamos as seqüências dos *primers* utilizados.

Tabela I. Sequências de primers utilizados para RT-qPCR

Gene	Forward 5' - 3'	Reverse 5' - 3'
GADPH	AAGATTGTCAGCAATGCATCC	ACTGTGGTCATGAGCCCTTC
COX-1	GGGAATTTGTGAATGCCACC	GGGATAAGGTTGGACCGCA
COX-2	TGATCGAAGACTACGTGCAA	GTGAGTCCATGTTCCAGGAG

Tabela 1. seqüências dos *primers* utilizados para a PRC-rt

4.5. Análise estatística

Todos os valores foram expressos como média $\pm$ S.E.M. As análises foram determinadas através do teste de análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias seguido de pós-teste de comparações múltiplas de Bonferroni, utilizando o software GraphPad Prisma 6. As diferenças foram consideradas significantes quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Camundongos Cox-2^{-/-} mostram hiperalgesia induzida por CG mais intensa e hiperalgesia induzida por IL-1 β por tempo mais prolongado.

A Figura 1A mostra a intensidade da hiperalgesia mecânica (variação do limiar) 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h e 24h após a injeção de CG em camundongos Cox-2^{+/+} e Cox-2^{-/-}. A análise ANOVA de duas vias mostrou diferenças significativas entre os grupos ($F_{7, 91}=12,93$; $p \leq 0,0001$) e tempo ($F_{7, 91}=166,1$; $p \leq 0,0001$). O teste de comparação múltipla de post hoc Bonferroni revelou diferenças estatísticas entre os grupos nos tempos de 1h ($p \leq 0,05$), 2h, 3h, 4h, 5h e 6h ($p \leq 0,001$), mas não no tempo de 24h após a injeção de GC, mostrando que o grupo Cox-2^{-/-} exibem hiperalgesia induzida por CG mais intensa quando comparados ao grupo Cox-2^{+/+}. Observe que 3h após a injeção de GC, observamos o pico de hiperalgesia em ambos os grupos e, por isso, utilizamos esse ponto de tempo para todos os experimentos seguintes.

A Figura 1B mostra a intensidade da hiperalgesia 3h após a injeção de CG para machos e fêmeas, mostrando que ambos os gêneros no grupo Cox-2^{-/-} apresentam hiperalgesia induzida por CG mais intensa (teste T não pareado; masculino: $t=8.800$ $df=13$, $p \leq 0,0001$; feminino: $t=3,974$ $df=10$, $p=0,0026$). É importante mencionar que não há diferença estatística entre machos e fêmeas de um mesmo grupo (CG ou salina).

A Figura 1C mostra a intensidade da hiperalgesia 20, 40, 60, 90, 120, 150 e 180 minutos após injeção de IL-1 β para camundongos Cox-2^{+/+} e Cox-2^{-/-}. A análise ANOVA de duas vias mostrou diferenças significativas entre os grupos ($F_{6,54}=21,23$; $p \leq 0,0001$) e tempo ($F_{6,54}=177,5$; $p \leq 0,0001$). O teste de comparação múltipla post hoc de Bonferroni revelou diferenças estatísticas entre

os grupos em dois momentos 150 min e 180 min após a injeção de IL-1 β ($p \leq 0,001$).

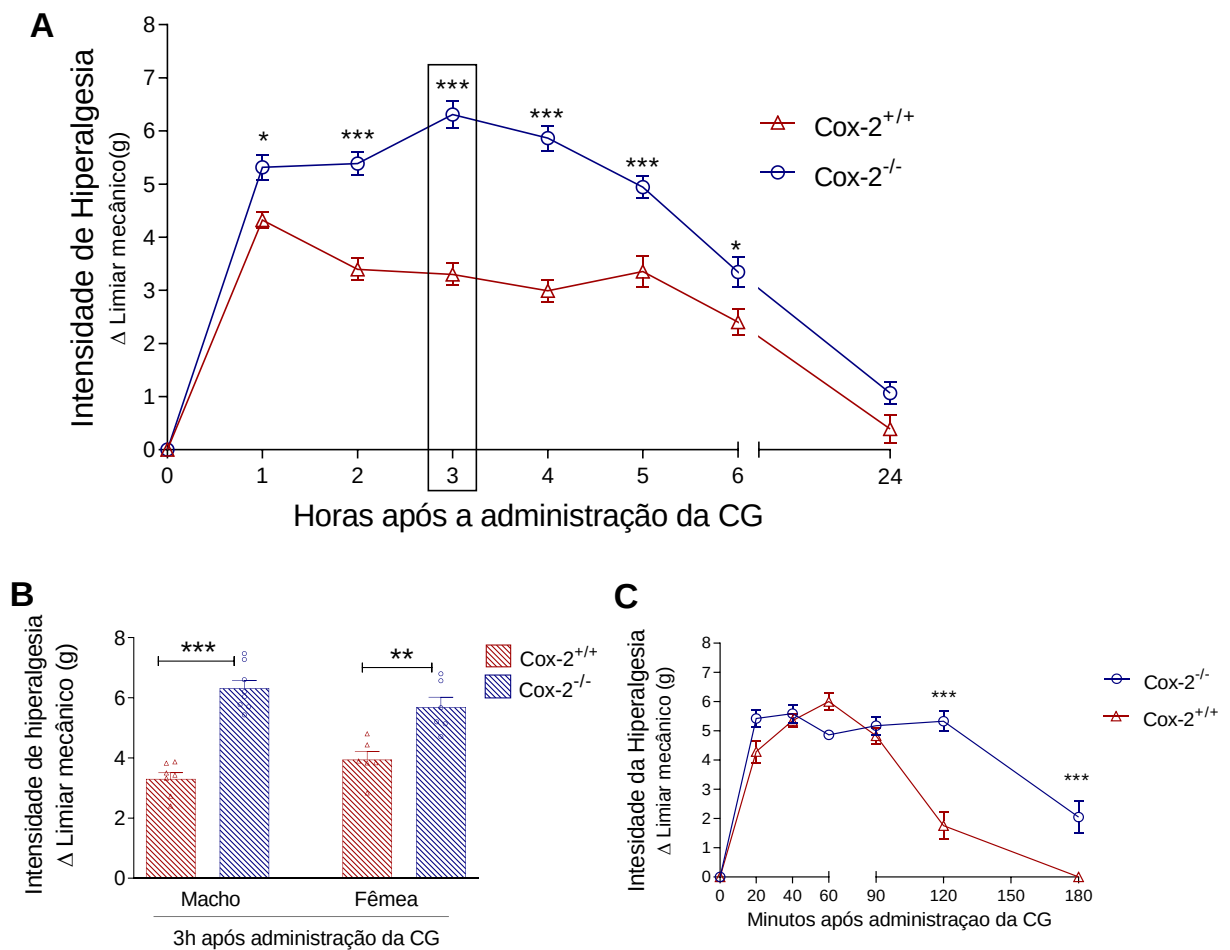


Figura 8. Intensidade da hiperalgesia após injeção de CG na pata (A) Mostra a intensidade da hiperalgesia 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h e 24h após a injeção de carragenina (GC) para ambos os grupos, Cox-2^{+/+} e Cox-2^{-/-}. Observe o ponto de tempo destacado (3h) mostrando o pico de hiperalgesia (N=7-8 por grupo; * $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$). (B) Mostra a intensidade da hiperalgesia 3h após a injeção de GC para ambos os gêneros de ambos os grupos (N=6-8 por grupo; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$). (C) mostra a intensidade da hiperalgesia 20, 40, 60, 90, 120, 150 e 180 min após a injeção de IL-1 β para ambos os grupos, Cox-2^{+/+} e Cox-2^{-/-} (N=5-6 por grupo; *** $p \leq 0,001$).

5.2. A hiperalgesia induzida por CG em camundongos Cox-2^{-/-} depende da COX-1 e da migração de neutrófilos.

Usando FC, um inibidor da migração de leucócitos, confirmamos a relevância da migração de neutrófilos na hiperalgesia inflamatória mesmo na ausência de COX-2 nessas células. A Figura 2A mostra a intensidade da hiperalgesia 3h após a injeção de CG + FC ou apenas CG. Nossos dados mostraram redução da intensidade da hiperalgesia em ambos os grupos que receberam FC, Cox-2^{+/+} e Cox-2^{-/-} quando comparados aos grupos apenas com GC (Cox-2^{+/+}: GC= 3,520 ± 0,276; CG+FC= 0,620 ± 279; p<0,0001; t=7,384 df=8; Cox-2^{-/-}:CG= 6,226 ± 0,586; CG+FC= 1,478 ± 0,303; p<0,0001; t=7,192 df=8).

Adicionalmente, confirmamos a participação da isoenzima COX-1 na hiperalgesia inflamatória induzida por CG na ausência de COX-2 em neutrófilos usando VS, um inibidor específico da COX-1. A Figura 2B mostra a intensidade da hiperalgesia 3h após a injeção de GC+VS ou apenas GC. Nossos dados mostraram redução na intensidade da hiperalgesia no grupo Cox-2^{-/-} VS, mas não no grupo Cox-2^{+/+} quando comparado ao que recebeu apenas GC, apesar do VS ter aumentado estatisticamente a hiperalgesia em Cox-2^{+/+} com valor não biológico (Cox-2^{+/+}: CG= 3,682±0,175; CG+VS = 4,620±0,324; p<0,05; t=2,545; df=8; Cox-2^{-/-}: CG= 4,474±0,409; VS= 2,594±0,284 ; p<0,01; t=3,771; df=8). Assim, esses achados revelaram a importância dos neutrófilos na hiperalgesia inflamatória mesmo na ausência de COX-2 derivada destas células, além disso, ao menos em parte, a COX-1 pode estar mediando a hiperalgesia em camundongos Cox-2^{-/-}.

