



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

CECÍLIA COSTA FAGUNDES

**INVESTIGAÇÃO DOS MECANISMOS MOLECULARES ASSOCIADOS
À AÇÃO IMUNOMODULATÓRIA DA DIPIRONA NA INFLAMAÇÃO**

**INVESTIGATION OF MOLECULAR MECHANISMS ASSOCIATED
WITH THE IMMUNOMODULATORY ACTION OF DIPYRONE IN
INFLAMMATION**

Campinas

2024

CECÍLIA COSTA FAGUNDES

**INVESTIGAÇÃO DOS MECANISMOS MOLECULARES ASSOCIADOS
À AÇÃO IMUNOMODULATÓRIA DA DAPIRONA NA INFLAMAÇÃO**

**INVESTIGATION OF MOLECULAR MECHANISMS ASSOCIATED
WITH THE IMMUNOMODULATORY ACTION OF DIPYRONE IN
INFLAMMATION**

*Dissertação apresentada à
Faculdade/Instituto da Universidade
Estadual de Campinas como parte
dos requisitos exigidos para a
obtenção do título de Mestra em
Biologia Molecular e Morfofuncional,
na Área de Fisiologia.*

*Dissertation presented to the Institute
of Biology of the University of
Campinas in partial fulfillment of the
requirements for the degree of Master
in Molecular and Morphofunctional
Biology, in the Area of Physiology.*

Supervisor/Orientador: Prof. Dr. Carlos Amilcar Parada

ESTE ARQUIVO DIGITAL
CORRESPONDE À VERSÃO FINAL
DA DISSERTAÇÃO/TESE
DEFENDIDA PELO ALUNO CECÍLIA
COSTA FAGUNDES, E
ORIENTADA PELO PROF.
DR. CARLOS AMILCAR PARADA

Campinas

2024

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

F139i Fagundes, Cecília Costa, 1996-
Investigação dos mecanismos moleculares associados à ação
imunomodulatória da dipirona na inflamação / Cecília Costa Fagundes. –
Campinas, SP : [s.n.], 2024.

Orientador(es): Carlos Amilcar Parada.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas
(UNICAMP), Instituto de Biologia.

1. Dipirona. 2. Imunomodulação. 3. Inflamação. 4. Fenótipo. 5.
Macrófagos. I. Parada, Carlos Amilcar, 1960-. II. Universidade Estadual de
Campinas (UNICAMP). Instituto de Biologia. III. Título.

Informações complementares

Título em outro idioma: Investigation of molecular mechanisms associated with the
immunomodulatory action of dipyrone in inflammation

Palavras-chave em inglês:

Dipyrone

Immunomodulation

Inflammation

Phenotype

Macrophages

Área de concentração: Fisiologia

Titulação: Mestra em Biologia Molecular e Morfofuncional

Banca examinadora:

Carlos Amilcar Parada [Orientador]

Lucas Novaes Teixeira

Iara Gonçalves de Aquino

Data de defesa: 27-11-2024

Programa de Pós-Graduação: Biologia Molecular e Morfofuncional

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

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-6259-2545>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/4702699066019560>

Campinas, 27 de novembro de 2024.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos Amilcar Parada

Prof. Dr. Lucas Novaes Teixeira

Profa. Dra. Iara Gonçalves de Aquino

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

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 Biologia Molecular e Morfofuncional da Unidade do Instituto de Biologia da Unicamp.

Dedico este trabalho a meus pais. Mesmo com a distância, tive todo o suporte e incentivo para trilhar meu caminho.

Também dedico à minha avó, que teria ficado muito feliz ao me ver mestra.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, ao meu orientador, professor Dr. Carlos Amilcar Parada, por todo conhecimento, conversas, risadas e por ter me ensinado muito sobre dedicação, comprometimento e responsabilidade, tanto em minha vida acadêmica como pessoal.

Do mesmo modo, agradeço ao professor Dr. Kauê Malange pela paciência e atenção, à Dra. Catarine Nishijima pelo apoio, companheirismo e amizade durante esse processo, ambos essenciais para o desenvolvimento deste projeto.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 (processo número 88887.657617/2021-00).

Agradeço imensamente à Ariane Maria Zanesco, ao professor Dr. Licio Augusto Velloso e ao laboratório de Sinalização Celular (Labsincel) por todo o aprendizado e paciência compartilhados comigo durante a execução do RT-PCR.

Agradeço também aos meus colegas de laboratório, principalmente ao Douglas Menezes, à Júlia Borges, à Ana Carolina Machado e à Tássia Tillemont por todo o apoio e companheirismo durante essa etapa.

Agradeço ao corpo docente, ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, por possibilitar a minha formação. Tal como, agradeço a sociedade brasileira, por permitir que a pesquisa ocorra.

Agradeço à Banca de avaliadores, por doar seu tempo ao trabalho que me dediquei a concluir.

Agradeço extremamente aos meus pais, por sempre acreditarem em mim e por estarmos juntos nessa vida, e à toda minha família, por terem me proporcionado um ambiente repleto de amor. Por fim, agradeço ao José, pela felicidade diária e pelo suporte e companheirismo extraordinário.

RESUMO

A dipirona é um analgésico amplamente utilizado na prática clínica no Brasil para o controle da dor de origem inflamatória. Apesar do amplo uso, alguns dos mecanismos de ação da dipirona ainda não foram elucidados. A dipirona como pró-fármaco é hidrolisada no metabólito ativo 4-metilaminoantipirina (4-MAA) cuja a ação analgésica depende da ativação do receptor canabinoide tipo 2 (CB2), o qual promove a modulação da resposta imunológica. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da dipirona local na modulação da resposta inflamatória. A dose de local de dipirona a ser utilizada (25 mg) foi extraída a partir da avaliação da diminuição do edema na pata de ratos induzido pela injeção subcutânea de carragenina. Esta dose foi usada para verificar o efeito da administração local de dipirona, por meio de Elisa, na liberação das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α e anti-inflamatória IL-10 no tecido subcutâneo tratado com o agente inflamatório carragenina. A contagem diferencial de células inflamatórias no microscópio óptico foi realizada a partir do exsudato inflamatório peritoneal. A injeção intraperitoneal de dipirona foi feita 2 horas após o estímulo inflamatório pela injeção intraperitoneal de carragenina. Por final, verificamos o efeito da dipirona na polarização de macrófagos M1 em M2 sugerida pela proporção da expressão gênica de iNOS (indicador de M1) e Arg-1 (indicador de M2) em cultura de monócitos, obtidos da medula de fêmur e tíbia de ratos, estimulados com LPS e IFN-gama. Os dados demonstraram que a dipirona em doses elevadas modula a resposta inflamatória diminuindo a liberação de IL-1 β e TNF- α e aumenta a liberação de IL-10 no sítio inflamatório. O tratamento peritoneal com dipirona reduziu a migração de leucócitos totais, sobretudo neutrófilos sem alterar a migração de linfócitos. Porém aumentou a migração de monócitos. Apesar do aumento de monócitos, a incubação de dipirona (1 μ M) por 2 horas em cultura de monócitos estimulados para perfil M1 (LPS+ IFN-gama), aumentou a expressão de Arg-1 em relação à expressão de iNOS, sugerindo uma polarização do perfil M1 para M2. Os dados deste estudo sugerem que doses mais altas de dipirona que aquelas capazes de promover analgesia modulam o processo inflamatório por promoverem a polarização de macrófagos M1 em M2, sendo que este efeito pode favorecer a regeneração tecidual.

Palavras-chave: Dipirona, imunomodulação, inflamação, polarização e macrófagos.

ABSTRACT

Dipyrone is an analgesic widely used in clinical practice in Brazil for the management of pain of inflammatory origin. Despite its extensive use, some of the mechanisms of action of dipyrone remain unclear. Dipyrone, as a prodrug, is hydrolyzed into the active metabolite 4-methylaminoantipyrine (4-MAA), whose analgesic action depends on the activation of the cannabinoid type 2 receptor (CB2), which promotes modulation of the immune response. Thus, the aim of this study was to evaluate the local effect of dipyrone in modulating the inflammatory response. The local dose of dipyrone to be used (25 mg) was determined based on its ability to reduce paw edema in rats induced by subcutaneous carrageenan injection. This dose was used to assess the effect of local administration of dipyrone, via ELISA, on the release of the pro-inflammatory cytokines IL-1 β and TNF- α and the anti-inflammatory cytokine IL-10 in subcutaneous tissue treated with the inflammatory agent carrageenan. Differential inflammatory cell counts under an optical microscope were performed using peritoneal inflammatory exudate. Intraperitoneal injection of dipyrone was performed 2 hours after the inflammatory stimulus induced by intraperitoneal carrageenan injection. Finally, we investigated the effect of dipyrone on the polarization of M1 to M2 macrophages, suggested by the ratio of gene expression of iNOS (M1 marker) to Arg-1 (M2 marker) in cultured monocytes obtained from the femur and tibia bone marrow of rats stimulated with LPS and IFN-gamma. The data demonstrated that dipyrone at high doses modulates the inflammatory response by decreasing the release of IL-1 β and TNF- α and increasing the release of IL-10 at the inflammatory site. Peritoneal treatment with dipyrone reduced the migration of total leukocytes, particularly neutrophils, without altering lymphocyte migration. However, it increased monocyte migration. Despite the increase in monocytes, the incubation of dipyrone (1 μ M) for 2 hours in cultures of monocytes stimulated toward an M1 profile (LPS + IFN-gamma) increased Arg-1 expression relative to iNOS expression, suggesting polarization from the M1 to the M2 profile. The findings of this study suggest that higher doses of dipyrone than those required for analgesia modulate the inflammatory process by promoting the polarization of M1 macrophages to M2 macrophages, an effect likely to favor tissue regeneration.

Keywords: Dipyrone, immunomodulation, inflammation, polarization, macrophage.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Avaliação do edema de pata induzido por meio da injeção subcutânea de 100 µL de carragenina (1%) na pata de ratos (n=6) 2h antes da aplicação intraplantar de 50 uL de dipirona (5 ou 25 mg/pata) ou solução salina	39
Figura 2 Quantificação de IL-1 β (a), TNF- α (b) e IL-10 (c) na pata de ratos (n=6) após 4h da injeção de carragenina (1%)	41
Figura 3 Avaliação da migração de células peritoneais induzida por meio de injeção intraperitoneal de 500 µL de carragenina (3,75 mg) ou solução salina, 2h antes da injeção peritoneal de 500 µL de dipirona (25 mg)	43
Figura 4 Tratamento in vitro de dipirona (1 µM) em cultura de BMDM com estímulo inflamatório de LPS (100 ng/ml) e IFN- γ (20 ng/ml)	44

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACES

4-AA – 4-aminoantipirina

4-MAA – 4-metilaminoantipirina

AINE – Anti-inflamatório não esteroidal

AMPc – Adenosina monofosfato cíclico

AA – cido araquidônico

ARG-1 – Arginase tipo 1

bFGF – Fator de crescimento fibroblástico básico

BMDM - Macrófagos Derivados da Medula ssea

CB1 – Receptor canabinoide tipo 1

CB2 – Receptor canabinoide tipo 2

cDNA – DNA complementar

CINC-1 - Quimioatraente de Neutrófilos Induzido por Citocinas-1

COX – Ciclooxygenase

CTGF - Fator de Crescimento do Tecido Conjuntivo

DAMP - Padrões Moleculares Associados a Danos

GRD – Gânglio da Raiz Dorsal

IFN-γ – Interferon gama

IL- – Interleucina

IL-1Ra – Receptor antagonista de interleucina-1

IFN-γ – Interferon gama

IKK – Quinase de inibidor de NF-κB

IκB – Inibidor de NF-κB

IRAK – Receptor de interleucina-1 associado  quinase

LPS – Lipopolissacarídeo

MAPK – Quinase ativada por mitógenos

MYD88 – Myeloid differentiation primary response gene 88

NaCl – Cloreto de sódio

NF- κ B – Fator nuclear kappa B

PBS – Solução salina tamponada com fosfato

PAMPs – Padrões moleculares associados a patógenos

RT-PCR - Reação em Cadeia da Polimerase com Transcrição Reversa

PG – Prostaglandina

PGE2 – Prostaglandina E2

PLA2 – Fosfolipase A2

ROS – Espécies reativas de oxigênio

SNC – Sistema nervoso central

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

TLR – Receptor Toll-like

VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular

VGF – Fator de crescimento do nervo

iNOS – Óxido nítrico sintase induzível

RNA_m – RNA mensageiro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 DOR – CONSIDERAÇÕES GERAIS	14
1.2 ESTIMULAÇÃO DAS VIAS NOCICEPTIVAS	16
1.3 HIPERALGESIA.....	17
1.4 HIPERALGESIA INFLAMATÓRIA	18
1.5 CARRAGENINA.....	22
1.6 INFLAMAÇÃO.....	22
1.7 TRATAMENTO FARMACOLÓGICO NO CONTROLE DA DOR.....	27
1.8 DIPIRONA E MACRÓFAGOS NA MODULAÇÃO DA DOR.....	28
2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE.....	32
3 OBJETIVOS	33
3.1 OBJETIVOS GERAIS	33
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
4 METODOLOGIA.....	34
4.1 ANIMAIS	34
4.2 EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA.....	34
4.3 MIGRAÇÃO CELULAR INDUZIDA POR CARRAGENINA	35
4.4 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO LOCAL DE DIPIRONA NA EXPRESSÃO DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS.....	36
4.5 ISOLAMENTO E CULTURA DE MACRÓFAGOS DERIVADOS DA MEDULA ÓSSEA (BMDM)	37
4.6 QUANTIFICAÇÃO DE RNAM POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL (RT-PCR).....	37
4.7 ANÁLISE DOS RESULTADOS	38
5 RESULTADOS	39
5.1 TRATAMENTO COM DIPIRONA LOCAL REDUZ O EDEMA EM PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA.....	39

5.2 TRATAMENTO LOCAL COM DIPIRONA REDUZ CITOCINAS PRÓ- INFLAMATÓRIAS IL-1B E TNF- A.....	40
5.3 TRATAMENTO LOCAL COM DIPIRONA REDUZ A MIGRAÇÃO LEUCOCITÁRIA NA PERITONITE INDUZIDA POR CARRAGENINA	41
5.4 EFEITO DA DIPIRONA NA POLARIZAÇÃO DE MACRÓFAGOS M1 E M2 EM CULTURA DE BMDM	43
6 DISCUSSÃO	45
7 CONCLUSÃO.....	54
REFERÊNCIAS.....	55
ANEXOS	70
ANEXO I - PARECER DO TERMO DE APROVAÇÃO DA PESQUISA PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	70
ANEXO II – DECLARAÇÃO DE DIREITOS AUTORAIS.....	72

1 INTRODUÇÃO

1.1 DOR – CONSIDERAÇÕES GERAIS

A dor, a princípio, está envolvida com a proteção fisiológica dos tecidos biológicos que funciona como um alerta diante de situações ou estímulos nocivos. A sensação dolorosa é uma resposta comportamental mediante estímulos intensos que potencialmente ou de fato provocam danos ao organismo colocando em risco a sua sobrevivência. Porém, nos seres humanos, é a principal causa de procura por serviços de atenção à saúde. Isso se deve ao fato, principalmente, de, nos humanos, a dor não raramente extrapola sua função fisiológica de proteção levando o paciente a um estado de intensa desagradabilidade que pode perdurar por horas, dias ou mesmo anos (Raja et al., 2020).