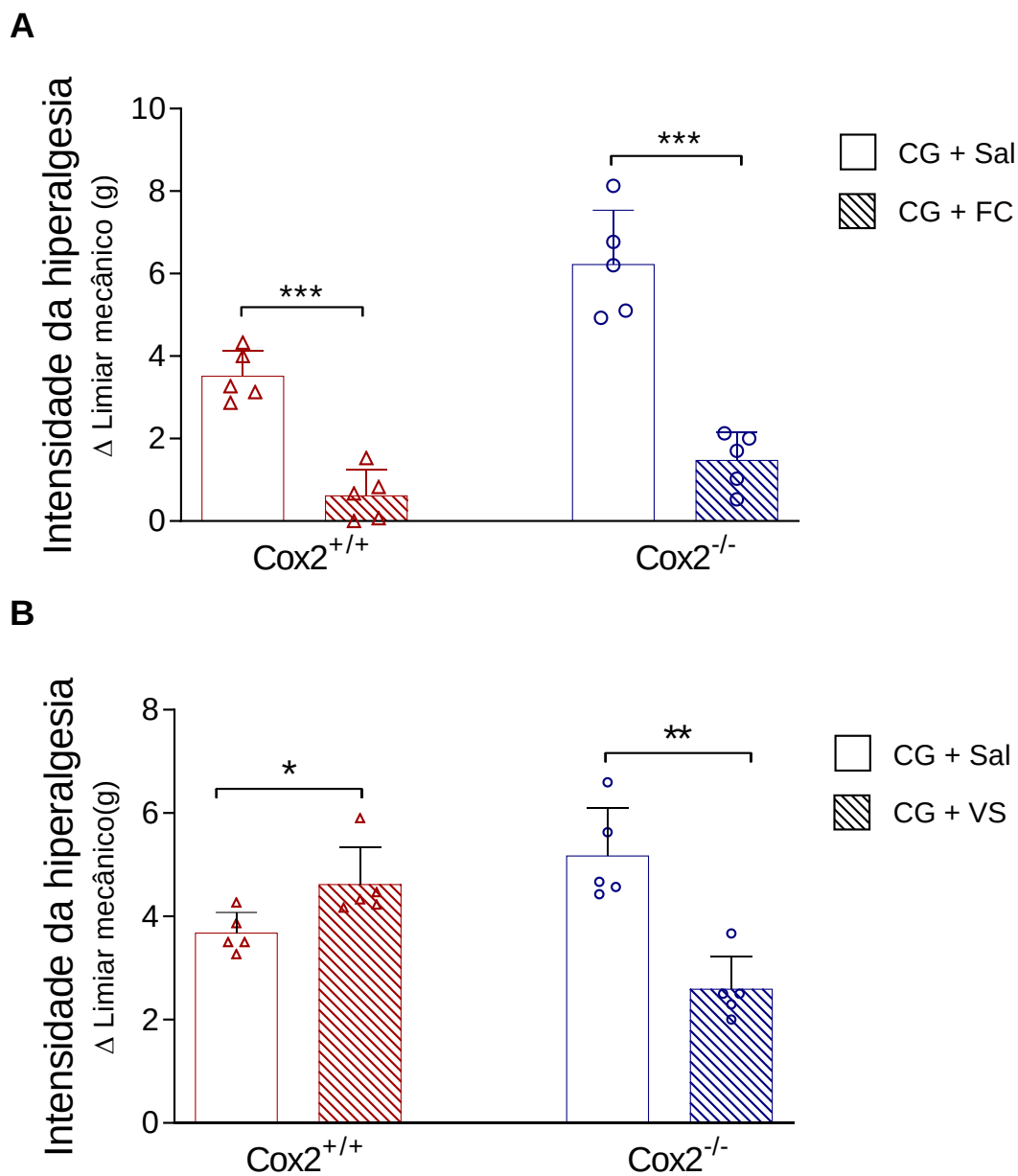


Figura 9. Intensidade da hiperalgesia após GC+FC e GC+VS.(A) Mostra a intensidade da hiperalgesia 3h após injeção de carragenina (GC) e fucoidan (FC) ou GC e Salina (Sal) para ambos os grupos (N=5 por grupo; *** $p \leq 0,001$). (B) Mostra a intensidade da hiperalgesia 3h após GC e Valeril Salicilato (VS) ou GC e Sal para ambos os grupos (N=5 por grupo; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$).

5.3. Camundongos Cox-2^{-/-} apresentam superexpressão de cox-1 e citocinas pró-inflamatórias e expressão não detectada de cox-2 no tecido após injeção de CG.

A Figura 3A mostra a expressão de mRNA de cox-1 e cox-2 no tecido da pata traseira de camundongos Cox-2^{+/+} e Cox-2^{-/-} após injeção de CG ou Salina. Nossos dados não mostram diferença ($p = 0,2589$) na expressão de cox-1 e diferença estatística ($p < 0,0001$) na expressão de cox-2 entre salina e CG em camundongos Cox-2^{+/+} (cox-1: Salina= $1,024 \pm 0,1159$; GC= $1,334 \pm 0,2272$; $t=1,215$ df=8; cox-2: Salina= $1,042 \pm 0,1578$; GC= $6,600 \pm 0,6714$; $t=8,059$ df=8). Para camundongos Cox-2^{-/-} nossos dados mostram superexpressão ($p = 0,0067$) de cox-1 após injeção de CG quando comparado ao grupo Salina (cox-1: Salina= $1,011 \pm 0,06853$; CG= $1,467 \pm 0,1172$; $t=3,505$ df= 9). Importante mencionar que a expressão de cox-2 (após injeção de Salina e CG) para camundongos Cox-2^{-/-} não foi detectada na reação de PCR em tempo real em 40 ciclos realizados, confirmando a deleção genética da transcrição de COX-2 (cox-2: Salina= $0,01797 \pm 0,01370$; CG= $0,04942 \pm 0,02903$; $t=0,9800$ df=8; $p = 0,3558$).

A Figura 3B-E mostra o nível de citocinas liberadas após injeção de CG ou Salina na pata traseira de camundongos Cox-2^{+/+} e Cox-2^{-/-}. A Figura 3B mostra os níveis de CXCL-1 para ambos os grupos. A análise ANOVA one-way mostrou diferenças significativas entre os grupos ($F_{3,20} = 27,83$; $p \leq 0,0001$). O teste de comparação múltipla post hoc de Tukey revelou diferenças estatísticas entre Cox-2^{+/+} Salina e Cox-2^{+/+} CG ($p \leq 0,01$); também, há diferenças estatísticas entre Cox-2^{+/+} e Cox-2^{-/-} CG ($p \leq 0,001$), e entre Cox-2^{-/-} Salina e Cox-2^{-/-} CG ($p \leq 0,001$) (Cox-2^{+/+}: Salina= $14,18 \pm 2,268$ mg/mL; GC= $79,91 \pm 11,98$ mg/mL; Cox-2^{-/-}: Salina= $46,48 \pm 8,081$ mg/mL; GC= $162,3 \pm 19,19$ mg/mL). A Figura 3C mostra o nível de IL-1 β para ambos os grupos. A análise ANOVA one-way mostrou diferenças significativas entre os grupos ($F_{3,15} = 71,30$; $p \leq 0,0001$). O

teste post hoc de comparação múltipla de Tukey revelou diferenças estatísticas entre Cox-2^{+/+} Salina e Cox-2^{+/+} GC ($p \leq 0,05$); também, há diferenças estatísticas entre Cox-2^{+/+} e Cox-2^{-/-} CG ($p \leq 0,001$), e entre Cox-2^{-/-} Salina e Cox-2^{-/-} CG ($p \leq 0,001$) (Cox-2^{+/+}: Salina= $517,2 \pm 105,3$ mg/mL; GC= $1773,00 \pm 332,6$ mg/mL; Cox-2^{-/-}: Salina= $355,0 \pm 92,33$ mg/mL; GC= $5532,0 \pm 469,4$ mg/mL). A Figura 3D mostra o nível de TNF- α para ambos os grupos. A análise ANOVA de uma via não mostrou diferenças significativas entre os grupos ($F_{3, 20} = 1,744$; $p \leq 0,1904$) (Cox-2^{+/+}: Salina= $25,61 \pm 4,405$ mg/mL; GC= $16,82 \pm 3,328$ mg/mL; Cox-2^{-/-}: Salina= $32,34 \pm 6,803$ mg/mL; GC= $23,72 \pm 4,088$ mg/mL). A Figura 3E mostra o nível de liberação de IL-10 para ambos os grupos. A análise ANOVA one-way mostrou diferenças significativas entre os grupos ($F_{3, 16} = 3,053$; $p \leq 0,05$). O teste de comparação múltipla post hoc de Tukey revelou diferenças estatísticas entre Cox-2^{+/+} Salina e Cox-2^{+/+} CG ($p \leq 0,05$) (Cox-2^{+/+}: Salina= $0,1210 \pm 0,0115$ mg/mL; CG= $0,0835 \pm 0,01619$ mg/mL; Cox-2^{-/-}: Salina= $0,0970 \pm 0,0159$ mg/mL; CG= $0,0595 \pm 0,01465$ mg/mL).

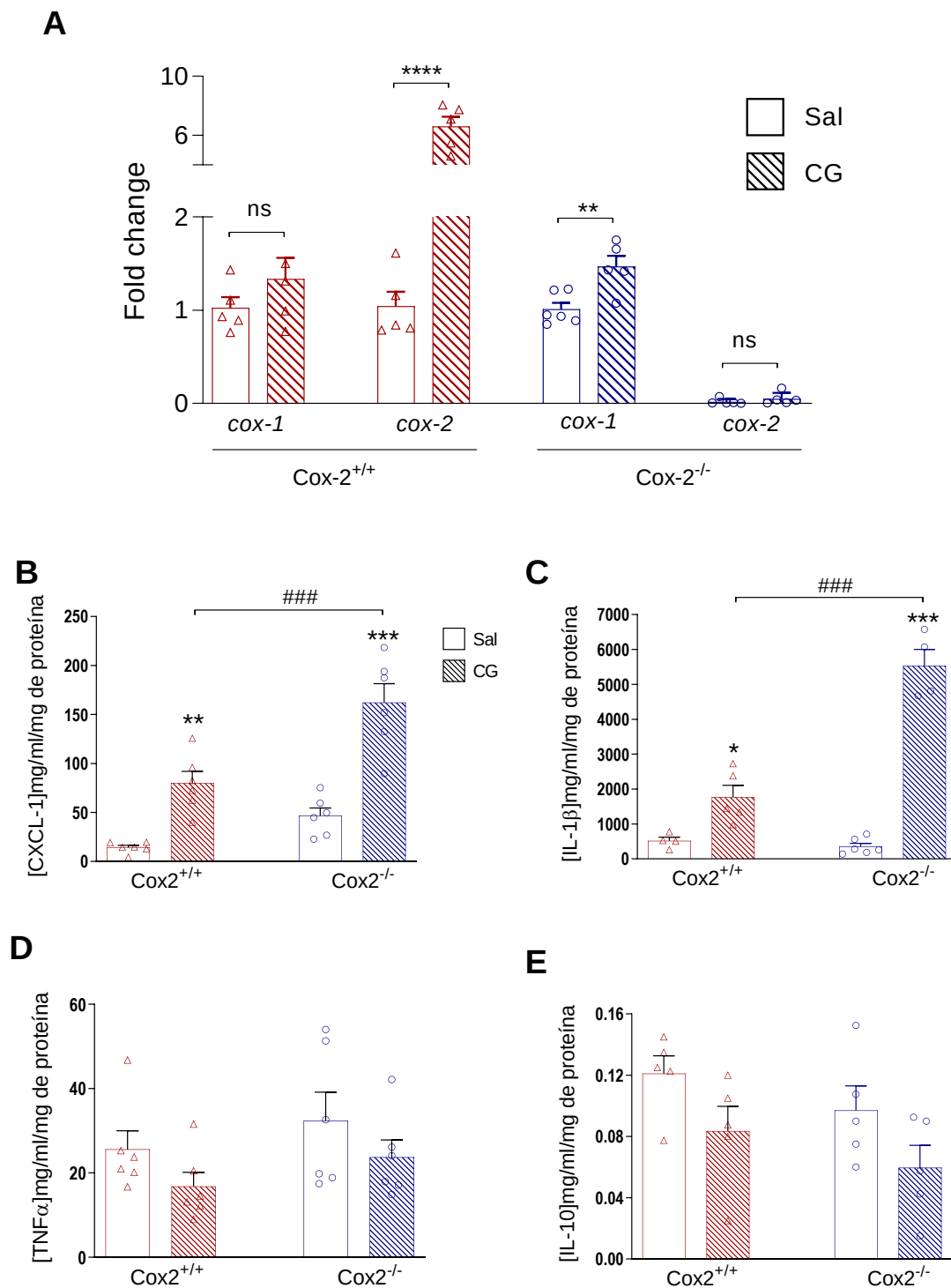


Figura 10. Resposta inflamatória induzida por CG. (A) mostra a expressão de mRNA de *cox-1* e *cox-2* (mudança de vezes usando veículo (Veh) como padrão) no tecido da pata traseira para ambos os grupos após 3h de injeção de CG ou Veh. (B), (C), (D) e (E) mostra o nível de Cinc-1, IL-1β, TNFα e IL-10, respectivamente, liberados após 3h de estímulo de CG na pata para ambos os grupos (N= 6 por grupo). O símbolo (*) indica diferença estatística quando comparado aos intragrupos. O símbolo (#) indica diferença estatística comparando entre os grupos. (N=5-6 por grupo; *p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01, ***p ≤ 0,001, ###p ≤ 0,001).