Deste modo, o nosso grupo tem trabalhado com a definição de dor que pode ser descrita como uma “percepção desagradável associada à nocicepção”. Neste sentido, a dor tem, portanto, dois componentes distintos. Um seria dado pela “percepção desagradável” a qual está relacionada ao seu componente emocional, representado pela ativação das vias do Sistema Límbico. Estas vias não são específicas da dor e, portanto, a “percepção de desagradabilidade” também não é exclusiva da dor. O seu segundo componente é a nocicepção, o qual está relacionado ao componente sensorial e discriminativo da dor. Estas vias nociceptivas são específicas do tecido periférico até o tálamo e do tálamo ao córtex somatossensorial, compartilhando as vias com as outras sensações somáticas.

Portanto, a nocicepção está diretamente relacionada com a ativação de neurônios aferentes primários específicos, os nociceptores, que transmitem os estímulos nociceptivos para o sistema nervoso central (SNC). Estes estímulos podem tanto ser mecânicos quanto térmicos ou químicos (Merskey, 2004; Millan, 1999; Basbaum e Jessell, 1999).

Diferentes estímulos podem modular a transmissão de dor nessas fibras, como a lesão física ou química, observando-se consequente restrição de movimento (da Silva Serra et al. 2016). Neste caso, a dor pode ter um caráter protetivo diante de uma lesão, desenvolvendo a hipersensibilidade com o objetivo de auxiliar na cicatrização ao restringir a movimentação e o contato físico. Observa-se nesse cenário

a liberação de substâncias que estão relacionadas com o aumento do processo inflamatório, liberados por células residentes ou que migram ao local de lesão. Nesse contexto, a dor inflamatória está relacionada com a sensibilização do neurônio nociceptivo sensorial primário, causando a hiperalgesia inflamatória (Woolf, 2010; Millan, 1999).

O que acontece, basicamente, é que estímulo ambiental interno ou externo ao organismo pode ser detectado pelo receptor sensorial, presentes em todo o corpo. Estes receptores são responsáveis por traduzir a informação produzida por estímulos mecânicos, químicos ou térmicos para o SNC por meio das fibras nervosas primárias. A partir disso, há um contato com os neurônios secundários, os quais, finalmente, conduzem informações até o centro superior para sua elaboração (Bonica, 1990).

Na fibra primária presente no tecido periférico, podem estar presentes bainhas de mielina, capazes de aumentar as velocidades da condução dos impulsos nervosos ao longo da fibra. Essa velocidade de condução propicia uma interpretação imediata dos estímulos. Um bom exemplo são as fibras associadas a mecanorreceptores, conhecidas com A β , que respondem a estímulos táteis (Djouhri et al., 2016).

Os estímulos que provocam a nocicepção, a dor, podem ser de origem elétrica, térmica, química ou mecânica, interna ou externa ao organismo. A dor tem a função de alertar para a presença de processos lesivos ou potencialmente lesivos, sinalizando a necessidade de uma resposta para evitar maiores danos (Bonica, 1990).

Para isso, há fibras específicas com livres terminações, as quais não estão associadas a nenhum receptor sensorial especializado, que percebem esses estímulos nocivos. Essas fibras têm um alto limiar de ativação e estão diretamente relacionadas às vias nociceptivas (Aguggia, 2003), e por esse motivo são conhecidas como nociceptores. Podem ser encontradas em fibras A δ , que são mielinizadas e responsáveis pela dor rápida e aguda, ou fibras C não-mielinizadas, encarregadas pela dor lenta e difusa) (Milla, 1999; Julius; Basbaum, 2001).

O corpo celular destas células nervosas periféricas se localizam, em sua maioria, nos gânglios das raízes dorsais (GRDs). A partir destes gânglios saem prolongamentos até a medula espinal, onde estão presentes os neurônios secundários. Quando um neurônio sensorial primário é ativado, há a liberação de

aminoácidos excitatórios, conhecidos como neurotransmissores e neuromoduladores, os quais atuam nos receptores pós-sinápticos que estimulam os neurônios secundários, iniciando mecanismos intracelulares que participarão da transmissão do impulso. Em seguida, esses impulsos ascenderão para as áreas supraespinais, até neurônio no núcleo do tálamo (Millan, 1999; Milne et al., 1981). Neste estágio, a informação será transmitida para a área sensorial do córtex cerebral, onde sua característica será integrada. Isso inclui a análise da qualidade, intensidade, localização, duração, bem como dos componentes emocional e afetivo da dor. Esse processo permite a diferenciação entre a sensação dolorosa e a percepção da dor (Noback et al., 1996).

1.2 ESTIMULAÇÃO DAS VIAS NOCICEPTIVAS

O estímulo nocivo tem em sua concepção o ocasionamento de dano que promove injúria prejudicial. Já a nocicepção se dá pela ativação das vias sensoriais relacionadas à condução da informação produzidas por estímulos nocivos ou potencialmente nocivos. Ou seja, o estímulo nociceptivo tem a capacidade de ativar as vias nociceptivas. Em contrapartida, situações não nocivas também podem ativar vias de condução nociceptivas, mesmo sem a presença de dano e prejuízo tecidual, de forma que a nocicepção se relaciona com aspectos quantitativos da estimulação nociceptiva, não dependendo do tipo de estímulo (Lee et al., 2009; Walters, 2012).

De forma simplista, a dor imediata resulta da ativação das vias sensoriais nociceptivas que detectam estímulos nocivos. Esse processo envolve fenômenos iônicos e indução de uma resposta elétrica nas fibras por meio da entrada do Na⁺ por um canal específico, promovendo condução ao longo das vias nociceptivas, culminando na percepção da dor. No entanto, alterações metabólicas nas células neuronais também podem modificar a forma como essas fibras percebem e transmitem a informação da dor. Dependendo da natureza dessas alterações, diferentes fenômenos podem ser observados (Cummins et al., 2007; Dib-Haj et al., 2010). Estímulo nocivo tem em sua concepção o desencadeamento de dano que promove injúria prejudicial. Já a nocicepção se dá pela ativação das vias sensoriais relacionadas à condução da informação produzidas por estímulos nocivos ou potencialmente nocivos. Ou seja, o estímulo nociceptivo tem a capacidade de ativar as vias nociceptivas. Em contrapartida, situações não nocivas também podem ativar

vias de condução nociceptivas, mesmo sem a presença de dano e prejuízo tecidual, de forma que a nocicepção se relaciona com aspectos quantitativos da estimulação desta via, não dependendo do tipo de estímulo (Lee et al., 2009; Walters, 2012).

De modo geral, a dor imediata resulta da ativação das vias sensoriais nociceptivas que detectam estímulos nocivos. Esse processo envolve fenômenos iônicos e indução de uma resposta elétrica nas fibras através do influxo do íon sódio (Na^+) por canais específicos, promovendo a propagação das informações pelas vias nociceptivas, culminando na percepção da dor. No entanto, alterações metabólicas nas células neuronais também podem modificar a forma com a qual as fibras percebem e conduzem o sinal de dor. Dependendo da natureza dessas alterações, diferentes fenômenos podem ser observados (Cummins et al., 2007; Dib-Hajj et al., 2010).

1.3 HIPERALGESIA

Em situações específicas, a dor pode ser acompanhada por efeitos adicionais, como a hiperalgesia. Este evento ocorre devido à sensibilização das fibras sensoriais neuronais, que detectam os estímulos nociceptivos. Essa sensibilização se dá pela redução dos limiares de excitabilidade dos neurônios (Riedel & Neeck, 2001) e é provocada por mediadores produzidos durante o processo inflamatório (Huang et al., 2006; Verri et al., 2006).

Esses mediadores atuam em seus receptores específicos, resultando em alterações metabólicas que facilitam a geração de potenciais de ação nos neurônios nociceptores. Ou seja, essas fibras tornam-se mais propensas à ativação diante de estímulos. Assim, o processo inflamatório pode ser amplamente associado à hiperalgesia. Estudos mostram que a ação dos mediadores inflamatórios resulta no desenvolvimento de mudanças fenotípicas nos neurônios sensoriais, influenciando o estado de sensibilização. Pode ocorrer, por exemplo, de acordo com estudos atuais, um aumento na expressão de determinados canais de sódio (Na^+), principalmente em fibras nociceptoras (Porreca et al., 1999; Gold et al., 1998; Khasar et al., 1998; Wood, 2004; England et al., 1996).

Também pode-se destacar a ideia de que a hiperalgesia é consequência da sensibilização dos neurônios sensoriais primários, em conjunto com a ativação de

nociceptores polimodais, ativados por diferentes estímulos e nociceptores dormentes, que apenas reagem a estímulos após serem sensibilizados (McMahon; Koltzenburg, 1990b; McMahon; Koltzenburg, 1990a).

Essa classe de nociceptores, não reage imediatamente a estímulos mecânicos ou térmicos, mas é ativada no momento o processo inflamatório, sendo diretamente associados a estados de hiperalgesia (Schaible & Schmidt, 1988). Nesse contexto, apesar do papel fundamental da inflamação nesse fenômeno, é importante ressaltar que, em algumas condições, a hiperalgesia não pode ser atribuída unicamente à ação de mediadores inflamatórios. Nas dores de origem neuropática, por exemplo, onde a dor resulta de lesões ou disfunções nos nervos sensoriais, algumas fibras que normalmente responderiam apenas a estímulos táteis começam a agir como nociceptores, fazendo com que estímulos inofensivos sejam percebidos como dolorosos (Bonica, 1990; Koerber et al., 1994; Kohama et al., 2000).

1.4 HIPERALGESIA INFLAMATÓRIA

A dor de origem inflamatória acontece quando os nociceptores são sensibilizados devido a mediadores inflamatórios liberados no tecido lesionado ou inflamado, ocorrendo uma diminuição do limiar de excitabilidade neuronal, que tem como consequência a estimulação da via nociceptiva (Riedel & Neeck, 2001). Os mediadores inflamatórios que participam desse estímulo podem ser peptídeos, lipídeos, neurotransmissores, serotonina, neurotrofinas, etc. Eles são responsáveis por ativar os nociceptores, de forma a gerar potenciais de ação e transmitir o sinal de dor ao SNC, provocando a hiperalgesia inflamatória (Julius, 2001).

Um importante mediador presente em vários tecidos do corpo humano são os prostanoídes, que se originam a partir do ácido aracdônico metabolizado pela enzima ciclo-oxigenase (COX). Os prostanóides desempenham o papel de mediadores locais em diversos tecidos, tanto em condições fisiológicas quanto fisiopatológicas (Narumiya et al., 1999).

Ademais, essas moléculas participam de uma cascata regulatória ampla que modula as ações das células imunológicas, assim como do microambiente em que se encontram. Portanto, a atividade de diferentes mediadores e alterações no nível de ativação das células imunes, em conjunto com o estado fisiológico do

organismo, podem ter influência nas respostas inflamatórias, sugerindo que os prostanoídes estão envolvidos em condições da inflamação, como na dor, edema e o aumento da temperatura (Tilley et al., 2001; Yaksh et al., 1999).

Estudos mostraram que os prostanoídes possuem a capacidade de influenciar a inflamação nos tecidos, podendo reproduzir os sinais cardinais de inflamação. (Tilley et al., 2001). O prostanoíde pró-inflamatório melhor caracterizado e potencialmente mais importante na inflamação é a prostaglandina E2 (PGE2). Neste contexto, seus principais produtores são os fibroblastos, as células epiteliais e as células do sistema imune (Park et al., 2006).

Posteriormente a estimulação inflamatória, a síntese de PGE2 é induzida em macrófagos residentes durante a fase aguda da inflamação, acarretando num aumento da migração de neutrófilos, macrófagos e mastócitos, como também potencializando a expressão e secreção de citocinas pró-inflamatórias (Schmid & Brüne, 2021).

A produção dos prostanoídes e ação de diferentes mediadores no tecido inflamado e lesionado ocasiona a sensibilização dos nociceptores. Desse modo, essas terminações nervosas são ativadas, causando aumento na percepção e resposta à dor. A PGE2 é fundamental na hiperalgesia inflamatória, desempenhando um papel essencial no processo de sensibilização na medula espinhal, na periferia e no GDR (Yaksh et al., 1999; Araldi et al., 2013; Riedel & Neeck, 2001).

Diversos estudos mostram que as prostaglandinas (PGs), especialmente as da série E, desempenham um papel importante na indução de hiperalgesia inflamatória (Ferreira, 1973). A PG é produzida pela ação da COX sobre o ácido araquidônico (AA), e sua síntese é estimulada por fator químico, mecânico ou infecciosos (Ferreira & Vane, 1967).

A inibição da COX, e, por consequência, da síntese de prostaglandinas, foi o mecanismo inicialmente utilizado para deixar claro as propriedades analgésicas dos anti-inflamatórios não esteroidais (Vane, 1971; Ferreira, 1972; Ferreira et al., 1973). Dessa forma, entre os mediadores inflamatórios, as prostaglandinas desempenham um papel particularmente significativo. Elas fazem parte de uma classe de substâncias conhecidas como eicosanóides (Simmons et al., 2004).

A síntetização das prostaglandinas ocorre quando a fosfolipase A2, ao ser ativada, hidrolisa os fosfolipídios da membrana, liberando ácido araquidônico. Quando liberado, uma parte do ácido é rapidamente metabolizada principalmente pelas enzimas ciclooxigenases (COX). Os prostanóides da série 2, que são gerados pela ação enzimática da COX sobre o ácido araquidônico, incluem as prostaglandinas da série 2 (PG2), entre outras menos relevantes para este trabalho (Campbell & Halushka, 1996; Narumiya & Itzgerald, 2001; Simmons et al., 2004).

Os novos prostanóides são, em sua maioria, rapidamente liberados para fora da célula e desempenham uma ampla gama de funções biológicas, incluindo a promoção de hiperalgesia e inflamação no ser humano (Ferreira, 1972). Além disso, foi demonstrado que a PGE2 é particularmente eficaz na indução da hipernocicepção (Ferreira & Vane, 1967) e na desenvoltura da sensibilização nociceptiva associada à inflamação na pata de rato (Kuhn & Willis, 1973).

No início, foram descritas duas isoformas da COX: COX-1 e COX-2. A COX-1 é expressa de forma constitutiva em diversos tecidos. Em contraste, A COX-2 não é normalmente detectada em diversos tecidos, mas pode ser estimulada por mediador inflamatório, como citocina ou fator de crescimento (Campbell & Halushka, 1996; Trifan & Hla, 2003). A COX-3 foi uma descoberta recente e é derivada do gene da COX-1. Sua expressão acontece primordialmente no SNC e na aorta (Gosset et al., 2006).

A inibição da COX, especialmente da COX-1, muito utilizada no tratamento da dor de origem ingramatória, provoca muitos de efeitos colaterais, principalmente devido à redução das funções fisiológicas exercidas constitutivamente por essa isoforma (Hay & De Bellerche, 1997; Zhang et al., 1997).

O metablismo do ácido araquidônico também ocorre por vias não enzimáticas, dando origem à produtos com estruturas semelhantes às das prostaglandinas, como os isoprostanos. Dessa forma, bloqueadores do metabolismo do ácido araquidônico não impacta sua produção (Campbell & Halushka, 1996).

No SNC, são expressos o RNA mensageiro (RNAm) e as proteínas para a COX-1 e -2. Foi detectado o RNAm para a COX-1 e -2 e a proteína para COX-1 em cultura de células do GRD. Sabe-se que a COX-1 é expressa em neurônios, no

citoplasma, nas membranas nucleares e no axônio, isso indica que a PG pode ser produzida e secretada tanto pelos terminais centrais quanto periféricos dos neurônios aferentes primários (Vanegas & Schaible, 2001).

Ademais, a interleucina-1 β (IL-1 β) é uma citocina inflamatória responsável por induzir a síntese e liberação de PGs. Além dela, os agentes inflamatórios carragenina e lipopolissacarídeo de *E. Coli* também são capazes de induzir sua liberação endogenamente (revisado por Poole et al., 1999).

A IL-1 possui isoformas: IL-1 β e IL-1 α . A IL-1 β é um polipeptídeo sintetizado por diversas células, como macrófagos, fibroblastos, neurônios, queratinócitos e células da glia, entre outras (Bianchi et al., 1998). Tanto a IL-1 β quanto a IL-1 α atuam como um agonista de receptor específico associado à membrana plasmática. O IL-1Ra é um antagonista natural desses receptores. Existem sítios de ligação para a IL-1 que se destacam pela sua importância (Sims et al., 1995). Enquanto receptor do tipo 1 (IL-1RI) inicia uma cascata de sinal intracelular, o receptor do tipo 2, embora exista a associação com a molécula de IL-1, sinais intracelulares não são ativados, agindo somente como local de ligação para a IL-1 (Dinarello, 1996).

A IL-1 realiza a maior parte das atividades biológicas ao ativar a transcrição de diversos genes que codificam citocinas, quimiocinas, proteínas inflamatórias, enzimas e moléculas de adesão celular envolvidas na produção de mediadores pró-inflamatórios, como a óxido nítrico sintase induzida (iNOS), a ciclooxigenase-2 (COX-2) e a fosfolipase A2 (PLA2) (Wesche et al., 1997; Dinarello, 1996). Quando a IL-1 se liga ao receptor IL-1RI, o fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88) é ativado. Esse fator, por sua vez, se associa à quinase associada ao receptor de IL-1 (IRAK), ativando duas vias principais de sinalização da IL-1: a do fator de transcrição nuclear NF- κ B e a cascata das MAPKs (proteínas quinases ativadas por mitógenos) (Rothwell & Luheshi, 2000).

Além disso, estudos mostram que há uma hiperalgesia da IL-1 β no tecido periférico durante a inflamação (Ferreira et al., 1988). A partir disso, diferentes autores descrevem seu envolvimento na hiperalgesia inflamatória (Schweizer et al., 1988; Oka et al., 1993; Reye et al., 2000; Fachi et al., 2001; Song et al., 2005).

1.5 CARRAGENINA

Carrageninas são polissacarídeos sulfatados de alto peso molecular originados de algas vermelhas específicas (Rhodophyceae) (Cohen, 2002). Sua utilização já está estabelecida em modelos animais experimentais para induzir inflamação e estudar a ação de fármacos anti-inflamatórios e analgésicos. Quando injetadas na pata traseira de roedores possuem a capacidade de causar uma resposta imune inata clássica, caracterizada por edema da pata, migração de neutrófilos e dor (Benard, 2010; Lopes et al, 2020). In vitro, induz a ativação de macrófagos peritoneais e a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF e IL-1 β (Bhattacharyya, 2008; Lopes et al, 2020).

Estudos anteriores mostraram que a inflamação e os sinais inflamatórios induzidos por carragenina são dependentes da ativação de macrófagos por meio da produção de citocinas pró-inflamatórias, principalmente TNF e IL-1 β (Lopes et al, 2020). Além disso, um possível mecanismo molecular da carragenina é sua ligação a receptores Toll-like em células fagocíticas, como macrófagos, promovendo uma regulação da resposta imune inata. In vitro, sabe-se que a carragenina ativa TLR4 (Cunha, 2016; Bhattacharyya, 2008; Lopes et al, 2020).

A carragenina também induz uma hipernocicepção mecânica por meio de uma cascata de citocinas. A primeira citocina liberada é o TNF- α e posteriormente é desencadeada a liberação de IL-6, IL-1 e CINC-1, os quais ativam ambas as vias das aminas simpáticas e das prostaglandinas, tendo como resultado a ativação de seus receptores neuronais, aumentando a excitabilidade neuronal (Ferreira e Lorenzetti, 1993; Cunha et al., 1991; Cunha et al., 1992; Lorenzetti et al. 2002).

1.6 INFLAMAÇÃO

A inflamação é uma condição clínica presente em diversas patologias, abrangendo exposição à toxinas, radiação, lesões e infecções. É uma resposta natural do organismo, em que há como objetivo a promoção da regeneração ou reparação do tecido lesionado. Ela se caracteriza pela presença de inchaço, vermelhidão, calor e dor, podendo posteriormente promover a disfunção de órgãos, demandando possivelmente uma intervenção farmacológica. A presença da inflamação é comumente documentada na patogênese de inúmeros distúrbios (Chen et al, 2018;

Netea et al, 2017; Henschke, 2015).

O processo inflamatório acontece quando o organismo é exposto a estímulos lesivos endógenos ou exógenos, que estimulam mediadores inflamatórios responsáveis por induzir dor, ativar ou inibir a inflamação e a reparação do tecido, além de provocar ação do tecido conjuntivo vascularizado. Esse evento provoca alterações funcionais e morfológicas nas células, tecidos, vasos sanguíneos e linfáticos presentes na região inflamada e, independente da causa, o objetivo é sempre restaurar a homeostase tecidual. A resposta inflamatória controlada normalmente é benéfica, entretanto, pode se tornar prejudicial para o organismo se não for regulada (Garcia-Leme, 1989; Collins, 2000; Hannoodde & Nasurussin, 2022).

Esse processo inflamatório pode se dar como uma inflamação aguda, em que diante do agente nocivo há uma resposta imediata e precoce, ou como uma inflamação crônica, marcada por uma resposta prolongada, onde está presente tanto a inflamação ativa quanto o dano no tecido (Collins, 2000).

Durante a inflamação aguda, por meio da ativação das vias vasoativas e quimiotáticas que resultam na vasodilatação local, há um aumento do fluxo sanguíneo para a região afetada, aumentando a permeabilidade vascular e causando a exsudação de fluido para o tecido intersticial. Isso faz com que a região apresente as características citadas anteriormente, vermelhidão, calor e edema. Mediadores liberados nesse processo recrutam mais células para o local, principalmente neutrófilos na fase inicial e em seguida macrófagos. Mediadores como histamina, prostaglandinas, bradicinina e citocinas produzidas pelas células inflamatórias estão muito associados com a inflamação aguda, já que estímulos inflamatórios ativam vias de sinalização intracelular que induzem a produção desses mediadores. Posteriormente, com a redução dos agentes causadores, é natural que aconteça o processo de reparo e cicatrização tecidual (Sebire, 2010).

Os principais mediadores inflamatórios são as citocinas, como interferons, interleucinas, fatores de crescimento, fator de necrose tumoral e quimiocinas. São glicoproteínas pequenas liberadas por células do tecido lesionado ou por células imunes, sendo reconhecidas por receptores específicos de cada mediador inflamatório e, dessa forma, iniciam as cascatas de sinalização e respostas celulares

adequados para promover a homeostase (Floege et al, 2012)

Dentre os mediadores inflamatórios, destaca-se no presente trabalho o papel das citocinas, que podem ser pró-inflamatórias ou anti-inflamatórias. As pró-inflamatórias podem ser produzidas por macrófagos ativados e estão envolvidas na regulação das respostas inflamatórias (Zhang & An; 2007). São exemplos dessas citocinas pró-inflamatória a IL-1 β , interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) que orquestram a inflamação através da ativação dos receptores do Toll-like (TLRs) (Chen et al, 2017; Kaminska, 2005). As citocinas anti-inflamatórias são moléculas imunorregulatórias que controlam a resposta das citocinas pró-inflamatórias, sendo as principais: interleucina (IL)-1, IL-4, IL-10, IL-11 e IL-13 (Zhang & An; 2007).

Os TLRs são proteínas de membrana encontradas na superfície das células do sistema imune inato, como os macrófagos, são ativados a partir do reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) ou sinais endógenos que envolvem sinais do dano tecidual ou celular, os padrões moleculares associados ao dano (DAMPs). Dessa forma, DAMPs e PAMPs são reconhecidos pelo TLR-4 e desencadeiam a resposta inflamatória aguda., indicando semelhanças entre respostas inflamatórias infecciosas e não infecciosas (Brennan & Gilmore, 2018; Takeda & Akira, 2015; Chen et al, 2017; Adib-Conquy & Cavaillon, 2007; Rubartelli & Lotze 2007).

A ativação dos TLRs inicia uma cascata de sinalização intracelular (Chen et al, 2017; Czerkies & Kwiatkowska, 2014; Akira et al, 2001), levando à ativação da quinase I κ B (IKK). A IKK é responsável por regular a ativação da via NF- κ B por meio da fosforilação das proteínas I κ B no citoplasma. Esse processo causa a degradação de I κ B pelo proteassoma. Como normalmente I κ B inibe NF- κ B, sua degradação possibilita a liberação do NF- κ B para sua translocação nuclear e ativação da transcrição gênica em seguida. Esse fator de transcrição participa de forma importante no processo inflamatório durante a resposta imune e sua atividade pode ser induzida por diferentes enzimas, citocinas inflamatórias e substâncias de patógenos (Pasparakis et al, 2006; Basak et al, 2007). Além disso, essa via é responsável por regular a produção de citocinas pró-inflamatórias e recrutar células inflamatórias (Chen et al, 2018).

A resposta inflamatória em geral é dividida em duas fases com características distintas. A primeira é caracterizada por elementos típicos da resposta imune inata, a qual mobiliza o recrutamento de células do processo inflamatório agudo, tais como neutrófilos e macrófagos do tipo 1 (M1). Já a segunda fase é caracterizada pela presença, sobretudo, de macrófagos do tipo 2 (M2), os quais promovem a secreção de citocinas anti-inflamatórias (IL-4, -10 e -13) e fatores de crescimento associados à cicatrização e reparação, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), de tecidos conectivos (CTGF) e de crescimento de fibroblastos (bFGF), terminando por restaurar a homeostasia tecidual (Netea et al., 2017).

Os macrófagos são células pertencentes ao sistema mononuclear fagocítico, de grande importância no sistema imunológico (Nathan, 2008). São encontradas em todos os tecidos do corpo humano, com alta plasticidade, diferentes fenótipos e funções nos diferentes tecidos em que residem (Atri et al., 2018). Dessa maneira, atuam como importantes reguladores da resposta inflamatória, auxiliando na recuperação e cicatrização do tecido inflamado.