5.4. Camundongos Cox-2^{-/-} apresentam aumento na migração neutrofílica e após inflamação induzida por CG quando comparados aos Camundongos Cox-2^{+/+}

A Figura 4 mostra a porcentagem peritoneal de neutrófilos Ly6G⁺CD11b⁺, macrófagos CD11b⁺F4/80⁺ e células dendríticas CD11b⁺CD11c⁺ no compartimento, bem como os níveis de MPO para cada grupo após injeção de CG ou Salina. A Figura 4A mostra a quantidade de MPO no tecido da pata traseira após injeção de CG ou Salina. Nossos dados mostraram aumento do MPO em ambos os grupos após a injeção de CG quando comparados ao grupo Salina ($p \leq 0,001$; $t=4,586$ $df=8$ $et=7,341$ $df=7$). Também demonstramos que camundongos Cox-2^{-/-} apresentaram maior aumento de MPO induzido por CG ($p \leq 0,001$; $t=4,604$ $df=8$) quando comparados a camundongos Cox-2^{+/+} (cox-2^{+/+}: Salina= $2,294 \pm 0,2791U$; CG= $4,432 \pm 0,3734U$; cox-2^{-/-}: Salina= $2,050 \pm 0,1949U$; CG= $8,158 \pm 0,7181U$). A Figura 4B mostra os gráficos da citometria de fluxo representando as células imunes no lavado peritoneal após administração da CG ou Salina. A Figura 4C mostra a porcentagem de neutrófilos no lavado peritoneal após CG ou Salina para ambos os grupos. Nossos dados mostraram que camundongos Cox-2^{+/+} ($p \leq 0,01$; $t=3,630$ $df=15$) e Cox-2^{-/-} ($p \leq 0,01$; $t=3,229$ $df=15$) apresentaram maior infiltrado de neutrófilos após a injeção de CG quando comparado com Salina (Cox-2^{+/+}: Salina= $13,16 \pm 3,571$; CG= $18,74 \pm 1,689$; cox-2^{-/-}: Salina= $23,80 \pm 1,554$; CG= $34,28 \pm 4,305$). Também demonstramos que camundongos Cox-2^{-/-} exibem maior infiltrado de neutrófilos após estímulo Salina ($p \leq 0,01$; $t=3,722$ $df=14$) e GC ($p \leq 0,001$; $t=4,545$ $df=16$) quando comparado ao grupo Cox-2^{+/+}. A Figura 4D mostra a porcentagem de macrófagos no lavado peritoneal após CG ou Salina para ambos os grupos. Nossos dados não mostraram diferença entre os grupos (Cox-2^{+/+}: Salina= $10,32 \pm 1,318$; GC= $12,76 \pm 2,276$; cox-2^{-/-}: Salina= $8,852 \pm 1,778$; GC= $10,33 \pm 2,407$). A Figura 4E

mostra a porcentagem de células dendríticas no lavado peritoneal após CG ou Salina para ambos os grupos. Nossos dados não mostraram diferença entre os grupos (Cox-2^{+/+}: Salina= 3,356±0,9916; GC= 2,934±0,2718; Cox-2^{-/-}: Salina= 2,512±0,2366; GC= 2,414 ±0,2163).

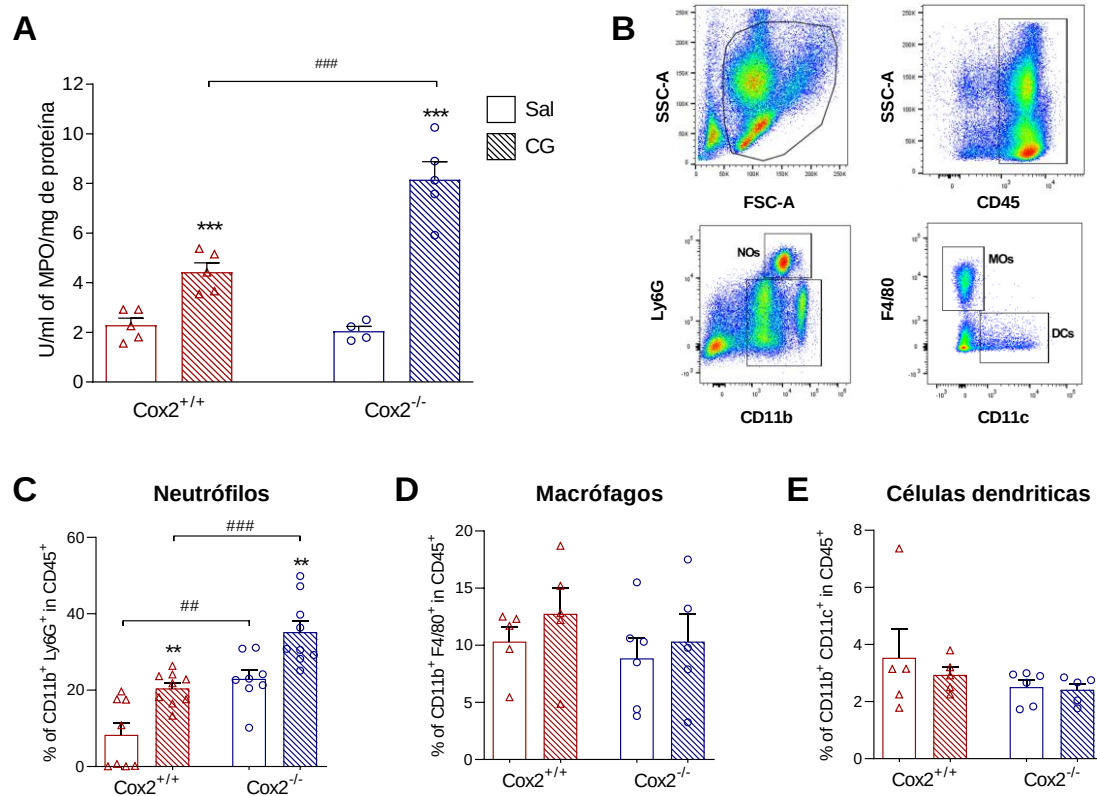


Figura 11. Quantificação da migração celular após injeção de CG. (A) mostra a quantificação de mieloperoxidase (MPO) na pata traseira após 3h CG ou Salina. (B) Mostra os gráficos de pontos de citometria de fluxo representativos de neutrófilo Ly6G+CD11b+, macrófago CD11b+F4/80+ e células dendríticas CD11b+CD11c+ no compartimento peritoneal após CG ou Salina. (C), (D) e (E) mostram a porcentagem de neutrófilos, macrófagos e células dendríticas, respectivamente, no lavado peritoneal após CG ou Salina para ambos os grupos. O símbolo (*) indica diferença estatística quando comparado intragrupos. O símbolo (#) indica diferença estatística comparando entre os grupos. (**p≤0,01; ***p≤0,001; #p≤0,05 e ###p≤0,001).

5.5. Neutrófilos Cox-2^{-/-} mostram superexpressão de cox-1, redução nos níveis de citocinas pró-inflamatórias e expressão não detectada de cox-2 após estímulo com LPS *in vitro*.

Considerando a hiperalgesia como um importante parâmetro inflamatório, complementamos esses resultados anteriores usando neutrófilos estimulados por LPS *in vitro* com o objetivo de mimetizar um ambiente inflamatório, avaliando o perfil de liberação de citocinas e a expressão de Cox dessas células. A Figura 5B mostra a expressão de mRNA de cox-1 e cox-2 em cultura de neutrófilos Cox-2^{+/+} e Cox-2^{-/-} após estímulo com LPS. Nossos dados mostraram que neutrófilos Cox-2^{-/-} exibe superexpressão de cox-1 quando comparado as células Cox-2^{+/+} ($p \leq 0,001$; $t = 13,45$ $df = 8$) e, como esperado, expressão não detectada de cox-2 (cox-2^{+/+}: Cox 1= $1,001 \pm 0,0212$; Cox 2= $1,017 \pm 0,0894$; cox-2^{-/-}: Cox 1= $2,092 \pm 0,0783$; Cox 2= $0,01191 \pm 0,0005$). Esses dados, corroboram com os resultados *in vivo* confirmando nosso modelo de neutrófilos Knockout para Cox-2 e evidenciando um possível aumento compensatório da cox-1 nessas células.

A Figura 5C-F mostra o nível de citocinas liberadas após estímulo de LPS pelos neutrófilos Cox-2^{+/+} e Cox-2^{-/-} *in vitro*. A Figura 5C mostra os níveis de CXCL-1 liberado após o estímulo de LPS para ambos os grupos. Nossos dados mostraram que os neutrófilos Cox-2^{-/-} liberam menos CXCL-1 quando comparados aos neutrófilos Cox-2^{+/+} ($p \leq 0,001$; $t = 7,568$ $df = 11$; Cox-2^{+/+}= $0,5547 \pm 0,01092$ mg/mL; Cox-2^{-/-}= $0,3379 \pm 0,02468$ mg/mL). A Figura 5D mostra a IL-1 β liberada após estímulo de LPS para ambos os grupos. Nossos dados mostraram que os neutrófilos Cox-2^{-/-} liberaram menos IL-1 β quando comparados aos neutrófilos Cox-2^{+/+} ($p \leq 0,001$; $t = 11,67$ $df = 10$; Cox-2^{+/+}= $0,4023 \pm 0,02487$ mg/mL; Cox-2^{-/-}= $0,09442 \pm 0,00878$ mg/mL). A Figura 5E mostra o Tnf- α liberado após estímulo LPS para ambos os grupos. Nossos dados mostraram que os neutrófilos Cox-2^{-/-} liberam menos Tnf- α quando comparados

aos neutrófilos Cox-2^{+/+} ($p \leq 0,01$; $t=3,638$ $df=10$; Cox-2^{+/+} = $0,7843 \pm 0,02088$ mg/mL; Cox-2^{-/-} = $0,6134 \pm 0,04206$ mg/mL). A Figura 5F mostra o nível de liberação de IL-10 após estímulo LPS para ambos os grupos. Nossos dados não mostraram diferença entre os grupos (Cox-2^{+/+} = $0,3220 \pm 0,01732$ mg/mL; Cox-2^{-/-} = $0,2849 \pm 0,03096$ mg/mL).

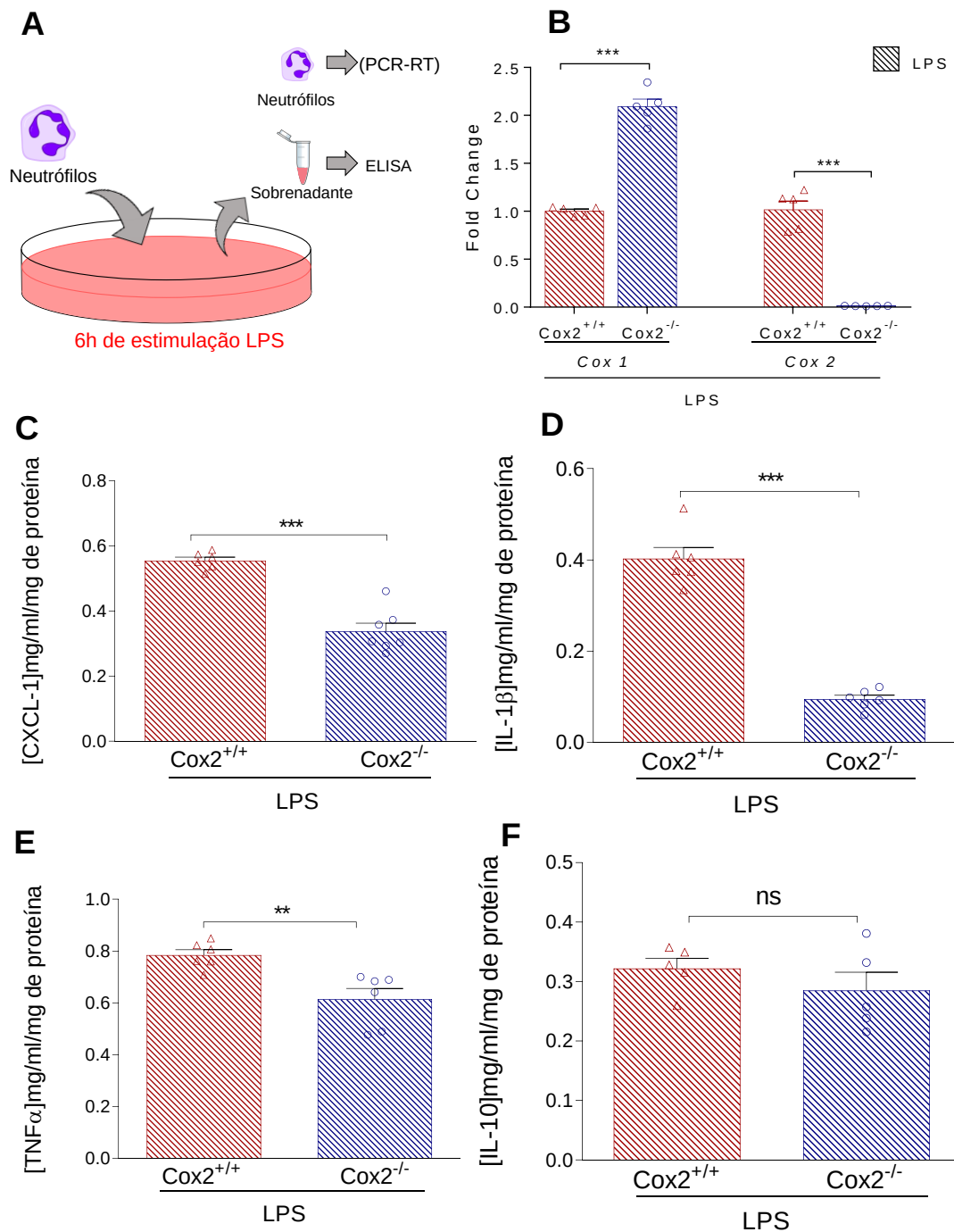


Figura 12. Neutr3filos estimulados por LPS in vitro. (A) mostra o gr3fico experimental. (B) mostra a express3o de mRNA de *cox-1* e *cox-2* para ambos os grupos. (C), (D), (E) e (F) mostram o n3vel de CXCL-1, IL-1β, TNFα e IL-10, respectivamente, liberados ap3s est3mulo de LPS por neutr3filos para ambos os grupos (N=5 por grupo; **p≤0,01; ***p≤0,001; ns = sem signific3ncia).

6. DISCUSSÃO

Aqui nós fornecemos a evidência de que a deleção genética de COX-2 em neutrófilos promoveu um aumento na liberação de IL-1 β e CXCL-1 e migração de neutrófilos, além de uma superexpressão de Cox-1 no tecido inflamado, resultando na intensificação da hiperalgesia.

As expressões constitutiva de COX-1 e indutiva de COX-2 apresentam papel essencial na produção de prostaglandinas com importantes funções tanto na homeostase quanto nos processos inflamatórios (BALLOU et al., 2000; RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011). A síntese de COX-2 é desencadeada principalmente por estímulos pró-inflamatórios e sua inibição tem sido descrita como relevante ferramenta farmacológica na dor (CAMU; SHI; VANLERSBERGHE, 2003). Nesse contexto, as primeiras células a migrarem para o local inflamado são as células neutrofílicas (NOURSHARGH; ALON, 2014). Essas células desempenham funções importantes relacionadas a resolução inflamatória através de fagocitose, liberação de enzimas e espécies reativas do oxigênio. Além disso, também desempenham papel crucial na biossíntese de eicosanoides através da ação da COX-2, sendo fonte de citocinas e quimiocinas (EDWARDS, 1994; ST-ONGE et al., 2007). No presente estudo demonstramos a importância da COX-2 derivada de neutrófilos na hiperalgesia inflamatória.

Nossos resultados mostraram, para ambos os sexos, maior hiperalgesia mecânica induzida por CG em camundongos Cox-2^{-/-} quando comparados com os Cox-2^{+/+}. O modelo de hiperalgesia inflamatória induzida por CG já é estabelecido como um dos testes padrão "ouro" e foi inicialmente introduzido por WINTER e colaboradores em 1962. A GC induz inflamação aguda e localizada,

que envolve a participação das células residentes e migratórias (macrófagos e neutrófilos), além de mediadores inflamatórios (PG, citocinas e quimiocinas) (CORUZZI et al., 2007; LORAM et al., 2007). Além disso, a hiperalgesia induzida por CG é dependente de COX, como evidenciado pelo fato da indometacina, um inibidor inespecífico de COX, inibir esse efeito pró-nociceptivo (CUNHA; VERRI, 2006). Além disso, vale ressaltar que a COX-1 é descrita principalmente como uma isoforma constitutiva, regulando vários processos fisiológicos (KIRKBY et al., 2012). Por outro lado, a COX-2 é definida como uma isoforma induzível, sintetizando prostanóides após estímulo inflamatório (RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011).

Adicionalmente, a IL-1 β é uma importante molécula derivada da via da CG e está intimamente associada à hiperalgesia inflamatória (LORAM et al., 2007). Assim, de forma complementar, demonstramos que camundongos Cox-2^{-/-} apresentaram hiperalgesia mecânica de longa duração após a injeção de IL-1 β quando comparados aos Cox-2^{+/+}. Estes primeiros resultados nos levaram a questionar quais fatores estariam relacionados à hiperalgesia mais intensa induzida por CG em camundongos Cox-2^{-/-}.

Usando o fucoidan (FC), um inibidor da migração leucocitária (LEY et al., 1993), demonstramos a participação de neutrófilos na hiperalgesia induzida por CG nos camundongos Cox-2^{-/-}. Nossos dados mostraram que o pré-tratamento com fucoidan reduziu significativamente a hiperalgesia tanto nos animais Cox-2^{+/+} como nos Cox-2^{-/-}. De fato, já é estabelecido que o influxo de células neutrofílicas para o sítio inflamado é um dos principais eventos relacionados à inflamação aguda (NAUSEEF; BORREGAARD, 2014). Também, já é bem caracterizado os neutrófilos como os principais leucócitos no sítio inflamatório

três horas após a administração de CG, descrita como fase aguda (MIZOKAMI et al., 2016). De forma complementar, durante a fase aguda da inflamação, ocorre aumento da expressão de COX-2 nos neutrófilos, seguido pela produção de PGE₂, um dos principais responsáveis pela sensibilização dos nociceptores e, conseqüentemente, pela hiperalgesia (MALONEY et al., 1998).

No presente estudo usando o valeril salicilato (VS), um inibidor específico de COX-1 (BHATTACHARYYA et al., 1995), também avaliamos o possível envolvimento da isoenzima na hiperalgesia induzida por CG em camundongos Cox-2^{-/-}. Nossos dados demonstraram que o pré-tratamento com VS não alterou a intensidade da hiperalgesia em camundongos Cox-2^{+/+}. No entanto, curiosamente, observamos uma redução da hiperalgesia em camundongos COX-2^{-/-}, atestando que, pelo menos em parte, a COX-1 pode estar mediando a hiperalgesia nesses animais. De fato, não foi uma surpresa não observar nenhum efeito na intensidade da hiperalgesia após a inibição da COX-1 em camundongos Cox-2^{+/+}, dado o papel bem estabelecido da COX-2 na hiperalgesia inflamatória (GANDHI et al., 2017) e da COX-1 como isoenzima constitutiva expressa na maioria dos tecidos, sendo seus derivados associados a importantes funções homeostáticas (SMITH; DEWITT; GARAVITO, 2000). No entanto, a possível compensação de COX-1 em consequência da ausência de COX-2 em neutrófilos foi um resultado surpreendente. Dessa forma, apesar de bem estabelecidas as funções homeostáticas da COX-1, nossos resultados passam a corroborar com estudos prévios demonstrando que essa isoforma pode vir contribuir para a resposta inflamatória (ISLAM et al., 2016; LANGENBACH et al., 1999; WALLACE et al., 1998).

Seguindo nosso estudo e com base em nossos resultados sobre as diferentes respostas à estimulação inflamatória com CG em camundongos *Cox-2^{+/+}* e *Cox-2^{-/-}* e a fim de validar nosso modelo knockout, comparamos os níveis de expressão de *Cox-1* e *Cox-2* para ambos os grupos que receberam CG na pata traseira. Como esperado, o gene *Cox-2* foi regulado positivamente durante a inflamação em camundongos *Cox-2^{+/+}* sem alterações significativas nos níveis basais de expressão de *Cox-1*. No entanto, de forma contrária, camundongos *Cox-2^{-/-}* mostraram uma regulação positiva significativa de *Cox-1*, enquanto os níveis de *Cox-2* foram quase indetectáveis pelo método empregado. De fato, a indução da regulação positiva de *Cox-2* é padrão em várias condições patológicas e respostas a estímulos inflamatórios (por exemplo, citocinas) (BASU et al., 2017). Por outro lado, curiosamente, demonstramos que a falta de COX-2 em neutrófilos desencadeia um aumento significativo nos níveis de COX-1 após estimulação com CG. Nossos dados corroboram com trabalhos prévios (ISLAM et al., 2016; ZHANG et al., 2002), onde é demonstrado que a expressão de COX pode ser reprogramada para uma isoforma alternativa em camundongos knockout (ISLAM et al., 2016) e células (ZHANG et al., 2002). Além disso, dados da literatura sugerem um papel colaborativo de COX-1 e COX-2 durante a inflamação (WALLACE et al., 1998). Esses resultados podem corroborar a nossa hipótese de que a hiperalgesia apresentada pelos animais *COX-2^{-/-}*, estaria sendo, ao menos em parte, mediada pela ação compensatória de prostanóides sintetizados pela COX-1, assim, consideramos simplista a visão de que apenas a COX-2 pode ser induzida e contribuir para processos inflamatórios.

Como já descrito (ANNAMALAI; THANGAM, 2017), a injeção local de CG evoca a produção de citocinas pró-inflamatórias. No entanto, curiosamente,

observamos uma regulação significativamente maior de IL-1 β e CXCL-1 em camundongos Cox-2^{-/-} em comparação com os Cox-2^{+/+}. De fato, esse perfil de resposta exacerbado já foi descrito em camundongos Cox-1^{-/-} ou Cox-2^{-/-} e células isoladas (fibroblastos) (BALLOU, 2002; ISLAM et al., 2016; ZHANG et al., 2002). Essa resposta exacerbada em outros trabalhos inclui aumento de eicosanóides e espécies reativas do oxigênio e corroborando nossos dados, essa resposta exacerbada em camundongos Cox-2^{-/-} também é caracterizada pelo aumento na liberação de citocinas pró-inflamatórias (BALLOU, 2002; ISLAM et al., 2016; ZHANG et al., 2002). Enquanto a IL-1 β é um dos estímulos primários para a expressão de COX-2 durante a inflamação (NEEB et al., 2011; SAMAD et al., 2001), a CXCL-1 desempenha um papel crucial na quimioatração de neutrófilos durante a fase aguda (CAO et al., 2014; LORAM et al., 2007).

Neste contexto, o aumento pronunciado de CXCL-1 em animais Cox-2^{-/-} em comparação com camundongos Cox-2^{+/+} pode justificar o perfil exacerbado na migração de neutrófilos em camundongos Cox-2^{-/-} evidenciado pela mensuração de MPO e na citometria de fluxo. Diante dos dados, é plausível correlacionar o aumento da migração de neutrófilos ao aumento de citocinas no tecido inflamado de camundongos Cox-2^{-/-}. No entanto, ensaios *in vitro* com neutrófilos isolados estimulados Cox-2^{-/-} mostraram um padrão significativamente menor na liberação de IL-1 β e CXCL-1 em comparação com Cox-2^{+/+}. Esse resultado nos levou a questionar quais células estariam interagindo com neutrófilos no sítio inflamatório e, portanto, relacionadas ao aumento de citocinas no tecido.