Essas células foram identificadas pela primeira vez no final do século XIX, por Elie Metchnikoff (Nathan, 2008). Após a descoberta, a literatura indicou que os macrófagos desempenham um papel fundamental na resposta imunidade inata e adaptativa, defendendo o organismo de diferentes patógenos. Dessa forma, foram descritos como reguladores de resposta inflamatória, tendo em vista que auxiliam na recuperação e cicatrização do tecido inflamado (apud Atri et al., 2018).

Os monócitos circulantes do sangue periférico são recrutados para o microambiente tecidual lesionado, diferenciando em macrófagos, e que posteriormente podem ser polarizados nos diferentes perfis celulares de acordo com as características da inflamação, dependendo dos fatores de crescimento, citocinas e outros mediadores presentes no microambiente que promovem a ativação das vias de sinalização intracelular específicas na expressão de genes associados aos fenótipos, ocorrendo a polarização dos macrófagos. (Mantovani, 2004). Essa plasticidade das células mononucleares do sangue periférico é fundamental para a resposta imune do hospedeiro e a regulação do ambiente tecidual em diferentes contextos fisiológicos e patológicos.

Dentre os perfis de macrófagos, dois principais subtipos são abordados neste trabalho: M1 e M2. Os M1 são ativados por lipopolissacarídeos (LPS), por interferon-gama (IFN- γ) e por fatores de necrose tumoral (TNF- α). São células efectoras com função pró-inflamatória que produzem a citocina TNF- α e o óxido nítrico (ON) via enzima óxido nítrico sintetase induzida (iNOS). Estes produtos são capazes de matar microrganismos e células tumorais (Rath et al., 2014; Orecchioni et al., 2019).

Os M2 possuem função anti-inflamatória, participando das respostas imunes específicas para a redução da inflamação, cuja enzima principal é a arginase-1, que converte a arginina em ureia e ornitina, reduzindo o substrato para a formação de ON. Desempenham importante função na redução da inflamação, no reparo tecidual, cicatrização de feridas e na angiogênese. A exposição da citocina IL-4, IL-10, e IL-13 são essenciais para a polarização desse perfil celular, resultando na liberação da citocina anti-inflamatória IL-10 e TGF- β para mitigar a inflamação e conduzir mecanismos reparadores (Kashfi et al., 2021).

Ademais, os macrófagos podem alternar dinamicamente entre os fenótipos e subtipos intermediários, sendo células versáteis que podem apresentar os atributos tanto inflamatórios quanto anti-inflamatórios (Scheurlen et al., 2021).

Nesse sentido, dentro do contexto da neurobiologia da dor, é crescente a busca por estratégias farmacológicas que possibilitem além da analgesia o reparo e cicatrização do tecido lesionado. Sendo assim, a modulação da inflamação via uma regulação dinâmica de macrófagos se faz interessante dado a plasticidade adaptativa destas células em diferentes contextos, sobretudo no microambiente inflamatório, objetivando a restauração da homeostase tecidual.

Para além disso, um estudo realizado por Pannel et al. (2016), demonstrou que os macrófagos são capazes de liberar peptídeos opioides (meta-enkefalina, dinorfina A e β -endorfina) quando polarizados à isoforma M2, contribuindo por exemplo, para amenização de quadros de dor neuropática. Sendo assim, ressalta-se que o receptor CB2 está intimamente ligado a liberação de β -endorfina por macrófagos, queratinócitos e linfócitos T, bem como à ação analgésica deste opioide envolve o receptor Kappa (Befort, 2015; Su et al., 2011; Ibrahim et al., 2005).

No entanto, com relação a dipirona, pouco se sabe sobre a contribuição de macrófagos na analgesia induzida por este fármaco. Assim, este trabalho objetivou expandir a utilização da dipirona, verificando o efeito do medicamento no tecido inflamado, porém, sob uma perspectiva celular diferente do sistema nervoso: os macrófagos.

Considerando que os macrófagos desempenham papel central na modulação da inflamação e reparo tecidual, avalia de forma mais profunda o potencial analgésico da dipirona, podendo contribuir para sua inserção mais ampla em estratégias farmacológicas para o controle da dor inflamatória em diferentes contextos, como por exemplo, doenças articulares como osteoartrite (Wu et al., 2020), artrite reumatoide (Udalova et al., 2016) e neuropatias (Yu et al., 2020), em que já é sabido que os macrófagos tem papel fundamental na regulação da fisiopatologia.

Neste sentido, é plausível propor que a dipirona possa ter um uso potencial para o tratamento de processos inflamatórios, não dentro de um conceito de um fármaco anti-inflamatório, mas sim de um fármaco modulador da resposta inflamatória, diminuindo a resposta inflamatória, inclusive a dor e favorecendo a regeneração tecidual. Considerando a sua baixa toxicidade e seu baixo custo, esta hipótese tem muito interesse clínico-farmacológico e pode abrir novas perspectivas no controle dos processos inflamatórios.

Assim, o intuito deste trabalho foi o de investigar a contribuição de macrófagos na analgesia induzida pela dipirona, tendo como alvo a regulação da polarização destas células.

1.7 TRATAMENTO FARMACOLÓGICO NO CONTROLE DA DOR

Na prática clínica, o tratamento da dor aguda normalmente consiste no uso de analgésicos bem estabelecidos como dipirona e acetaminofeno (paracetamol), anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) e opioides (Edwards et al., 2010).

Os AINEs são frequentemente utilizados com finalidade analgésica, antipirética e anti-inflamatória em casos de dor aguda resultante de inflamações devido a lesões no tecido. Esses medicamentos, como por exemplo aspirina, ibuprofeno, diclofenaco, nimesulida, indometacina etc., são capazes de reduzir a dor

e a inflamação por inibir a atividade das enzimas COX, impedindo a sensibilização neuronal (Gwanyanya et al., 2012).

Os agonistas opioides puros, como por exemplo a morfina, são uma classe de analgésicos derivados da papoula e tem sua ação relacionada ao bloqueio da neurotransmissão de impulsos nociceptivos. Os opioides se ligam especificamente aos receptores opioides presentes em todo o sistema nervoso central e em terminações nervosas aferentes periféricas. Esses receptores são ligados a proteínas G inibitórias que, quando ativadas, promovem o fechamento dos canais de cálcio voltagem dependente e reduzem a produção de monofosfato de adenosina cíclicos (AMPC). Como resultado, reduz a liberação de neurotransmissores, como glutamato e substância P, das fibras nociceptivas, reduzindo a sensação de dor. Além disso, a ativação dos receptores também promove o estímulo do efluxo de potássio, tendo como consequência a hiperpolarização celular e uma diminuição da excitabilidade neuronal (Trivedi et al., 2007; Andrea et al., 2008).

1.8 DIPIRONA E MACRÓFAGOS NA MODULAÇÃO DA DOR.

A antipirina é um derivado de pirazolona que foi primeiramente sintetizada em 1883 por Ludwig Knorr e Wilhelm Filehne e, posteriormente, passou a ser industrialmente produzida em Frankfurt. Apenas depois de comercializado para o tratamento da febre, foi descoberto o potencial analgésico do medicamento. Visto a importância do antipirético no tratamento da dor, derivados de antipirina foram produzidos no começo do século XX. Dentre esses, a dipirona (metamizol) que foi amplamente utilizada na Primeira Guerra Mundial (Sabatowski et al., 2004).

A dipirona é um fármaco analgésico amplamente utilizado na prática clínica devido ao seu caráter multimodal no tratamento da dor, de tolerabilidade gastrointestinal favorável, com efeito adverso raro de agranulocitose (Konijnenbelt-Peters et al., 2017).

A dipirona como pró-droga sofre hidrólise não enzimática formando o primeiro metabólito ativo, 4-metilaminoantipirina (4-MAA) no trato gastrointestinal. Este metabólito possui rápida absorção e atinge 85% de biodisponibilidade após o uso por via oral, sendo a concentração máxima alcançada de (tmax of 1.2 a 2.0 horas), sendo metabolizado no fígado. A metabolização do 4-MAA forma o segundo

metabólito ativo 4-aminoantipirina via desmetilação, resultando no metabólito inativo 4-formilaminoantipirina (4-AA) via oxidação. Em comparação com o 4-MAA, o 4-AA apresenta uma eficácia analgésica consideravelmente inferior, com o tempo de meia-vida mais longo, demorando mais para alcançar a concentração máxima no plasma. No entanto, a combinação das propriedades terapêuticas do 4-MAA e do 4-AA, permitem a eficácia rápida e duradoura do metamizol (Vale, 2006; Lutz, 2019).

No Brasil, a dipirona começou a ser comercializada em 1922 com o nome de Novalgina. A utilização do medicamento aumentou com o passar dos anos, até que nos anos 1970 muitos países suspenderam a sua utilização devido a relatos de casos de agranulocitose, possivelmente causados em decorrência de seu uso (apud Vale, 2006).

A agranulocitose é uma condição clínica que causa um significativo déficit imunológico, resultando na morte de cerca de 7 a 25% dos indivíduos afetados. Entretanto, apesar de sua gravidade, foi observado que com a utilização da dipirona, a incidência da agranulocitose varia de 0,2 a 2 casos por milhão de pessoas/dia de uso, número este que é considerado aceitável (Vale, 2006).

Por esse motivo, a dipirona continua sendo utilizada no tratamento e controle da dor e de inflamações em diversos países, incluindo no Brasil (Vale, 2006). A dipirona é um dos analgésicos mais utilizados pelos brasileiros, tanto na sua forma isolada (Novalgina, Anador) quanto em associações (Dorflex, Neosaldina) (Jornal Brasileiro de Medicina, 2012/2013). Além disso, de acordo com o Conselho Federal de Farmácia (2023), a dipirona sódica (Novalgina) foi o segundo medicamento genérico mais vendido no Brasil.

Acreditava-se que a dipirona apresentava efeitos analgésico e anti-inflamatório apenas via inibição de enzimas COX-1 e 2 (Pierre et al., 2007) e diminuição de síntese de prostaglandinas. Entretanto, atualmente sabe-se que seu caráter de pró-fármaco, por meio de metabólitos bioativos, contribuem diretamente na analgesia via ativação de sistemas canabinoides e opioides endógenos, independentemente da síntese de prostaglandinas (Dos Santos et al., 2014).

Os metabólitos da dipirona, citados anteriormente, não se ligam amplamente a proteínas plasmáticas e, portanto, são, em grande parte, excretados

pelos rins. Dessa forma, o que garante a analgesia é a concentração dos metabólitos bioativos 4-MAA e 4-AA presentes no organismo (Vale, 2006).

Vários trabalhos (Pierre et al., 2007; Rogosch et al., 2012), alguns deles publicados por nosso grupo de pesquisa (Dos Santos et al., 2014; 2020a; 2020b) demonstraram que, majoritariamente, o efeito analgésico da dipirona depende exclusivamente da ação dos metabolitos 4-MAA e 4-AA, com ativação do sistema canabinoide via receptores tipo 1 e 2 (CB1 e CB2), os quais estão presentes, respectivamente, em neurônios e em células residentes na epiderme, como queratinócitos, fibroblastos e macrófagos (Befort, 2015; Turcotte et al., 2016).

Como relatado por Turcotte et al. (2016), os receptores canabinoides desempenham papel central na analgesia periférica induzida pela dipirona. Particularmente, o receptor CB2 tem papel fundamental no período resolutivo da resposta inflamatória, onde sua ativação em diferentes tipos celulares levou à diminuição da síntese de espécies reativas de oxigênio (ROS), de citocinas inflamatórias (IL-1 β , IL-8 e TNF- α), reduzindo a expressão do fator nuclear kappa B (NF-kB) e aumentando a síntese de citocinas anti-inflamatórias, com diferenciação e polarização dos monócitos no perfil M2.

Dado o contexto e as premissas acima, a dipirona possui uso potencial para o tratamento da dor e inflamação em seus mais diferentes contextos, considerando sua baixa toxicidade, acessibilidade, eficácia e potenciais mecanismos implicados na modulação da inflamação. Complementarmente, nosso grupo de pesquisa teve importante contribuição na demonstração do mecanismo pelo qual o metabolito 4-MAA da dipirona tem ação via crosstalk entre o receptor CB2 e o receptor Kappa opioide, promovendo analgesia em um modelo animal de inflamação aguda (Dos Santos et al., 2020a).

A dipirona tem grande eficácia analgésica e antipirética, apresenta disponibilidade de formulação parenteral, baixo custo de produção, poucos efeitos colaterais e alta eficácia. Por isso, é um importante medicamento utilizado na prática médica no controle da dor. Dessa forma, destaca-se a necessidade de se compreender melhor seu mecanismo de ação com o objetivo de expandir o escopo de sua atuação como primeira linha farmacológica no tratamento da dor (Schroeder,

2014; Dos Santos, 2018).

2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

A dipirona é um dos fármacos mais utilizado no Brasil para o controle da dor e da febre (Sznejder et al., 2022). Possui alta eficácia, efeitos colaterais reduzidos, e tolerabilidade gastrointestinal mais favorável em relação aos anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs), além da disponibilidade de formulação parenteral de baixo custo de produção, tornando-a alvo interesse clínico e farmacológico, porém, ainda são necessários mais estudos para elucidar seu mecanismo de ação (Sznejder et al., 2022).

Apesar da eficácia da dipirona no controle da dor relacionado ao processo inflamatório, há ainda uma persistência no uso excessivo dos AINEs. Estes fármacos possuem efeitos sistêmicos colaterais graves associado ao uso prolongado, como hormonais indesejáveis e efeitos locais deletérios, retardando ou inibindo o processo de reparo tecidual. Além dos efeitos colaterais, esse tipo de medicamento não promovem a cicatrização tecidual, inibindo a enzima COX relacionada com a via da dor (Davis e Robson, 2016).

Dessa forma, novas perspectivas terapêuticas estão sendo desenvolvidas para tratar dor inflamatória, substituindo os fármacos inibidores da resposta inflamatória por fármacos capazes de modular a resposta inflamatória em células alvos, como os macrófagos, de forma a recuperar a homeostase tecidual e promover a cicatrização tecidual. Neste sentido é de grande interesse clínico-farmacológico desenvolver terapias ou novos fármacos que medeiem a polarização de M1 ao perfil M2, estabelecendo equilíbrio entre os perfis celulares (Eming et al. 2017).