Conforme descrito anteriormente e corroborando a análise de MPO, na citometria de fluxo observamos um aumento significativo de células neutrofílicas no pico da ação aguda da CG, sem diferença significativa na quantidade de

macrófagos e células dendríticas. De fato, os neutrófilos são predominantes nos estágios iniciais da inflamação, geralmente precedendo o recrutamento de macrófagos derivados de monócitos (BUTTERFIELD; BEST; MERRICK, 2006). Embora tenhamos observado uma diminuição da liberação de citocinas em neutrófilos isolados Cox-2^{-/-}, por outro lado, o aumento significativo dessas células no tecido pode explicar o aumento de mediadores inflamatórios observado em camundongos Cox-2^{-/-}. Este efeito poderia, por sua vez, ser mediado pela compensação de COX-1 observada em camundongos Cox-2^{-/-}. Por outro lado, pelo menos em parte, o aumento de citocinas no tecido também poderia estar sendo mediado por células residentes (macrófagos) (ARALDI et al., 2013). Assim, considerando os resultados contrastantes em modelos *in vitro* e *in vivo*, nossos achados também destacam requisitos diferentes para atividade inflamatória isolada de células em comparação com o ambiente tecidual. Desta forma, o modelo isolado de células pode ser limitado pela falta de modulação e interação celular que está presente no tecido, essencial na regulação e manutenção de processos inflamatórios (SUGIMOTO MA, SOUSA LP, PINHO V, PERRETTI M, 2016). Além disso, a diminuição das citocinas liberadas pelo neutrófilo Cox-2^{-/-}, observada no modelo *in vitro*, pode sinalizar e desencadear a migração exacerbada de neutrófilos observadas no tecido de forma compensatória, levando ao também observado aumento de citocinas na região.

7. CONCLUSÃO

Em resumo, nossos dados sugerem que a ausência de COX-2 nas células neutrofílicas leva a um perfil exacerbado na intensidade da hiperalgesia e dos mediadores inflamatórios induzidos pela CG (figura 13). É plausível supor que uma ação compensatória da COX-1 medeia esse efeito. Por fim, nossos dados mostraram que essa exacerbação inflamatória está associada a um aumento de mediadores inflamatórios (IL-1 β e CXCL-1) e migração de neutrófilos, embora estas células *Cox-2^{-/-}* liberem menos mediadores inflamatórios *in vitro*. Considerando a superexpressão de COX-1 acima mencionada em camundongos *Cox-2^{-/-}*, consideramos também plausível sugerir este modelo para estudar os efeitos da COX-1 e as sinalizações relacionadas a via. De fato, ressaltamos que compreender o papel das isoformas da COX nos processos inflamatórios é essencial para aprimorar e desenvolver novas terapias direcionadas às suas vias de sinalização.

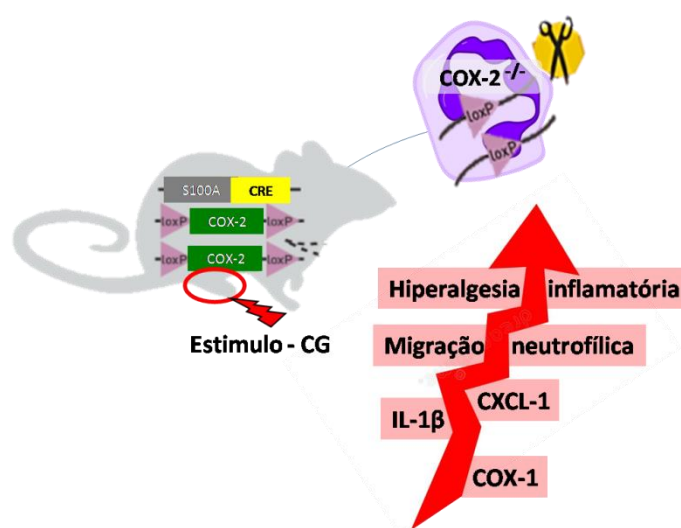


Figura 13. Representação gráfica dos principais resultados obtidos na tese.

8. REFERENCIAS

ABD-ELSAIED, Alaa; DEER, Timothy R. Different Types of Pain. **Pain**, [S. l.], p. 15–16, 2019. DOI: 10.1007/978-3-319-99124-5_3.

ANNAMALAI, Parvathi; THANGAM, Elden Berla. Local and Systemic Profiles of Inflammatory Cytokines in Carrageenan-induced Paw Inflammation in Rats. **Immunological Investigations**, [S. l.], v. 46, n. 3, p. 274–283, 2017. DOI: 10.1080/08820139.2016.1248562. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/08820139.2016.1248562>.

ARALDI, Dionéia et al. Peripheral inflammatory hyperalgesia depends on the COX increase in the dorsal root ganglion. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 110, n. 9, p. 3603–3608, 2013. DOI: 10.1073/pnas.1220668110.

ASHLEY, Noah T.; WEIL, Zachary M.; NELSON, Randy J. Inflammation: Mechanisms, costs, and natural variation. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, [S. l.], v. 43, n. August, p. 385–406, 2012. DOI: 10.1146/annurev-ecolsys-040212-092530.

BALLOU, L. R.; BOTTING, R. M.; GOORHA, S.; ZHANG, J.; VANE, J. R. Nociception in cyclooxygenase isozyme-deficient mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S. l.], v. 97, n. 18, p. 10272–10276, 2000. DOI: 10.1073/pnas.180319297. Disponível em: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.180319297>.

BALLOU, Leslie R. The Regulation of Cyclooxygenase-1 and -2 in Knockout Cells and Mice. In: **Angewandte Chemie International Edition**, 6(11), 951–952. [s.l.: s.n.]. v. 59p. 585–591. DOI: 10.1007/978-1-4615-0193-0_89. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4615-0193-0_89.

BASU, Anandita; DAS, Anindhya Sundar; SHARMA, Manoj; PATHAK, Manash Pratim; CHATTOPADHYAY, Pronobesh; BISWAS, Kaushik; MUKHOPADHYAY, Rupak. STAT3 and NF-κB are common targets for kaempferol-mediated attenuation of COX-2 expression in IL-6-induced macrophages and carrageenan-induced mouse paw edema. **Biochemistry and Biophysics Reports**, [S. l.], v. 12, p. 54–61, 2017. DOI: 10.1016/j.bbrep.2017.08.005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.08.005>.

BENNETT, G.; AL-RASHED, S.; HOULT, J. R. S.; BRAIN, S. D. Nerve growth factor induced hyperalgesia in the rat hind paw is dependent on circulating neutrophils. **Pain**, [S. l.], v. 77, n. 3, p. 315–322, 1998. DOI: 10.1016/S0304-3959(98)00114-6.

BEREITER, D. A.; HARGREAVES, K. M.; HU, J. W. Trigeminal Mechanisms of Nociception: Peripheral and Brainstem Organization. In: **The Senses: A Comprehensive Reference**. [s.l.] : Elsevier, 2008. p. 435–460. DOI: 10.1016/B978-012370880-9.00174-2. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123708809001742>.

BHATTACHARYYA, Dipak K.; LECOMTE, Marc; DUNN, James; MORGANS,

David J.; SMITH, William L. **Selective inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase-1 (Cyclooxygenase-1) by valerylsalicylic acid** *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1995. DOI: 10.1006/abbi.1995.1130.

BONICA, John J. Importance of effective pain control. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*, [S. l.], v. 31, p. 1–16, 1987. DOI: 10.1111/j.1399-6576.1987.tb02665.x.

BOS, Carina L.; RICHEL, Dick J.; RITSEMA, Tita; PEPPELENBOSCH, Maikel P.; VERSTEEG, Henri H. Prostanoids and prostanoid receptors in signal transduction. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, [S. l.], v. 36, n. 7, p. 1187–1205, 2004. DOI: 10.1016/j.biocel.2003.08.006.

BROOKS, Peter. Use and benefits of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *American Journal of Medicine*, [S. l.], v. 104, n. 3 A, p. 9–13, 1998. DOI: 10.1016/S0002-9343(97)00204-0.

BURGESS, P. R. E. R. Perl. Myelinated afferent fibres responding specifically to noxious stimulation of the skin. [S. l.], p. 831–846, 1967.

BURIAN, Maria; GEISLINGER, Gerd. COX-dependent mechanisms involved in the antinociceptive action of NSAIDs at central and peripheral sites. *Pharmacology and Therapeutics*, [S. l.], v. 107, n. 2, p. 139–154, 2005. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2005.02.004.

BUTTERFIELD, Timothy A.; BEST, Thomas M.; MERRICK, Mark A. The Dual Roles of Neutrophils and Macrophages in Inflammation : A Damage and Repair. [S. l.], v. 41, n. 4, p. 457–465, 2006.

CAMU, Frederic; SHI, Lin; VANLERSBERGHE, Caroline. The role of COX-2 inhibitors in pain modulation. *Drugs*, [S. l.], v. 63, n. SUPPL. 1, p. 1–7, 2003. DOI: 10.2165/00003495-200363001-00002.

CAO, De-Li; ZHANG, Zhi-Jun; XIE, Rou-Gang; JIANG, Bao-Chun; JI, Ru-Rong; GAO, Yong-Jing. Chemokine CXCL1 enhances inflammatory pain and increases NMDA receptor activity and COX-2 expression in spinal cord neurons via activation of CXCR2. *Experimental Neurology*, [S. l.], v. 261, n. 1, p. 328–336, 2014. DOI: 10.1016/j.expneurol.2014.05.014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>.

CARVALHO, Nathalia S. et al. Gastroprotective properties of cashew gum, a complex heteropolysaccharide of *Anacardium occidentale*, in naproxen-induced gastrointestinal damage in rats. *Drug Development Research*, [S. l.], v. 76, n. 3, p. 143–151, 2015. DOI: 10.1002/ddr.21250.

CARVALHO, Nathalia S. et al. Protective Effects of Simvastatin Against Alendronate-Induced Gastric Mucosal Injury in Rats. *Digestive Diseases and Sciences*, [S. l.], v. 61, n. 2, p. 400–409, 2016. DOI: 10.1007/s10620-015-3890-7.

CASH, Jenna L.; WHITE, Gemma E.; GREAVES, David R. **Chapter 17 Zymosan-Induced Peritonitis as a Simple Experimental System for the**

Study of Inflammation. 1. ed. [s.l.] : Elsevier Inc., 2009. v. 461 DOI: 10.1016/S0076-6879(09)05417-2. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)05417-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(09)05417-2).

CASSATEUA, Marco Antonio. Neutrophil-derived proteins: selling cytokines by the pound. **Advances in Immunology**, [S. l.], v. 73, n. 73, p. 369–509, 1999. DOI: 10.1016/s0065-2776(08)60791-9.

CHEN, Lihong. Current trends in PGE2 targeting for anti-inflammatory therapy. **Pharmaceutical Bioprocess**, [S. l.], v. 4, n. 3, p. 48–49, 2016. Disponível em: <https://www.openaccessjournals.com/articles/current-trends-in-pge2-targeting-for-antiinflammatory-therapy.pdf>.

COBOS, Enrique J.; GHASEMLOU, Nader; ARALDI, Dionéia; SEGAL, David; DUONG, Kelly; WOOLF, Clifford J. Inflammation-induced decrease in voluntary wheel running in mice: A nonreflexive test for evaluating inflammatory pain and analgesia. **Pain**, [S. l.], v. 153, n. 4, p. 876–884, 2012. DOI: 10.1016/j.pain.2012.01.016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pain.2012.01.016>.

CORUZZI, Gabriella; ADAMI, Maristella; GUAITA, Elena; DE ESCH, Iwan J. P.; LEURS, Rob. Antiinflammatory and antinociceptive effects of the selective histamine H4-receptor antagonists JNJ7777120 and VUF6002 in a rat model of carrageenan-induced acute inflammation. **European Journal of Pharmacology**, [S. l.], v. 563, n. 1–3, p. 240–244, 2007. DOI: 10.1016/j.ejphar.2007.02.026.

CRISTOVAM, Marcos Antonio da Silva; GONÇALVES, Gentil Ferreira; TAKEMURA, Orlando Seiko; TOMASINI, Ana Paula Inoe; DRAGUNSKI, Douglas; REOLON, Joice; GOMES, Juliana Oliveira; MEGDA, William. Degranulação de neutrófilos ex-vivo por ação do polímero de amido de mandioca. **Ciência Rural**, [S. l.], v. 40, n. 5, p. 1103–1108, 2010. DOI: 10.1590/S0103-84782010005000075. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782010000500016&lng=pt&tlng=pt.