Com isso, a hipótese de nosso trabalho é que a dipirona com uso local possa reduzir a expressão das citocinas pró-inflamatórias em M1 e aumentar a expressão de citocinas anti-inflamatórias em M2, e em adição, de reduzir o processo inflamatório no edema e na peritonite de pata induzido pela carragenina, e consequentemente, reduzir a migração de leucócitos.

Neste sentido, a dipirona poderá ser incluída entre as substâncias biologicamente ativas capazes de promover uma modulação da resposta inflamatória, sobretudo modular células imunes, expandindo o uso do fármaco sistêmico ao uso local na clínica relacionados aos seus respectivos metabólitos ativos 4-MAA e 4-AA.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar o efeito local da dipirona na modulação do processo inflamatório pela ação do seu metabólito ativo 4-MAA na polarização do perfil de macrófagos pró-inflamatória (M1) em anti-inflamatório (M2) na fase de hiperalgesia inflamatória induzida pela carragenina, favorecendo o reparo e cicatrização tecidual.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Analisar o efeito da administração local de dipirona na expressão das citocinas pró-inflamatórias IL1- β e TNF- α e anti-inflamatória IL-10 em animais previamente injetados com carragenina via intraplantar.

c) Verificar o efeito da administração local de dipirona na resposta inflamatória induzida pela carragenina por meio da avaliação do edema utilizando paquímetro digital.

d) Avaliar o efeito da dipirona na migração celular na peritonite induzida por carragenina pela expressão de citocinas pró (IL1- β e TNF- α) e anti-inflamatórias (IL-10).

e) Avaliar a polarização de macrófagos M1 e M2 *in vitro* tratados com 4-MAA pela expressão dos genes relacionados aos perfis de macrófagos pró-inflamatório (iNOS, TNF- α) e anti-inflamatório (Arg-1, IL-10).

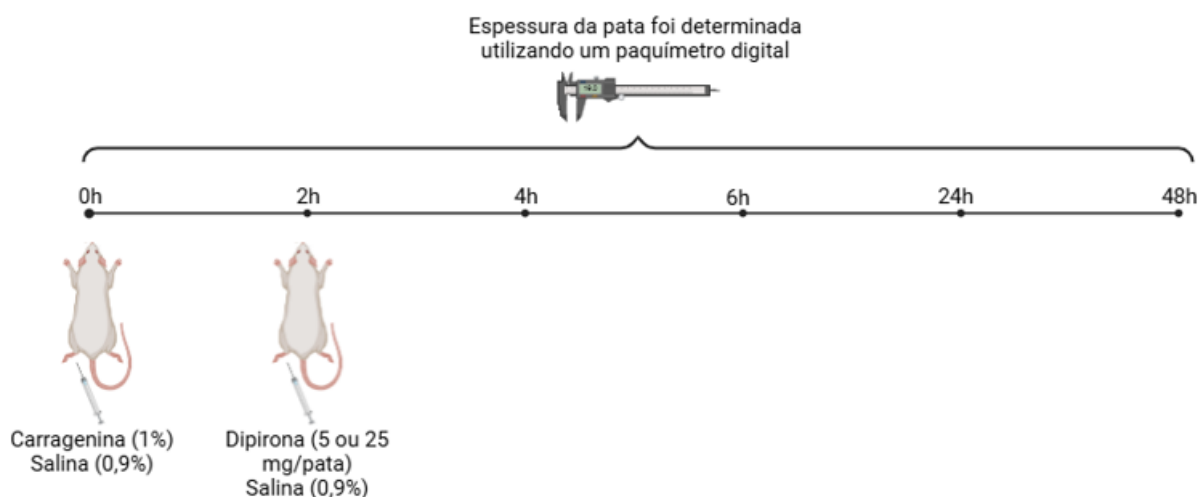
4 METODOLOGIA

4.1 ANIMAIS

O presente estudo foi conduzido em conformidade com as diretrizes éticas para pesquisas com animais, sob aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNICAMP, protocolo nº 5931-1/2021 (anexo 1). Foram utilizados 150 ratos Wistar machos, com peso entre 180 e 220 g, provenientes do Biotério Central da UNICAMP. Os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno no Biotério de manutenção do Laboratório de Estudos da Dor - UNICAMP, mantidos sob condições controladas de temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e ciclo claro/escuro de 12 horas. Eles receberam ração específica para a espécie (Nuvital) e acesso irrestrito à água.

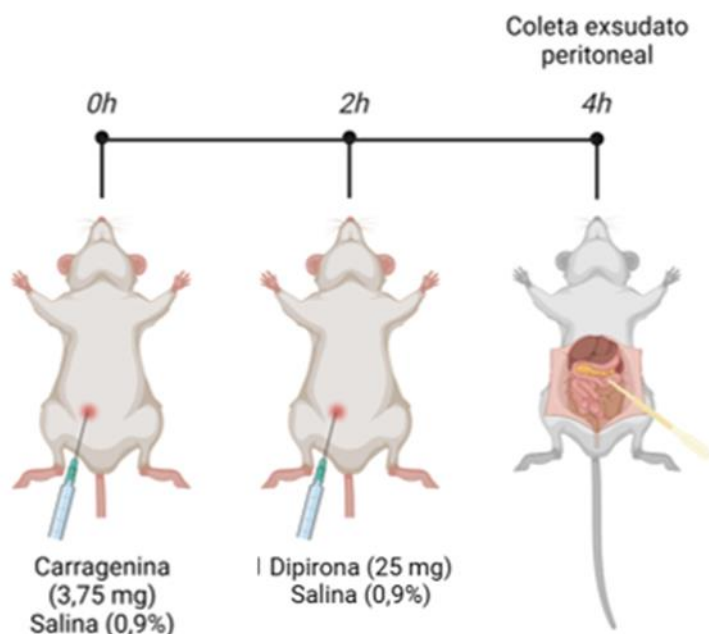
4.2 EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA

O edema de pata foi induzido por meio da injeção subcutânea de 100 μL de carragenina (1%) (Sigma-Aldrich; 22049-5G-F) na região plantar da pata posterior de ratos, 2h antes da aplicação intraplantar de 5 e 25 mg de dipirona (5 ou 25 mg/50 μL) (Sigma-Aldrich; D8890) diluída em solução salina 0,9% ou solução salina 0.9% (NaCl) (Levy, 1969). A avaliação da inflamação e o papel da dipirona foi previamente avaliado pela espessura da pata utilizando o paquímetro digital no tempo 0 (período basal) e, posteriormente, nos tempos 2, 4, 6, 24 e 48h após inoculação da carragenina (de Moraes-Zani et al., 2013). Os resultados foram calculados pela diferença entre a medida obtida no tempo 0 e as medidas posteriores, sendo o resultado do edema expresso como o aumento percentual na espessura da pata.



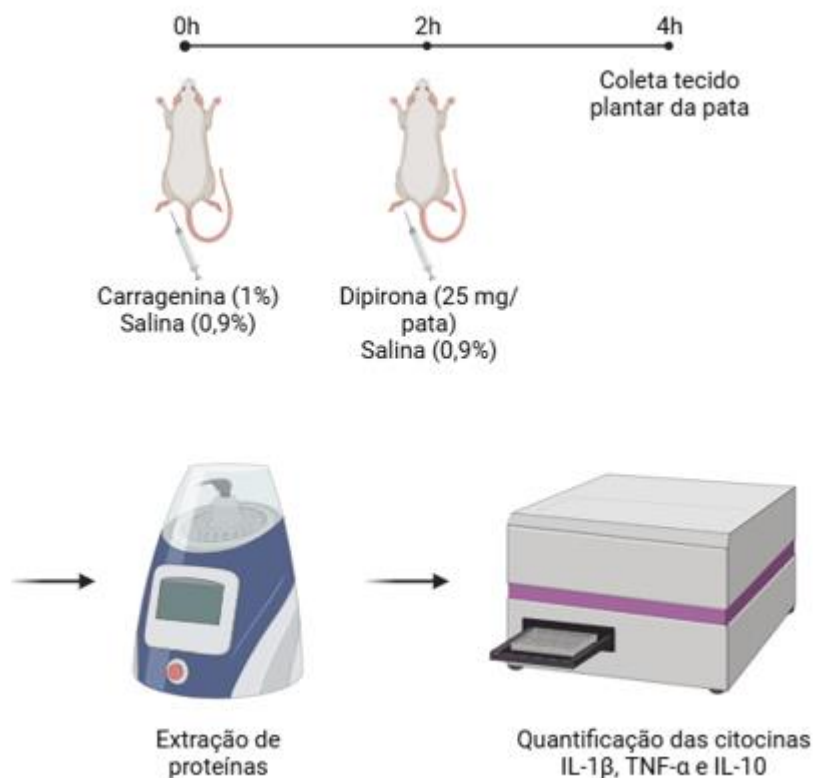
4.3 MIGRAÇÃO CELULAR INDUZIDA POR CARRAGENINA

A migração das células peritoneais foi induzida por meio de injeção intraperitoneal de 500 μ L de carragenina (3,75 mg) ou solução salina 0.9%. Após 2 horas, foi injetado via peritoneal de 500 μ L de dipirona (25 mg). Transcorridas 4 horas após a aplicação da carragenina, os animais foram eutanasiados utilizando isoflurano (5%) e a cavidade peritoneal foi lavada com 3 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS), com heparina. Após aplicar delicadamente uma massagem nas paredes abdominais, o exsudato foi coletado com auxílio de uma pipeta Pasteur de plástico estéril. A contagem celular total foi estabelecida utilizando câmara de Neubauer. Posteriormente, o líquido peritoneal foi centrifugado a 1200 rpm por 10 minutos e ressuspensionado em 200 μ L de albumina bovina a 3% contendo as células foram colocadas em orifícios de papel filtro Wathmann sobrepostos em lâminas. Após aguardar pelo menos 24h para a secagem natural das lâminas, o papel filtro foi retirado para as células serem coradas utilizando o corante de Wright (Laborclin; 620485) (Rosenfeld, 1971). Um total de 100 células foi contado usando microscópio óptico (Leica; DM750) na objetiva de 100x, com óleo de imersão.



4.4 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO LOCAL DE DIPIRONA NA EXPRESSÃO DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS

O teste de ELISA (SAFIEH-GARABEDIAN et al., 1995) foi realizado com pequenas adaptações. Foi realizado o estímulo inflamatório por meio da administração subcutânea de carragenina (1%) ou o seu veículo (0,9% de NaCl). Após 2h, as patas foram tratadas com dipirona (25 mg/pata). Transcorridas 2h de tratamento, os animais foram eutanasiados e o tecido da região plantar pata traseira de ratos foi extraído. Estes tecidos foram homogeneizados utilizando FastPrep-24™. As amostras foram submetidas à centrifugação a 10.000 rpm por 15 minutos a 4°C. Os sobrenadantes resultantes foram armazenados a -80°C para análises futuras dos níveis das proteínas IL-1 β , TNF- α e IL-10. As citocinas foram quantificadas utilizando os kits específicos: TNF- α de rato /TNFSF1A (R&D Systems, código: DY510), IL-1 β de rato / IL-1F2 (R&D Systems, código: DY501) e IL-10 de rato (R&D Systems, código: DY522-05). Todos os protocolos foram realizados conforme as orientações fornecidas pelo fabricante (R&D Systems).



4.5 ISOLAMENTO E CULTURA DE MACRÓFAGOS DERIVADOS DA MEDULA ÓSSEA (BMDM)

Para obtenção de macrófagos derivados da medula óssea (BMDM), células tronco hematopoiéticas foram coletadas da medula óssea presentes no fêmur de ratos Wistar (Toda et al., 2021). Após a eutanásia dos animais e a coleta do fêmur, a medula foi removida do interior do osso através da lavagem com 10 mL de PBS estéril. A solução contendo as células foi filtrada (filtro 70 μ m) e posteriormente homogeneizada em um tubo Falcon (50 mL). Tampão de cloreto de amônio estéril foi adicionado ao meio por 5 min para lisar os eritrócitos. A seguir, foram adicionados 10 mL de PBS estéril para interromper a reação de lise, e o tubo Falcon foi homogeneizado e centrifugado (4 °C, 15 min a 1800 rpm). Após, as células foram ressuspensas e homogeneizadas em 20 mL de meio de cultura RPMI (Sigma-Aldrich; R6504). As células foram contadas e plaqueadas em placa de 24 poços (5 $\times$ 10⁵ células/poço), com meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (Sigma-Aldrich, 12103C), 1% de penicilina-estreptomicina (Sigma-Aldrich, P4333), 1% de solução de aminoácidos não essenciais (MEM Non-Essential Amino Acid Solution, Sigma-Aldrich, M7145), 1% de solução de vitaminas (MEM Vitamin Solution, Sigma-Aldrich, M6895), 1% de piruvato de sódio (Sigma-Aldrich, P2256) e 20 ng/mL de fator estimulante de colônias de macrófagos (M-CSF, Genscript, Z03010-5).

Posteriormente, após 3 dias, foi realizada a troca do meio de cultura e no dia cinco, nova troca do meio de cultura foi realizada, acrescido com os tratamentos específicos do ensaio de polarização. As células foram estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS; 100 ng/mL) e interferon gama (INF- γ ; 20 ng/mL) para polarizar macrófagos M1 por 1 h e 30 min e tratadas com dipirona (1 μ M) por 4 horas e 30 minutos (Maytalman et al., 2023). Por fim, os macrófagos foram coletados para extração de seu RNA.

4.6 QUANTIFICAÇÃO DE RNAm POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL (RT-PCR)

Para a realização da Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (RT-PCR), o mRNA da cultura de BMDM foi extraído utilizando 500 μ L de Trizol (Tri-Reagent, T9424; Sigma-AldrichR), seguindo as instruções do fabricante.

As amostras foram quantificadas por espectrofotometria utilizando o sistema EPOCH Multi-Sample Spectrophotometer (Biotek Instruments, Winooski, Vermont, EUA). A análise foi realizada com coeficiente de extinção de 40 ng-cm/ μ L e comprimento de trajetória da luz OD260 de 0,1 cm, aplicando-se a equação de Beer-Lambert: Concentração de RNA [ng/ μ L] = (OD260 x 40 ng-cm/ μ L) / 0,1 cm.

Para a síntese de DNA complementar (cDNA), foram utilizados 2 μ g de RNA total, empregando o kit Accuris qMax (Benchmark Scientific, Nova Jersey, EUA) com Oligo dT, conforme as instruções do fabricante. O cDNA produzido foi armazenado a -80°C.

A expressão gênica dos marcadores fenotípicos de macrófagos M1 (Nos-2/iNOS) e M2 (Arg-1/Arginase-1) foi quantificada por RT-PCR em um sistema StepOnePlus (Applied Biosystems, EUA), utilizando o reagente iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, EUA). O gene β -actina foi empregado como controle endógeno. As sequências dos primers estão listadas na Tabela 1.

Alvo	Sequência <i>Forward</i>	Sequência <i>Reverse</i>
Nos-2	TCAGGCTTGGGTCTTGTAGC	GAAGAGAAACTTCCAGGGGCA
Arg-1	CCAGTATTCACCCCGGCTAC	GTCCTGAAAGTAGCCCTGTCT
β -actina	CGCGAGTACAACCTTCTTGC	CGTCATCCATGGCGAACTGG

Tabela 1 Sequências *forward* e *reverse* de oligonucleotídeos destinados a investigação da expressão de RNAm dos genes alvo Nos-2 e Arg-1 e do gene controle endógeno β -actina.

4.7 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os dados foram analisados no software GraphPad Prism 9. Para comparações entre duas médias, utilizou-se o Teste t, enquanto diferenças entre múltiplas médias foram avaliadas por análise de variância (ANOVA). Dependendo do contexto, realizou-se ANOVA de uma ou duas vias. Nos casos em que foi identificada diferença estatisticamente significativa, aplicou-se o Teste de Tukey para comparações entre os grupos. O nível de significância considerado foi $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 TRATAMENTO COM DIPIRONA LOCAL REDUZ O EDEMA EM PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA.

O objetivo deste ensaio foi analisar se a dipirona seria capaz de reduzir a formação do edema da pata traseira de ratos induzido por carragenina. Para isso, utilizamos o paquímetro digital para medir a espessura das patas.

A partir disso, foi possível observar na **figura 1** que a dose de dipirona de 25 mg/pata via intraplantar reduziu significativamente ($p < 0,05$) a formação de edema na quarta e sexta hora quando comparado com o grupo controle carragenina. No entanto, a dose menor de 5 mg/pata não reduziu significativamente a formação de edema.

Dessa forma, as patas tratadas via intraplantar com dipirona (25 mg/pata), na sexta hora, apresentaram uma redução de aproximadamente 61% do edema em relação as patas apenas com carragenina, sugerindo a possibilidade de redução da inflamação e extravasamento plasmático. Após a sexta hora, não houve diferença significativa entre os grupos, reduzindo o edema das patas ao longo de 48 horas (**Figura 1**).

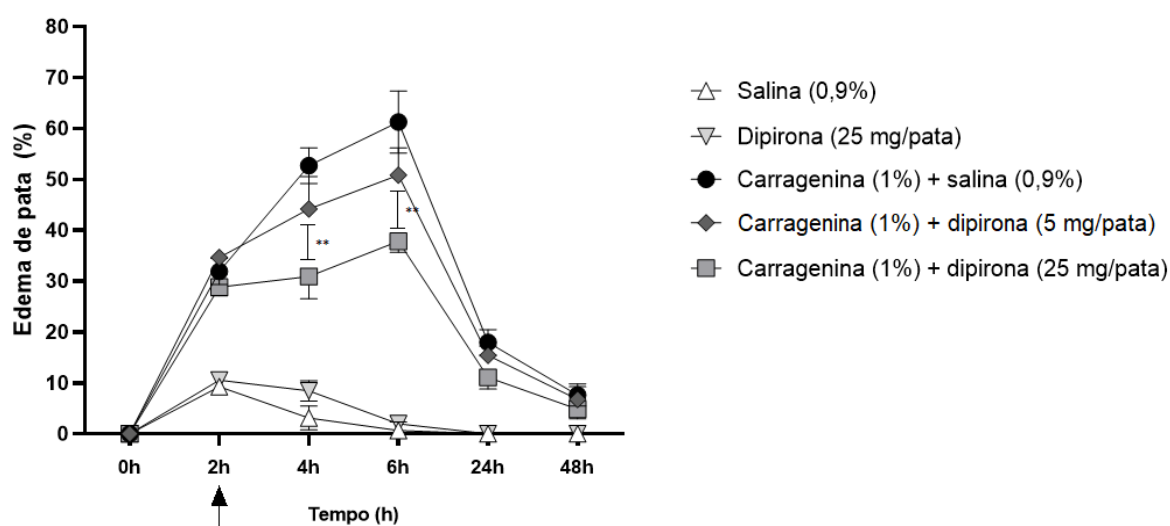


Figura 1 Avaliação do edema de pata induzido por meio da injeção subcutânea de 100 μ L de carragenina (1%) na pata de ratos ($n=6$) 2h antes da aplicação intraplantar de 50 μ L de dipirona (5 ou 25 mg/pata) ou solução salina. A espessura da pata foi determinada utilizando um paquímetro digital no tempo 0, 2, 4, 6, 24h e 48h. Os resultados foram calculados pela diferença entre a medida obtida no tempo 0 e as medidas posteriores e o edema foram expressos como o aumento percentual na espessura da pata. Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média. ANOVA duas vias, pós teste de Tukey * $p < 0.05$.

5.2 TRATAMENTO LOCAL COM DIPIRONA REDUZ CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS IL-1 β E TNF- α .

Para verificar se o efeito modulador da inflamação da dipirona envolveu uma redução das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α e da citocina anti-inflamatória IL-10 utilizamos a dose com efeito no edema de 25 mg/pata. Foi realizada a indução do processo inflamatório por carragenina, seguido pelo tratamento local com dipirona.

A administração local de dipirona (25 mg/pata) reduziu significativamente ($p < 0,05$) a quantidade de IL-1 β (**Figura 2A**) e TNF- α (**Figura 2B**) no tecido da região plantar tratado com carragenina quando comparado com o grupo controle tratado apenas com carragenina. Além disso, foi observado um aumento significativo da citocina anti-inflamatória IL-10 no tecido inflamado tratado com dipirona (**Figura 2C**).

Dessa forma, a redução do edema na figura 1 pode ser relacionada com a figura 2 (A, B e C), sugerindo a redução das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α em conjunto com aumento da citocina anti-inflamatória IL-10.

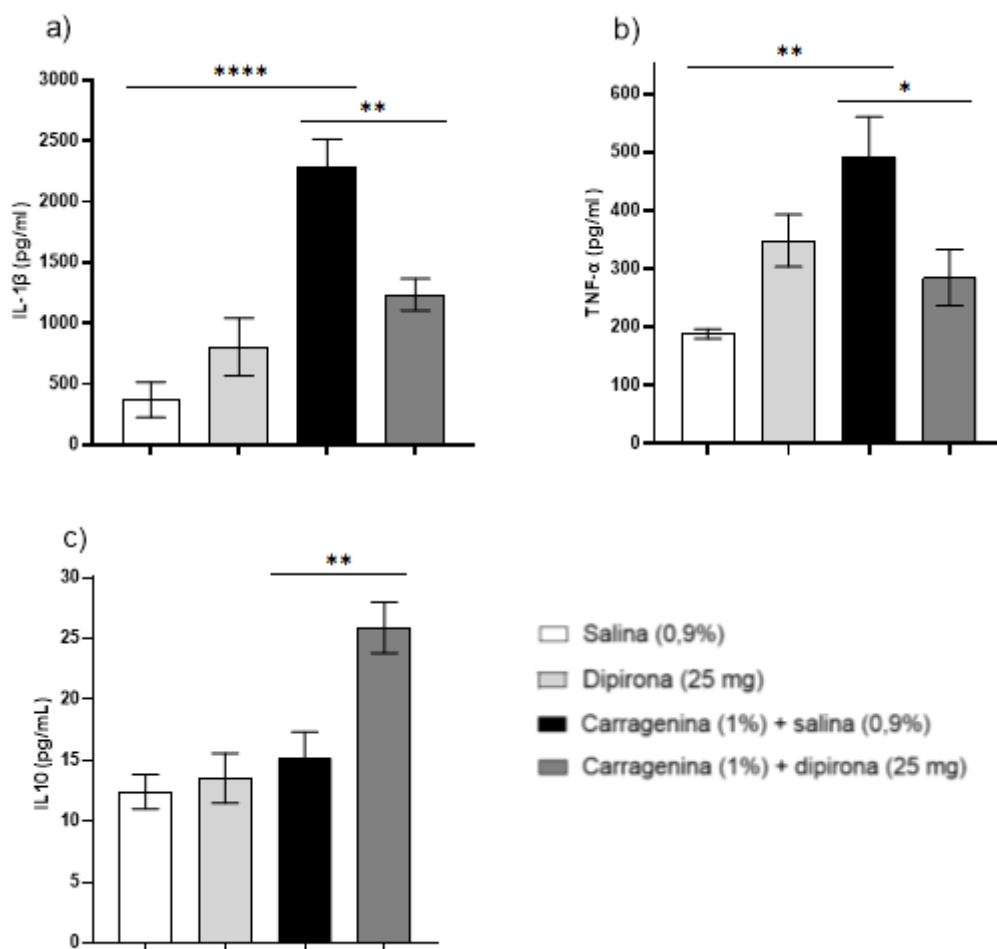


Figura 2 Quantificação de IL-1 β (a), TNF- α (b) e IL-10 (c) na pata de ratos (n=6) após 4h da injeção de carragenina (1%). O tratamento com dipirona (25 mg/pata), 2h horas após injeção de carragenina, reduziu significativamente as concentrações de IL-1 β e TNF- α em relação ao grupo que recebeu apenas carragenina e aumentou significativamente as concentrações e IL-10. Não houve diferença significativa entre os grupos que receberam apenas salina e os que receberam somente dipirona, indicando baixa toxicidade da droga. Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média. ANOVA uma via, pós teste de Tuckey * p <0.05.

5.3 TRATAMENTO LOCAL COM DIPIRONA REDUZ A MIGRAÇÃO LEUCOCITÁRIA NA PERITONITE INDUZIDA POR CARRAGENINA

Com este ensaio, buscou-se analisar a influência da dipirona na migração celular, por meio da peritonite induzida por carragenina. A inflamação peritoneal foi induzida por meio da administração de carragenina e o número de leucócitos recrutados na cavidade peritoneal foi medido como uma indicação do grau de inflamação.

Dessa forma, conseguimos observar que o tratamento com dipirona (25 mg) reduziu significativamente ($p<0,05$) o recrutamento total de células induzido por carragenina na cavidade peritoneal quando comparado aos grupos tratados com os grupos controles, salina e apenas dipirona (**figura 3A**). Dentre o total de células, observa-se que o tratamento reduziu significativamente ($p<0,05$) o número de neutrófilos (**Figura 3B**), no entanto, houve aumento considerável na migração de monócitos (**Figura 3C**), enquanto que a migração de linfócitos não houve diferença significativa (**Figura 3D**).

O resultado desse estudo sugere papel fundamental da dipirona com ação em células da imunidade inata, como foi observado na redução de neutrófilos e monócitos, e com ausência de ação em linfócitos, células que representam a imunidade adaptativa. Além do mais, o aumento no recrutamento dos monócitos não necessariamente está relacionado a diferenciação e polarização dos monócitos no perfil de macrófagos pró-inflamatório, pois o estudo anterior com o tratamento de dipirona via intraplantar (Figura 2 A e B) indicou reduzir as citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α que são liberadas por este perfil inflamatório, sendo o próximo passo de verificar se há polarização dessas células em cultura *in vitro* de macrófagos tratados com dipirona.