CRUVINEL, W. M.; JÚNIOR, Danilo Mesquita; ARAÚJO, Júlio Antônio Pereira; CATELAN, Tânia Tieko Takao; DE SOUZA, A. W. S.; DA SILVA, Neusa Pereira; ANDRADE, Luís Eduardo Coelho. Immune system - part I fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response. **Revista Brasileira de Reumatologia**, [S. l.], v. 50, n. 4, p. 443–461, 2010.

CUNHA, J. M.; CUNHA, F. Q.; POOLE, S.; FERREIRA, S. H. Cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-1 receptor antagonist. **British Journal of Pharmacology**, [S. l.], v. 130, n. 6, p. 1418–1424, 2000. DOI: 10.1038/sj.bjp.0703434.

CUNHA, T. M.; VERRI, W. A. Neutrophils: are they hyperalgesic or anti-hyperalgesic? **Journal of Leukocyte Biology**, [S. l.], v. 80, n. 4, p. 727–728, 2006. DOI: 10.1189/jlb.0406244. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1189/jlb.0406244>.

CUNHA, T. M.; VERRI, W. A.; SCHIVO, I. R.; NAPIMOGA, M. H.; PARADA, C. A.; POOLE, S.; TEIXEIRA, M. M.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception. **Journal of Leukocyte Biology**, [S. l.], v. 83, n. 4, p. 824–832, 2008. DOI: 10.1189/jlb.0907654.

CUNHA, T. M.; VERRI, W. A.; SILVA, J. S.; POOLE, S.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S. l.], v. 102, n. 5, p. 1755–1760, 2005. a. DOI: 10.1073/pnas.0409225102. Disponível em: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0409225102>.

CUNHA, T. M.; VERRI, W. A.; SILVA, J. S.; POOLE, S.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S. l.], v. 102, n. 5, p. 1755–1760, 2005. b. DOI: 10.1073/pnas.0409225102. Disponível em: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0409225102>.

DINARELLO, C. A. Biologic basis for interleukin-1 in disease. **Blood**, [S. l.], v. 87, n. 6, p. 2095–147, 1996. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8630372>.

DJOUHRI, Laiche; LAWSON, Sally N. A β -fiber nociceptive primary afferent neurons: A review of incidence and properties in relation to other afferent A-fiber neurons in mammals. **Brain Research Reviews**, [S. l.], v. 46, n. 2, p. 131–145, 2004. DOI: 10.1016/j.brainresrev.2004.07.015.

DOS SANTOS, Marlise A.; GRENHA, Ana. **Polysaccharide Nanoparticles for Protein and Peptide Delivery: Exploring Less-Known Materials**. 1. ed. [s.l.] : Elsevier Inc., 2015. v. 98 DOI: 10.1016/bs.apcsb.2014.11.003. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.apcsb.2014.11.003>.

DUBIN, A. E.; PATAPOUTIAN, A. Nociceptors : the sensors of the pain pathway Find the latest version : Review series Nociceptors : the sensors of the pain pathway. **Journal of Clinical Investigation**, [S. l.], v. 120, n. 11, p. 3760–3772, 2010. DOI: 10.1172/JCI42843.3760.

EDWARDS, Steven W. **Biochemistry and Physiology of the Neutrophil**. [s.l.] : Cambridge University Press, 1994. DOI: 10.1017/CBO9780511608421. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/product/identifier/9780511608421/type/book>.

FEHRENBACHER, Jill C.; VASKO, Michael R.; DUARTE, Djane B. Models of inflammation: Carrageenan- or unit 5.4 complete freund's adjuvant (CFA)-induced edema and hypersensitivity in the rat. **Current Protocols in Pharmacology**, [S. l.], n. SUPPL.56, p. 1–7, 2012. DOI: 10.1002/0471141755.ph0504s56.

FERREIRA, S. H. Prostaglandins, Aspirin-like Drugs and Analgesia. **Nature New Biology**, [S. l.], v. 240, n. 102, p. 200–203, 1972. DOI: 10.1038/newbio240200a0. Disponível em: B1.

FERREIRA, S. H. Inflammatory pain: The role of cytokines and its control by drugs which release nitric oxide. **Annali dell'Istituto Superiore di Sanita**, [S. l.], v. 29, n. 3, p. 367–373, 1993.

FERREIRA, S. H.; MONCADA, S.; VANE, J. R. Some effects of inhibiting endogenous prostaglandin formation on the responses of the cat spleen. **British Journal of Pharmacology**, [S. l.], v. 47, n. 1, p. 48–58, 1973. DOI: 10.1111/j.1476-5381.1973.tb08157.x.

FUJIKAWA, Megumi; IBUKI, Takae; MATSUMURA, Kiyoshi; SAWA, Teiji. Inflammatory hyperalgesia: The role of the prostaglandin system in the spinal cord. **Advances in Neuroimmune Biology**, [S. l.], v. 3, n. 2, p. 197–207, 2012. DOI: 10.3233/NIB-2012-012041.

GANDHI, Jaya; KHERA, Lohit; GAUR, Nivedita; PAUL, Catherine; KAUL, Rajeev. Role of modulator of inflammation cyclooxygenase-2 in gammaherpesvirus mediated tumorigenesis. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 8, n. MAR, p. 1–12, 2017. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00538.

GILROY, Derek W.; COLVILLE-NASH, P. R.; WILLIS, D.; CHIVERS, J.; PAUL-CLARK, M. J.; WILLOUGHBY, D. A. Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. **Nature Medicine**, [S. l.], v. 5, n. 6, p. 698–701, 1999. DOI: 10.1038/9550.

GREGORY R. POLSTON, Mark S. Wallace. Analgesic Agents in Rheumatic Disease. In: 9 (org.). **Kelley's Textbook of Rheumatology**. [s.l.: s.n.]. p. 1014–1033.

GUERRERO, Ana T. G. et al. Involvement of LTB 4 in zymosan-induced joint nociception in mice: participation of neutrophils and PGE 2 . **Journal of Leukocyte Biology**, [S. l.], v. 83, n. 1, p. 122–130, 2008. DOI: 10.1189/jlb.0207123.

HARJUNPÄÄ, Heidi; ASENS, Marc Llort; GUENTHER, Carla; FAGERHOLM, Susanna C. Cell adhesion molecules and their roles and regulation in the immune and tumor microenvironment. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 10, n. MAY, 2019. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01078.

HECK, U. Preemptive Analgesia: Physiology and Clinical Studies. In: **Essentials of Pain Medicine and Regional Anesthesia**. [s.l.] : Elsevier, 2005. p. 229–234. DOI: 10.1016/B978-0-443-06651-1.50030-7. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780443066511500307>.

HILÁRIO, Maria Odete Esteves; TERRERI, Maria Teresa; LEN, Cláudio Arnaldo. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: Cyclooxygenase 2 inhibitors. **Jornal de Pediatria**, [S. l.], v. 82, n. SUPPL. 2, p. 206–212, 2006. DOI: 10.2223/JPED.1560.

HIMI, Tetsuo; YOSHIOKA, Iwao; KATAURA, Akikatsu. Production and Gene Expression of IL-8-like Cytokine GRO/CINC-1 in Rat Nasal Mucosa. **Acta Otolaryngologica**, [S. l.], v. 117, n. 1, p. 123–127, 1997. DOI: 10.3109/00016489709118003. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/00016489709118003>.

HU, Zhongshuang; MURAKAMI, Taisuke; TAMURA, Hiroshi; REICH, Johannes; KUWAHARA-ARAI, Kyoko; IBA, Toshiaki; TABE, Yoko; NAGAOKA, Isao. Neutrophil extracellular traps induce IL-1 β production by macrophages in combination with lipopolysaccharide. **International Journal of Molecular Medicine**, [S. l.], v. 39, n. 3, p. 549–558, 2017. DOI: 10.3892/ijmm.2017.2870.

IMHOF, B. A.; DUNON, D. Basic mechanism of leukocyte migration. **Hormone and Metabolic Research**, [S. l.], v. 29, n. 12, p. 614–621, 1997. DOI: 10.1055/s-2007-979112.

ISHIKAWA, Tomo-o; GRIFFIN, Kevin J. P.; BANERJEE, Utpal; HERSCHMAN, Harvey R. The zebrafish genome contains two inducible, functional cyclooxygenase-2 genes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [S. l.], v. 352, n. 1, p. 181–187, 2007. DOI: 10.1016/j.bbrc.2006.11.007. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>.

ISLAM, Abul B. M. M. K.; DAVE, Mandar; AMIN, Sonia; JENSEN, Roderick V.; AMIN, Ashok R. **Genomic, Lipidomic and Metabolomic Analysis of Cyclooxygenase-null Cells: Eicosanoid Storm, Cross Talk, and Compensation by COX-1**. [s.l.] : Beijing Institute of Genomics, Chinese Academy of Sciences and Genetics Society of China, 2016. v. 14 DOI: 10.1016/j.gpb.2014.09.005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gpb.2014.09.005>.

ITO, Seiji; OKUDA-ASHITAKA, Emiko; MINAMI, Toshiaki. Central and peripheral roles of prostaglandins in pain and their interactions with novel neuropeptides nociceptin and nocistatin. **Neuroscience Research**, [S. l.], v. 41, n. 4, p. 299–332, 2001. DOI: 10.1016/S0168-0102(01)00289-9.

JANG, Yongwoo; KIM, Minseok; HWANG, Sun Wook. Molecular mechanisms underlying the actions of arachidonic acid-derived prostaglandins on peripheral nociception. **Journal of Neuroinflammation**, [S. l.], v. 17, n. 1, p. 1–27, 2020. DOI: 10.1186/s12974-020-1703-1.

JULIUS, David; BASBAUM, Allan I. 3-Nociception . [S. l.], v. 413, n. September, p. 203–210, 2001.

KAWABATA, Atsufumi. Prostaglandin E2 and pain - An update. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, [S. l.], v. 34, n. 8, p. 1170–1173, 2011. DOI: 10.1248/bpb.34.1170.

KIRKBY, Nicholas S. et al. Cyclooxygenase-1, not cyclooxygenase-2, is responsible for physiological production of prostacyclin in the cardiovascular system. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 109, n. 43, p. 17597–17602, 2012. DOI: 10.1073/pnas.1209192109.

KIRKBY, Nicholas S. et al. Systematic study of constitutive cyclooxygenase-2 expression: Role of NF- κ B and NFAT transcriptional pathways. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S. l.], v. 113, n. 2, p. 434–439, 2016. DOI: 10.1073/pnas.1517642113. Disponível em: <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1517642113>.

KIRTIKARA, Kanyawim; MORHAM, Scott G.; RAGHOW, Rajendra; LAULEDERKIND, Stanley J. F.; KANEKURA, Takuro; GOORHA, Sarita; BALLOU, Leslie R. Compensatory Prostaglandin E2 Biosynthesis in Cyclooxygenase 1 or 2 Null Cells. **Journal of Experimental Medicine**, [S. l.], v. 187, n. 4, p. 517–523, 1998. DOI: 10.1084/jem.187.4.517. Disponível em: <https://rupress.org/jem/article/187/4/517/25659/Compensatory-Prostaglandin-E2-Biosynthesis-in>.

KOTB, Malak; CALANDRA, Thierry; ROMANI, Luigina. Cytokines of Innate and Adaptive Immunity to *Candida albicans*. **Cytokines and Chemokines in Infectious Diseases Handbook**, [S. l.], p. 227–241, 2003. DOI: 10.1385/1-59259-309-7:227.

KRAWISZ, J. E.; SHARON, P.; STENSON, W. F. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. **Gastroenterology**, [S. l.], v. 87, n. 6, p. 1344–1350, 1984. DOI: 10.1016/0016-5085(84)90202-6. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/0016-5085\(84\)90202-6](http://dx.doi.org/10.1016/0016-5085(84)90202-6).