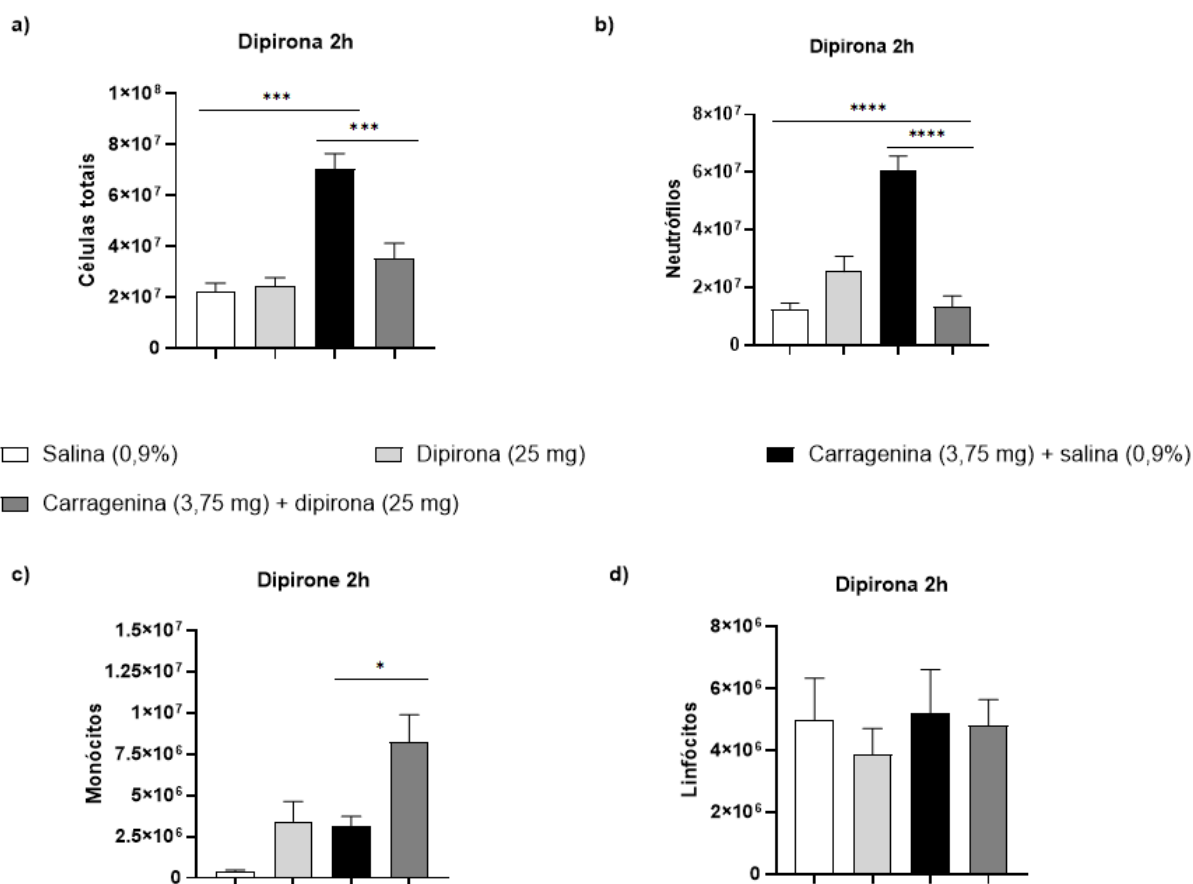


Figura 3 Avaliação da migração de células peritoneais induzida por meio de injeção intraperitoneal de 500 µL de carragenina (3,75 mg) ou solução salina, 2h antes da injeção peritoneal de 500 µL de dipirone (25 mg). O tratamento com dipirone após injeção de carragenina reduziu significativamente a migração de leucócitos totais no peritônio (a). O tratamento com dipirone após a injeção de carragenina reduziu significativamente a migração de neutrófilos (b). O tratamento com dipirone aumentou significativamente a migração de monócitos (c). Não foi observada diferença significativa entre os grupos na migração de linfócitos (d). Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média. ANOVA uma via, pós teste de Tukey *p<0.05.

5.4 EFEITO DA DIPIRONA NA POLARIZAÇÃO DE MACRÓFAGOS M1 E M2 EM CULTURA DE BMDM

Os efeitos da dipirone também foram investigados na cultura celular de macrófagos derivados da medula óssea polarizados no perfil de M1 (100 ng/mL de LPS e 20 ng/mL de IFN-γ) por 1 hora e 30 minutos. Após polarização do perfil M1, as células receberam tratamento com dipirone (1µM) por 4 horas e 30 minutos, sendo após esse período realizado a lise celular para extração do mRNA das células para análise da expressão gênica.

A expressão dos genes que codificam duas enzimas-chave para cada perfil

de macrófagos: iNOS que está relacionada ao perfil M1 e Arg-1 associada ao perfil M2. O tratamento *in vitro* com a dipirona reduziu significativamente ($p < 0.05$) a expressão gênica de iNOS (**Figura 4A**) enquanto houve aumento da expressão gênica de Arg-1 (**Figura 4B**).

A relação maior de Arg-1 e iNOS indica que o tratamento de dipirona pode estar relacionado ao processo de polarização do perfil pró-inflamatório M1 ao perfil anti-inflamatório M2 (**Figura 4C**). Este resultado corrobora com os dados anteriores avaliados pela redução do edema (Figura 1), redução das citocinas pró-inflamatórias (Figura 2 A e B), sugerindo a possível polarização dos macrófagos ao perfil M2 (Figura 3C) conforme demonstrado neste tópico (Figura 4).

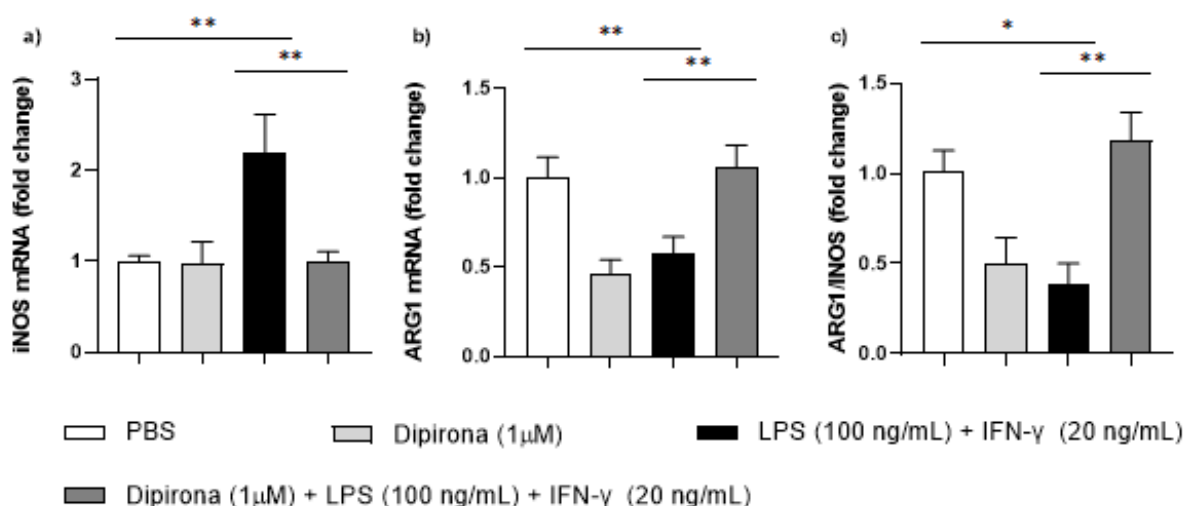


Figura 4 Tratamento *in vitro* de dipirona (1 μM) em cultura de BMDM com estímulo inflamatório de LPS (100 ng/ml) e IFN-γ (20 ng/ml). O tratamento de dipirona após o estímulo inflamatório de LPS e IFN-γ reduziu significativamente a expressão gênica de iNOS (a) e aumentou a expressão de Arg-1 (b). A relação entre as expressões gênicas de Arg-1 e iNOS mostra que as células que receberam o estímulo inflamatório e o tratamento de dipirona possuem uma expressão equilibrada entre Arg-1 e iNOS (c).

6 DISCUSSÃO

Embora a dipirona seja prescrita como um medicamento analgésico e anti-pirético, o seu mecanismo de ação tem sido descrito como um medicamento que inibe as enzimas COX-1 e 2, ou seja, uma atividade essencialmente anti-inflamatória com consequente redução da síntese de prostaglandinas (Jasiecka et al., 2014; Pierre et al., 2007). Entretanto, estudos têm demonstrado que, na verdade, o mecanismo analgésico da dipirona não está relacionado com uma possível inibição das enzimas COX-1 e COX-2. Ainda que o mecanismo de ação analgésica da dipirona não esteja completamente estabelecido, estudos realizados em nosso laboratório demonstraram que, por mais que a dipirona seja metabolizada em dois compostos bioativos, o 4-MAA e o 4-AA, ela é totalmente hidrolisada em 4-MAA no tecido periférico (Dos Santos et al., 2014). Isso indicou que o 4-MAA, por si só, é suficiente para induzir o efeito analgésico eficaz, independente da presença do 4-AA. Também, foi demonstrado que o efeito analgésico do 4-MAA depende da ativação dos receptores canabinoides CB2 e dos receptores opioides do tipo kappa, sugerindo que a redução da hiperalgesia inflamatória induzida pela carragenina se dá pela liberação de opioides endógenos e consequente ativação dos receptores kappa, sendo crível que o efeito da dipirona no tecido periférico não está associado a um efeito anti-inflamatório direto e pode depender da migração de células inflamatórias (Dos Santos et al., 2020).

Dessa forma, este estudo teve como objetivo principal verificar se o metabólico ativo e hidrolisado da dipirona, 4-MAA, é capaz de modular a resposta inflamatória. O termo “modular” é usado neste trabalho em um sentido diferente do termo “inibição” usado para explicar o mecanismo de ação dos inibidores da enzima COX, chamados de medicamentos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs). A inibição da produção e liberação de prostaglandina pelos AINEs conduz à uma diminuição dos aspectos clínicos da resposta inflamatória, tais como edema, hiperemia, calor e principalmente dor (Gunaydin et al., 2018). Neste estudo, procuramos estabelecer uma relação entre a ação do 4-MAA na redução dos aspectos clínicos da resposta inflamatória e a modulação desta resposta mediada pelo equilíbrio entre M1 e M2. Dessa forma, a diminuição de prostaglandinas está relacionada à diminuição da produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias.

Inicialmente, usamos o edema de pata produzido pela administração de

carragenina para avaliar um possível efeito anti-inflamatório produzido por doses mais elevadas de dipirona administrada no tecido periférico inflamado. A dipirona, ao ser diluída, é completamente hidrolisada, então a ação foi especificamente do metabólito 4-MAA (Pierre, et al., 2007). Dessa forma, o 4-MAA foi administrado 2 horas após a indução da inflamação. Logo, os resultados deste estudo mostraram que, como esperado, o efeito da dipirona se limitou a interromper o aumento do edema, mas não foi capaz de reduzir o edema já formado. É interessante lembrar que na maioria dos estudos envolvendo efeitos anti-inflamatórios de moléculas bioativas, estas foram administradas antes do agente inflamatório (Araldia et al., 2013). Embora esses protocolos não correspondem exatamente ao seu uso clínico, em modelos experimentais, o efeito anti-inflamatório máximo de uma única dose administrada apenas é possível ser verificado quando a molécula anti-inflamatória é administrada antes do agente inflamatório, pois essa não reverte o processo inflamatório já instalado, apenas interrompe a continuidade do mesmo (Cong et al., 2015). Este experimento inicial, portanto, serviu para estabelecermos a dose de dipirona a ser usada nos demais experimentos.

Estudos prévios realizados por nosso grupo indicaram que as doses de dipirona administradas localmente para promover analgesia são significativamente menores que as usadas neste estudo (Dos Santos et al., 2020). É importante salientar que as doses de dipirona administradas neste trabalho não se restringem a efeitos locais, ao contrário, podem ser consideradas sistêmicas. Entretanto, não avaliamos seus efeitos nas patas contralaterais ao estímulo inflamatório. Os resultados deste estudo sugerem que os efeitos observados foram predominantemente locais, uma vez que analisamos a liberação de citocinas pró- e anti-inflamatórias apenas na região inflamada das patas de ratos. Além disso, estudos demonstraram que doses analgésicas de dipirona não alteram a resposta inflamatória do tecido periférico (Levy et al., 1995).

A analgesia estabelecida pelo 4-MAA ocorre por meio da ativação dos receptores CB2 e dos receptores opioides kappa. Embora o receptor CB2 tenha um papel modulador na resposta imune, o 4-MAA reduz a hiperalgesia inflamatória pela liberação de opioides endógenos. A interação entre os sistemas canabinoide e opioide sugere um novo mecanismo para o tratamento da dor inflamatória, evitando efeitos colaterais indesejados do sistema nervoso central (Dos Santos et al., 2020).

No modelo de hiperalgesia induzida por carragenina, a analgesia do 4-MAA foi completamente bloqueada por um antagonista do receptor CB2. Em contraste, na hiperalgesia provocada por PGE2, essa dependência da ativação do receptor CB2 não foi observada. Essa discrepância pode ser atribuída ao fato de que a PGE2 (100 ng) não promove migração celular na mesma intensidade que a carragenina, sugerindo que a ação do 4-MAA está relacionada à migração de células inflamatórias (Cunha et al., 2008; Dos Santos et al., 2020; Dos Santos et al., 2014).

Além disso, o 4-MAA demonstrou não depender da ativação do receptor CB1, enquanto o 4-AA, outro metabolito da dipirona, exerce seu efeito analgésico mediado pelo receptor CB1. A liberação de dinorfina, um opioide endógeno que pode ser liberado pelas células imunes, pode ser a causa do efeito analgésico observado (Dos Santos et al., 2020).

Por outro lado, a dose de dipirona utilizada neste estudo reduziu drasticamente as citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α , enquanto aumentou a citocina anti-inflamatória IL-10. A IL-1 β é liberada durante a inflamação em resposta a lesões, estímulos inflamatórios ou patógeno, de forma a amplificar a resposta imune. Essa citocina inflamatória, liberada principalmente por macrófagos, fibroblastos e células endoteliais, induz a formação de mediadores inflamatórios finais, como as prostaglandinas, sensibilizando os nociceptores e contribuindo para a dor. A IL-1 β estimula a expressão da enzima COX-2, que, por sua vez, leva à produção de PGE2, um mediador que intensifica a dor e a inflamação. A IL-1 β , ao estimular a produção de PGE2, contribui para a sensibilização dos nociceptores, criando um ciclo de retroalimentação que intensifica a resposta inflamatória e a dor. Além disso, a PGE2 pode atuar em um feedback positivo sobre a produção de IL-1 β , perpetuando o estado inflamatório. Portanto, a interação entre a IL-1 β e a PGE2 é fundamental para a amplificação da resposta inflamatória, e suas sinergias são alvos de pesquisa para o desenvolvimento de terapias anti-inflamatórias (Zang & An, 2007; Molina-Holgado, 2000; Kawabata, 2011).

Outra citocina analisada neste estudo foi o TNF- α . Estas citocinas são produzidas principalmente por macrófagos e outras células da imunidade inata em resposta a lesões ou patógenos e tem sido considerada um importante fator desencadeador de processo inflamatório. Além disso, o TNF- α , em conjunto com a IL-

1 β , são capazes de modular positivamente sinais pró-inflamatórios para aumentar a expressão de quimiocinas e moléculas de adesão, essenciais no recrutamento de neutrófilos para se dar início à resposta imunológica (Meyer, 2003; Bazzoni & Beutler, 1996; Mehrad & Standiford, 1999).