LANGENBACH, Robert; LOFTIN, Charles D.; CHRISTOPHER, Lee; TIANO, Howard. Cyclooxygenase-deficient mice. A summary of their characteristics and susceptibilities to inflammation and carcinogenesis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, [S. l.], v. 889, p. 52–61, 1999. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1999.tb08723.x.

LEMOIS, Henrique P. et al. Prostaglandin mediates IL-23/IL-17-induced neutrophil migration in inflammation by inhibiting IL-12 and IFN γ production. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 106, n. 14, p. 5954–5959, 2009. DOI: 10.1073/pnas.0812782106.

LEVINE, J.; LAU, W.; KWIAT, G.; GOETZL, E. Leukotriene B4 produces hyperalgesia that is dependent on polymorphonuclear leukocytes. **Science**, [S. l.], v. 225, n. 4663, p. 743–745, 1984. DOI: 10.1126/science.6087456. Disponível em: <https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.6087456>.

LEVY, B. D.; CLISH, C. B.; SCHMIDT, B.; GRONERT, K.; SERHAN, C. N. Lipid mediator class switching during acute inflammation: Signals in resolution. **Nature Immunology**, [S. l.], v. 2, n. 7, p. 612–619, 2001. DOI: 10.1038/89759.

LEY, By Klaus; LINNEMANN, Gerhard; MEINEN, Michael; STOOLMAN, Lloyd M.; GAEHTGENS, Peter. Fucoidin, But Not Yeast Polyphosphomannan PPME, Inhibits Leukocyte Rolling in Venules of the Rat Mesentery By. [S. l.], v. 81, n. 1, p. 177–185, 1993.

LOHMAN, Rink Jan; HARRISON, Rosemary S.; RUIZ-GÓMEZ, Gloria; HOANG, Huy N.; SHEPHERD, Nicholas E.; CHOW, Shiao; HILL, Timothy A.; MADALA, Praveen K.; FAIRLIE, David P. Helix-Constrained Nociceptin Peptides Are Potent Agonists and Antagonists of ORL-1 and Nociception. **Vitamins and Hormones**, [S. l.], v. 97, p. 1–55, 2015. DOI: 10.1016/bs.vh.2014.10.001.

LONE, Anna Mari; TASKÉN, Kjetil. Proinflammatory and immunoregulatory roles of eicosanoids in T cells. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 4, n. JUN, p. 1–16, 2013. DOI: 10.3389/fimmu.2013.00130.

LONGHI-BALBINOT, Daniela T.; LANZNASTER, Débora; BAGGIO, Cristiane Hatsuko; SILVA, Morgana Duarte; CABRERA, Celeste Heiseke; FACUNDO, Valdir A.; SANTOS, Adair R. S. Anti-inflammatory effect of triterpene 3 β , 6 β , 16 β -trihydroxylup-20(29)-ene obtained from *Combretum leprosum* Mart & Eich in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, [S. l.], v. 142, n. 1, p. 59–64, 2012. DOI: 10.1016/j.jep.2012.04.013.

LORAM, L. C.; FULLER, A.; FICK, L. G.; CARTMELL, T.; POOLE, S.; MITCHELL, D. Cytokine Profiles During Carrageenan-Induced Inflammatory Hyperalgesia in Rat Muscle and Hind Paw. **Journal of Pain**, [S. l.], v. 8, n. 2, p. 127–136, 2007. DOI: 10.1016/j.jpain.2006.06.010.

LOYNES, Catherine A.; LEE, Jou A.; ROBERTSON, Anne L.; STEEL, Michael J. G.; ELLETT, Felix; FENG, Yi; LEVY, Bruce D.; WHYTE, Moira K.; RENSHAW, Stephen A. PGE2 production at sites of tissue injury promotes an anti-inflammatory neutrophil phenotype and determines the outcome of inflammation resolution in vivo. **bioRxiv**, [S. l.], n. September, 2017. DOI: 10.1101/205997.

LU, Yong Chen; YEH, Wen Chen; OHASHI, Pamela S. LPS/TLR4 signal transduction pathway. **Cytokine**, [S. l.], v. 42, n. 2, p. 145–151, 2008. DOI: 10.1016/j.cyto.2008.01.006.

LUKKARINEN, Heikki; LAINE, Jukka; AHO, Heikki; ASIKAINEN, Eeva; PENTTINEN, Pauliina; KÄÄPÄ, Pekka. Inhibition of COX-2 aggravates neutrophil migration and pneumocyte apoptosis in surfactant-depleted rat lungs. **Pediatric Research**, [S. l.], v. 59, n. 3, p. 412–417, 2006. DOI: 10.1203/01.pdr.0000200798.79840.3d.

LYNN, B. The fibre composition of cutaneous nerves and the classification and response properties of cutaneous afferents, with particular reference to nociception. **Pain Rev.**, [S. l.], v. 1, p. 172–183, 1994.

MALONEY, C. G.; KUTCHERA, W. A.; ALBERTINE, K. H.; MCINTYRE, T. M.; PRESCOTT, S. M.; ZIMMERMAN, G. A. Inflammatory agonists induce cyclooxygenase type 2 expression by human neutrophils. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, [S. l.], v. 160, n. 3, p. 1402–10, 1998. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9570560>.

MANTOVANI, Alberto; CASSATELLA, Marco A.; COSTANTINI, Claudio; JAILLON, Sébastien. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. **Nature Reviews Immunology**, [S. l.], v. 11, n. 8, p. 519–531, 2011. DOI: 10.1038/nri3024. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nri3024>.

MARTINEZ, Rosa Ventura; REVAL, Ma. Irene Díaz; CAMPOS, Myrna Déciga; TERRÓN, José Antonio; RAMÍREZ, Adriana M. Domínguez; LÓPEZ-MUÑOZ, Francisco J. Involvement of peripheral cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in inflammatory pain. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, [S. l.], v. 54,

n. 3, p. 405–412, 2002. DOI: 10.1211/0022357021778475. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1211/0022357021778475>.

MICHAELIS, M. Silent afferents: A separate class of primary afferents? **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, [S. l.], v. 23, n. 2, p. 99–105, 1996. DOI: 10.1111/j.1440-1681.1996.tb02579.x.

MICOV, A.; TOMIĆ, M.; POPOVIĆ, B.; STEPANOVIĆ-PETROVIĆ, R. The antihyperalgesic effect of levetiracetam in an inflammatory model of pain in rats: Mechanism of action. **British Journal of Pharmacology**, [S. l.], v. 161, n. 2, p. 384–392, 2010. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2010.00877.x.

MISCHKOWSKI, Dominik; PALACIOS-BARRIOS, Esther E.; BANKER, Lauren; DILDINE, Troy C.; ATLAS, Lauren Y.; HEALTH, Integrative; INSTITUTET, Karolinska; HEALTH, Integrative. **National Institute on Drug Abuse, National Institutes of Health**. [s.l.: s.n.]. DOI: 10.1097/j.pain.0000000000001132.

MIZOKAMI, Sandra S. et al. Pimaradienoic acid inhibits carrageenan-induced inflammatory leukocyte recruitment and edema in mice: Inhibition of oxidative stress, nitric oxide and cytokine production. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 11, n. 2, p. 1–17, 2016. DOI: 10.1371/journal.pone.0149656.

MONTECUCCO, Fabrizio; STEFFENS, Sabine; BURGER, Fabienne; DA COSTA, Ana; BIANCHI, Giordano; BERTOLOTTO, Maria; MACH, François; DALLEGRI, Franco; OTTONELLO, Luciano. Tumor necrosis factor- α (TNF- α) induces integrin CD11b/CD18 (Mac-1) up-regulation and migration to the CC chemokine CCL3 (MIP-1 α) on human neutrophils through defined signalling pathways. **Cellular Signalling**, [S. l.], v. 20, n. 3, p. 557–568, 2008. DOI: 10.1016/j.cellsig.2007.11.008.

MURPHY, Philip M. CXC Chemokines. In: **Encyclopedia of Hormones**. [s.l.] : Elsevier, 2003. p. 351–362. DOI: 10.1016/B0-12-341103-3/00059-0. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B0123411033000590>.

NAKANISHI, Masako; ROSENBERG, Daniel W. Multifaceted roles of PGE2 in inflammation and cancer. **Seminars in Immunopathology**, [S. l.], v. 35, n. 2, p. 123–137, 2013. DOI: 10.1007/s00281-012-0342-8.

NAUSEEF, William M.; BORREGAARD, Niels. Neutrophils at work. **Nature Immunology**, [S. l.], v. 15, n. 7, p. 602–611, 2014. DOI: 10.1038/ni.2921.

NEEB, Lars; HELLEN, Peter; BOEHNKE, Carsten; HOFFMANN, Jan; SCHUH-HOFER, Sigrid; DIRNAGL, Ulrich; REUTER, Uwe. IL-1 β stimulates COX-2 dependent PGE2 synthesis and CGRP release in rat trigeminal ganglia cells. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 6, n. 3, 2011. DOI: 10.1371/journal.pone.0017360.

NEWTON, Kim; DIXIT, Vishva M. Signaling in innate immunity and inflammation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, [S. l.], v. 4, n. 3, 2012. DOI: 10.1101/cshperspect.a006049.

NGKELO, Anta; MEJA, Koremu; YEADON, Mike; ADCOCK, Ian; KIRKHAM, Paul A. LPS induced inflammatory responses in human peripheral blood mononuclear cells is mediated through NOX4 and G α dependent PI-3kinase

signalling. **Journal of Inflammation**, [S. l.], v. 9, p. 2–8, 2012. DOI: 10.1186/1476-9255-9-1.

NGUYEN, Giang T.; GREEN, Erin R.; MECSAS, Joan. Neutrophils to the ROScue: Mechanisms of NADPH oxidase activation and bacterial resistance. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [S. l.], v. 7, n. AUG, 2017. DOI: 10.3389/fcimb.2017.00373.

NOURSHARGH, Sussan; ALON, Ronen. Leukocyte Migration into Inflamed Tissues. **Immunity**, [S. l.], v. 41, n. 5, p. 694–707, 2014. DOI: 10.1016/j.immuni.2014.10.008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2014.10.008>.

OU, Zhaoping et al. Anti-inflammatory effect and potential mechanism of betulinic acid on λ -carrageenan-induced paw edema in mice. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, [S. l.], v. 118, n. June, p. 109347, 2019. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.109347. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109347>.

PANNUNZIO, Alessandra; COLUCCIA, Mauro. Cyclooxygenase-1 (COX-1) and COX-1 inhibitors in cancer: A review of oncology and medicinal chemistry literature. **Pharmaceuticals**, [S. l.], v. 11, n. 4, p. 1–20, 2018. DOI: 10.3390/ph11040101.

PARAKRAMA T CHANDRASOMA; CLIVE R TAYLOR. The Acute Inflammatory Response. In: NEW YORK, NY : MCGRAW-HILL, Cop. (org.). **Concise pathology**. 3rd ed ed. [s.l: s.n.].

PRATO, Vincenzo et al. Functional and Molecular Characterization of Mechanoinsensitive “Silent” Nociceptors. **Cell Reports**, [S. l.], v. 21, n. 11, p. 3102–3115, 2017. DOI: 10.1016/j.celrep.2017.11.066.

PRESCOTT, S. A.; RATTÉ, S. Somatosensation and Pain. In: **Conn’s Translational Neuroscience**. [s.l.] : Elsevier, 2017. p. 517–539. DOI: 10.1016/B978-0-12-802381-5.00037-3. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128023815000373>.

RADA, Balázs. Neutrophil Extracellular Traps. In: **Bedrossian’s Armenian-English Dictionary**. [s.l: s.n.]. v. 1982p. 517–528. DOI: 10.1007/978-1-4939-9424-3_31. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-9424-3_31.

RAUD, J. Vasodilatation and inhibition of mediator release represent two distinct mechanisms for prostaglandin modulation of acute mast cell-dependent inflammation. **British Journal of Pharmacology**, [S. l.], v. 99, n. 3, p. 449–454, 1990. DOI: 10.1111/j.1476-5381.1990.tb12948.x.

REN, Ke; DUBNER, Ronald. Inflammatory models of pain and hyperalgesia. **ILAR Journal**, [S. l.], v. 40, n. 3, p. 111–118, 1999. DOI: 10.1093/ilar.40.3.111.

REN, Ke; TORRES, Richard. Role of interleukin-1 β during pain and inflammation. **Brain Research Reviews**, [S. l.], v. 60, n. 1, p. 57–64, 2009. DOI: 10.1016/j.brainresrev.2008.12.020. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.brainresrev.2008.12.020>.

RICCIOTTI, Emanuela; FITZGERALD, Garret A. Prostaglandins and inflammation. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, [S. l.], v. 31, n. 5, p. 986–1000, 2011. DOI: 10.1161/ATVBAHA.110.207449.

SALEH, T. S.; CALIXTO, J. B.; MEDEIROS, Y. S. Effects of anti-inflammatory drugs upon nitrate and myeloperoxidase levels in the mouse pleurisy induced by carrageenan. **Peptides**, [S. l.], v. 20, n. 8, p. 949–56, 1999. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10503773>.

SALLUM, Ana Maria Calil; GARCIA, Dayse Maioli; MARIANA SANCHES. Dor aguda e crônica : revisão narrativa da literatura. **Acta Paul Enfermagem**, [S. l.], v. 25, n. 1, p. 150–154, 2010.

SAMAD, Tarek A.; MOORE, Kimberly A.; SAPIRSTEIN, Adam; BILLET, Sara; ALLCHORNE, Andrew; POOLE, Stephen; BONVENTRE, Joseph V.; WOOLF, Clifford J. Interleukin-1 β -mediated induction of Cox-2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity. **Nature**, [S. l.], v. 410, n. 6827, p. 471–475, 2001. DOI: 10.1038/35068566.

SAMPATH, Vishnu Priya. Bacterial endotoxin-lipopolysaccharide; structure, function and its role in immunity in vertebrates and invertebrates. **Agriculture and Natural Resources**, [S. l.], v. 52, n. 2, p. 115–120, 2018. DOI: 10.1016/j.anres.2018.08.002. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.anres.2018.08.002>.

SCAPINI, P.; LAPINET-VERA, J. A.; GASPERINI, S.; CALZETTI, F.; BAZZONI, F.; CASSATELLA, M. A. The neutrophil as a cellular source of chemokines. **Immunological Reviews**, [S. l.], v. 177, n. 4, p. 195–203, 2000. DOI: 10.1034/j.1600-065X.2000.17706.x.

SCHMIDT, Robert F. Silent Nociceptor. In: **Encyclopedia of Pain**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013. p. 2171–2173. DOI: 10.1007/978-3-540-29805-2_4001. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-3-540-29805-2_4001.

SMITH, W. L. Prostanoid biosynthesis and mechanisms of action. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, [S. l.], v. 263, n. 2, p. F181–F191, 1992. DOI: 10.1152/ajprenal.1992.263.2.F181. Disponível em: <https://www.physiology.org/doi/10.1152/ajprenal.1992.263.2.F181>.

SMITH, William L.; DEWITT, David L.; GARAVITO, R. Michael. C YCLOOXYGENASES : Structural , Cellular , and. **Annual review of biochemistry**, [S. l.], v. 69, p. 145–182, 2000.

SMITH, William L.; URADE, Yoshihiro; JAKOBSSON, Per-johan. CR_prostanoid_synthase.pdf. [S. l.], p. 5821–5865, 2011.

SOEHNLEIN, Oliver. Direct and alternative antimicrobial mechanisms of neutrophil-derived granule proteins. **Journal of Molecular Medicine**, [S. l.], v. 87, n. 12, p. 1157–1164, 2009. DOI: 10.1007/s00109-009-0508-6.

SOKOLOVA, E. V.; KARETIN, Y.; DAVYDOVA, V. N.; BYANKINA, A. O.;

KALITNIK, A. A.; BOGDANOVICH, L. N.; YERMAK, I. M. Carrageenans effect on neutrophils alone and in combination with LPS in vitro. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, [S. l.], v. 104, n. 7, p. 1603–1609, 2016. DOI: 10.1002/jbm.a.35693.

ST-ONGE, Mireille et al. Characterization of prostaglandin E2 generation through the cyclooxygenase (COX)-2 pathway in human neutrophils. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, [S. l.], v. 1771, n. 9, p. 1235–1245, 2007. DOI: 10.1016/j.bbalip.2007.06.002. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1388198107001461>.

STUMP, Patrick Raymond Nicolas Andre Ghislain; DALBEN, Gisele da Silva. Mechanisms and clinical management of pain. **Brazilian oral research**, [S. l.], v. 26 Suppl 1, p. 115–9, 2012. DOI: 10.1590/s1806-83242012000700017. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23318753>.

SUGIMOTO MA, SOUSA LP, PINHO V, PERRETTI M, Teixeira MM. Resolution of inflammation : what Controls its Onset ? [S. l.], v. 7, n. April, 2016. DOI: doi.org/10.3389/fimmu.2016.00160.

TECCHIO, Cristina; MICHELETTI, Alessandra; CASSATELLA, Marco A. Neutrophil-derived cytokines: Facts beyond expression. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 5, n. OCT, p. 1–8, 2014. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00508.

TESSIER, Philippe A.; NACCACHE, Paul H.; CLARK-LEWIS, Ian; GLADUE, Ronald P.; NEOTE, Kuldeep S.; MCCOLL, Shaun R. Chemokine Networks in Vivo: Involvement of C-X-C and C-C Chemokines in Neutrophil Extravasation in Vivo in Response to TNF- α . **The Journal of Immunology**, [S. l.], v. 159, n. 7, p. 3595–3602, 1997.

TREEDE, Rolf-Detlef et al. A classification of chronic pain for ICD-11. **Pain**, [S. l.], v. 156, n. 6, p. 1003–1007, 2015. DOI: 10.1097/j.pain.0000000000000160. Disponível em: <https://journals.lww.com/00006396-201506000-00006>.

VASKAR DAS. An Introduction to Pain Pathways and Pain “Targets”. In: THEODORE J. PRICE, Gregory Dussor (org.). **Progress in Molecular Biology and Translational Science**. [s.l.] : Academic Press, 2015. p. 1–30.

VERRI, Waldiceu A.; CUNHA, Thiago M.; POOLE, Stephen; FERREIRA, Seérgio H.; CUNHA, Fernando Q. Cytokine inhibitors and pain control. **Revista Brasileira de Reumatologia**, [S. l.], v. 47, n. 5, p. 341–353, 2007. DOI: 10.1590/s0482-50042007000500009.

VIEIRA, S. M. et al. A crucial role for TNF- α in mediating neutrophil influx induced by endogenously generated or exogenous chemokines, KC/CXCL1 and LIX/CXCL5: RESEARCH PAPER. **British Journal of Pharmacology**, [S. l.], v. 158, n. 3, p. 779–789, 2009. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2009.00367.x.

WALLACE, J. L.; BAK, A.; MCKNIGHT, W.; ASFAHA, S.; SHARKEY, K. A.; MACNAUGHTON, W. K. Cyclooxygenase 1 contributes to inflammatory responses in rats and mice: Implications for gastrointestinal toxicity. **Gastroenterology**, [S. l.], v. 115, n. 1, p. 101–109, 1998. DOI: 10.1016/S0016-

5085(98)70370-1.

WATANABE, Kazuyoshi; KINOSHITA, Shigemi; NAKAGAWA, Hideo. Purification and characterization of cytokine-induced neutrophil chemoattractant produced by epithelioid cell line of normal rat kidney (NRK-52E cell).

Biochemical and Biophysical Research Communications, [S. l.], v. 161, n. 3, p. 1093–1099, 1989. DOI: 10.1016/0006-291X(89)91355-7. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0006291X89913557>.

WEINER, Myra L. Food additive carrageenan: Part II: A critical review of carrageenan in vivo safety studies. **Critical Reviews in Toxicology**, [S. l.], v. 44, n. 3, p. 244–269, 2014. DOI: 10.3109/10408444.2013.861798.

WEISS, Ursula. Reviews 428. **Nature insight**, [S. l.], v. 454, n. 7203, p. 427, 2008.

WINTER, Charles A.; RISLEY, Edwin A.; NUSS, George 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**, [S. l.], v. 111, n. 3, p. 544–547, 1962. DOI: 10.3181/00379727-111-27849.

WRIGHT, Helen L.; MOOTS, Robert J.; BUCKNALL, Roger C.; EDWARDS, Steven W. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. **Rheumatology**, [S. l.], v. 49, n. 9, p. 1618–1631, 2010. DOI: 10.1093/rheumatology/keq045.

WRIGHT, Helen L.; MOOTS, Robert J.; EDWARDS, Steven W. The multifactorial role of neutrophils in rheumatoid arthritis. **Nature Reviews Rheumatology**, [S. l.], v. 10, n. 10, p. 593–601, 2014. DOI: 10.1038/nrrheum.2014.80. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrrheum.2014.80>.

ZHANG, Jianyi; GOORHA, Sarita; RAGHOW, Rajendra; BALLOU, Leslie R. The tissue-specific, compensatory expression of cyclooxygenase-1 and -2 in transgenic mice. **Prostaglandins and Other Lipid Mediators**, [S. l.], v. 67, n. 2, p. 121–135, 2002. DOI: 10.1016/S0090-6980(01)00177-0.

ZHANG, Y.; SHAFFER, A.; PORTANOVA, J.; SEIBERT, K.; ISAKSON, P. C. Inhibition of cyclooxygenase-2 rapidly reverses inflammatory hyperalgesia and prostaglandin E2 production. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, [S. l.], v. 283, n. 3, p. 1069–75, 1997. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9399978>.

APÊNCICE

Apêndice A – Comitê de Ética no Uso de Animais da UNICAMP



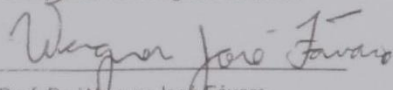
CERTIFICADO

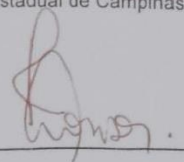
Certificamos que a proposta intitulada Contribuição da expressão de Cox-2 de neutrófilos no processo inflamatório e na hiperalgesia durante a artrite reumatoide experimental induzida por colágeno em camundongos, registrada com o nº 4564-1/2017, sob a responsabilidade de Prof. Dr. Carlos Amílcar Parada e Nathalia Santos Carvalho, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP, em 02 de agosto de 2017.

Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	01/08/2017-01/03/2021
Vigência da autorização para manipulação animal:	10/08/2017-01/03/2021
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	20
Idade / Peso:	10 semanas / 25g
Sexo:	10 machos / 10 fêmeas
Origem:	CEMIB/UNICAMP
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo Knockout / Cox2fl/fl,Mrp8Cre - background em C57BL/6J
No. de animais:	20
Peso / Idade:	10 semanas / 25g
Sexo:	10 machos / 10 fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo Knockout / Cox2fl/fl - background em C57BL/6J
No. de animais:	20
Peso / Idade:	10 semanas / 25g
Sexo:	10 machos / 10 fêmeas
Origem:	Divisão do laboratório de medicina animal - Universidade da Califórnia - UCLA

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao IBAMA, SISBIO ou CIBio e é restrita a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, 10 de agosto de 2017.


Prof. Dr. Wagner José Fávoro
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

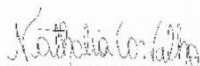
Apêndice B – Declaração de direitos autorais

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **CONTRIBUIÇÃO DA EXPRESSÃO DE COX-2 DE NEUTRÓFILOS NO MODELO DE HIPERALGESIA INFLAMATÓRIA EM CAMUNDONGOS.**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 02 de Junho de 2022

Assinatura : _____



Nome do(a) autor(a): **Nathalia Santos Carvalho**

RG n.º 63.258.332-0

Assinatura : _____



Nome do(a) orientador(a): **Carlos Amílcar Parada**

RG n.º 796238-2