Em contrapartida, os dados deste estudo demonstraram que a administração de dipirona no sítio inflamatório foi capaz de aumentar os níveis da citocina anti-inflamatória IL-10. Esta citocina, ao contrário da IL-1 β e TNF- α , tem função anti-inflamatória e é fundamental para manter a integridade dos tecidos, promover a homeostase, apoiar respostas imunológicas inatas e auxiliar na reparação tecidual em várias doenças inflamatórias e infecciosas. Diferentes células do sistema imunológico, como macrófagos, podem produzir esta citocina. A IL-10 é essencial para controlar as respostas imunológicas, evitando danos excessivos aos tecidos e mantendo o equilíbrio durante inflamações, por meio de uma inibição seletiva da expressão de genes pró-inflamatórios (Ouyang et al., 2011; Saraiva et al., 2010; Couper et al., 2008; Murray et al., 2006).

O efeito da dipirona em promover um aumento da citocina IL-10 sugere que o 4-MAA esteja, via ativação do receptor CB2 de células do sistema imune, modulando a resposta inflamatória. Este dado difere substancialmente da ação do anti-inflamatórios esteroidais, os quais inibem a resposta inflamatória como um todo. A ação imunossupressora dos anti-inflamatórios esteroidais ocorre por vários mecanismos que visam reduzir a atividade do sistema imunológico e controlar a inflamação. Esses medicamentos alteram a expressão de genes envolvidos na resposta imune e inflamatória, inibindo principalmente dois fatores de transcrição, a proteína ativadora-1 (AP-1) e o NF- κ B, o que afeta a expressão dos genes responsáveis pela produção de citocinas. Dessa forma, diminuem a sensibilidade de células endoteliais, neutrófilos e macrófagos aos estímulos inflamatórios, o que limita a mobilização e ativação dessas células durante uma resposta imune (Pitzalis et al., 1997; Stahn et al., 2007; Lindenfeld et al., 2004).

Ao contrário desse mecanismo, os dados deste trabalho sugerem que a dipirona aumenta a liberação de citocinas anti-inflamatórias, tal como a IL-10. Como comentado anteriormente, esta ação da dipirona se deve provavelmente à ação do 4-MAA nos receptores CB2 de células do sistema imune no tecido inflamado. Os

receptores CB2, predominantemente expressos em células do sistema imunológico, têm um papel crucial na regulação da inflamação e da resposta imune, particularmente nos macrófagos. A ativação desses receptores modula a resposta inflamatória, protegendo os tecidos contra danos exacerbados em condições inflamatórias (Simard et al., 2022).

Os macrófagos são células fundamentais no processo inflamatório, sendo responsáveis pela síntese e liberação de citocinas. Dois tipos principais de macrófagos são descritos no processo inflamatório, macrófagos estes que se diferenciam no tecido a partir da migração de monócitos oriundos do sangue (Duque & Descoteaux, 2014). Primeiramente, os M1 são ativados por sinais inflamatórios, como IFN- γ e LPS (Fabre et al., 2014), e produzem citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , TNF- α e IL-6, essenciais para a promoção da inflamação aguda (Chen et al., 2023). O metabolismo dos M1 é baseado principalmente na glicólise, o que lhes permite gerar energia rapidamente. A ativação do fator HIF-1 α aumenta a captação de glicose pela via glicolítica, essencial para a produção de ATP e lactato, sustentando suas funções pró-inflamatórias (Tannahill et al., 2013; Eming et al., 2017).

Por outro lado, os M2 são ativados por citocinas como IL-4 e IL-13 e desempenham funções anti-inflamatórias e pró-regenerativas. Eles liberam citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF- β , que não apenas suprimem a resposta inflamatória, mas também promovem a formação de novos vasos sanguíneos e a deposição de matriz extracelular, essenciais para a cicatrização de feridas. Além disso, os M2 são fundamentais na remoção de células apoptóticas, garantindo um processo de regeneração saudável e a restauração da homeostase tecidual. Eles são fundamentais para a resolução da inflamação e o reparo tecidual (Chen et al., 2023; Eming et al., 2017). Diferentemente dos M1, os M2 utilizam ácidos graxos e a fosforilação oxidativa como principais fontes de energia, o que sustenta suas funções reparadoras (Vats et al., 2006; Eming et al., 2017).

Dessa forma, os macrófagos desempenham um papel fundamental não apenas na resposta inflamatória, mas também na transição entre a inflamação e a regeneração tecidual. A diferenciação entre M1 e M2 é essencial para garantir que a resposta imune seja adequada e que a cicatrização ocorra de maneira eficiente. Enquanto os M1 são predominantes nas fases iniciais da inflamação, combatendo

infecções e removendo células danificadas, os M2 entram em cena posteriormente, promovendo a resolução da inflamação e facilitando o reparo do tecido. A mudança de M1 para M2 é influenciada pelas citocinas e fatores do microambiente, que são cruciais para o sucesso da cicatrização (Chen et al., 2023; Eming et al., 2017).

A diferenciação dos macrófagos é um processo altamente dinâmico, permitindo que essas células imunológicas mudem rapidamente de um fenótipo para outro em resposta a sinais do microambiente. Por exemplo, a ativação das vias de sinalização, como a do NF- κ B, pode direcionar os macrófagos para polarizações em M1 ou M2 em diferentes condições patológicas, configurando-se como um regulador crucial da plasticidade desses celulares durante a progressão de diversas doenças. Na fase inicial da inflamação, ocorre a ativação do NF- κ B em macrófagos do tipo M1. Entretanto, nas fases tardias, esses macrófagos reprogramam-se para um fenótipo M2, apresentando baixa ativação do NF- κ B e um perfil anti-inflamatório (Wang et al., 2014; Biswas et al., 2006; Porta et al., 2009).

Essa cuidadosa regulação entre M1 e M2 é crucial para manter um equilíbrio eficaz entre a defesa imunológica e o reparo tecidual. Esse equilíbrio é fundamental para evitar inflamações crônicas e assegurar uma recuperação adequada dos tecidos, já que a ativação excessiva dos M1 pode levar a condições inflamatórias crônicas, enquanto a deficiência na ativação dos M2 pode resultar em cicatrização prejudicada e fibrose tecidual (Pedrioli et al., 2013; Eming et al., 2017; Wang et al., 2014; Oishi & Manabe, 2018; Mosser, 2003).

Além disso, estudos mostraram que, quando os receptores CB2 são ativados por agonistas, há uma modulação do fenótipo dos macrófagos, promovendo a polarização para o M2. Dessa forma, a ativação dos receptores CB2 resulta em uma ação anti-inflamatória, a qual auxilia na resolução da inflamação e no reparo tecidual. A polarização é acompanhada de um aumento na expressão de marcadores típicos do M2 e da produção de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10. Enquanto isso, a ativação do receptor CB2 inibe a polarização para o fenótipo M1, de forma a reduzir a produção das citocinas TNF- α e IL-1 β , além de diminuir a atividade de fatores de transcrição como NF- κ B. Isso contribui para a atenuação de processos inflamatórios (Wu et al., 2020; Tortora et al., 2022). Estudos sobre a interação entre os fenótipos de macrófagos e suas redes moleculares são essenciais para compreender melhor essa

plasticidade.

Os dados deste estudo também sugerem que a administração de dipirona após a administração de carragenina aumenta significativamente a migração de monócitos para o local da inflamação. A carragenina causa inflamação na cavidade peritoneal por meio da liberação de mediadores inflamatórios pelas células residentes. Esse processo provoca o rolamento e adesão de neutrófilos em células endoteliais e a migração extravascular (Németh e Mócsai, 2012). Além disso, durante a inflamação, os monócitos circulantes migram dos vasos sanguíneos para o tecido inflamado. De acordo com os fatores de crescimento e citocinas presentes no local, essas células se diferenciam em macrófagos (Epelman et al., 2014; Nourshargh e Alon, 2014).

Essa migração é crucial, uma vez que os monócitos desempenham um papel vital na resposta inflamatória e na modulação da resposta imune. A presença aumentada de monócitos no sítio inflamado pode facilitar a rápida resposta a lesões, promovendo a produção de citocinas e fatores de crescimento que contribuem para a resolução da inflamação e a regeneração do tecido (Wang et al., 2014; Oishi & Manabe, 2018).

Além disso, a dipirona diminui a migração de neutrófilos, mas não altera a migração de linfócitos, sugerindo um efeito seletivo da droga sobre a dinâmica celular no microambiente inflamatório. Os neutrófilos são células essenciais do sistema imunológico e desempenham um papel crucial na resposta inflamatória, sendo os primeiros leucócitos a migrar para o local da inflamação em resposta a sinais de danos teciduais ou infecções. Eles são rapidamente recrutados por mediadores químicos, como quimiocinas e citocinas, e sintetizam várias citocinas, IL-1 β , TNF- α e CXCL-1, que amplificam a resposta imunológica e contribuem para a sinalização de outras células do sistema imunológico (Havixbeck et al., 2016; Mantovani et al., 2011; Tecchio et al., 2014).

Além disso, os neutrófilos expressam a COX-2, cuja ativação é crucial para a síntese de prostaglandinas. A IL-1 β desempenha um papel fundamental nesse processo ao induzir a expressão da COX-2, que converte o ácido araquidônico em prostaglandinas, como a PGE2. A liberação de prostaglandinas é um aspecto importante, pois elas são responsáveis por promover dor e febre, facilitando o

aumento do fluxo sanguíneo e a infiltração de outras células do sistema imunológico. Dessa forma, as prostaglandinas modulam a função de outros leucócitos, promovendo a migração e ativação de macrófagos, essenciais para a continuidade da resposta imune. O equilíbrio na produção de prostaglandinas e outros mediadores inflamatórios é crucial para a resolução adequada da inflamação, ajudando na proteção contra infecções e na promoção da cura tecidual (Fitzpatrick, 2005; Loynes et al., 2018; Osma-Garcia et al., 2016).

Nosso grupo de pesquisa mostrou que a ausência de COX-2 nas células neutrofílicas agrava a intensidade do processo inflamatório induzido pela carragenina. Além disso, a exacerbação inflamatória está associada ao aumento de mediadores inflamatórios, como IL-1 β e CXCL-1, e à migração de neutrófilos. (Carvalho et al., 2022).

Como mencionado anteriormente, a presença de dois fenótipos distintos de macrófagos, M1 e M2, é fundamental para o desenvolvimento e resolução da resposta imune. Os M1 desempenham um papel crucial na fase inicial da inflamação, promovendo uma resposta pró-inflamatória, caracterizada pela produção de citocinas como TNF- α , IL-6 e IL-1 β , além de moléculas como o óxido nítrico (NO) gerado pela enzima iNOS (MacMicking et al., 1997; Chen et al., 2023). Por outro lado, os M2 são responsáveis por regular a fase de resolução da inflamação e promover a reparação tecidual, ajudando a conter a inflamação excessiva e a evitar danos prolongados aos tecidos. Eles produzem citocinas anti-inflamatórias, como IL-10, e expressam enzimas como a arginase-1, que converte arginina em ornitina, uma molécula envolvida na regeneração tecidual (Rath et al., 2014; Chen et al., 2023).

Dessa forma, investigamos os fenótipos adquiridos pelos macrófagos a partir de seu estado neutro (M0), quando estimulados com mediadores inflamatórios e dipirona. Utilizamos a expressão de iNOS e ARG-1 como marcadores indiretos para identificar a polarização dos macrófagos para os tipos M1 e M2, respectivamente. A iNOS é amplamente aceita como um marcador confiável de M1 devido à sua função na produção de NO, um mediador inflamatório chave. Da mesma forma, a ARG-1 é reconhecida como um marcador de M2, associada ao reparo tecidual e à resolução inflamatória. Estes marcadores têm sido validados em diversos estudos como indicadores da polarização de macrófagos, oferecendo um meio indireto eficaz para

avaliar o fenótipo predominante em um ambiente inflamatório (Rath et al., 2014; Orecchioni et al., 2019).

Os resultados deste trabalho sugerem que a dipirona é capaz de equilibrar a presença de M1 e M2 no sítio inflamatório. Esses dados indicam fortemente um mecanismo de ação da dipirona, que, em doses maiores do que as recomendadas para analgesia, promove a modulação da resposta inflamatória, conduzindo à redução da inflamação mediada por M1 e ao aumento da resposta mediada por M2. Como descrito anteriormente, a dipirona, provavelmente atuando sobre os receptores canabinoides tipo CB2 no sistema imune do tecido periférico, favorece a polarização dos macrófagos para o fenótipo M2. Os M2 desempenham um papel crucial na fase de resolução da inflamação, secretando fatores anti-inflamatórios e promovendo a regeneração tecidual (Wu et al., 2020; Tortora et al., 2022).

7 CONCLUSÃO

A dipirona é um dos medicamentos mais utilizados no Brasil, destacando-se por seu baixo custo, baixa toxicidade e efeitos colaterais menores em comparação com outros fármacos utilizados no tratamento da dor. Apesar de sua ampla utilização clínica no país, os mecanismos de ação da dipirona ainda não estão completamente elucidados.

Os dados deste estudo sugerem que a dipirona, em doses superiores às recomendadas para analgesia (25 mg), é capaz de reduzir o edema e citocinas pró-inflamatórias (modular a resposta inflamatória, promovendo um equilíbrio entre M1 e M2). Portanto, a administração local de dipirona pode se revelar um importante agente regenerativo e reparador dos tecidos periféricos. Além disso, os resultados deste estudo demonstram que, ao contrário do que se acreditava, o mecanismo de ação anti-inflamatório da dipirona difere dos AINEs e dos corticosteroides.

REFERÊNCIAS

- Adib-Conquy, M., Cavaillon, J. M. (2007). Stress molecules in sepsis and systemic inflammatory response syndrome. *FEBS let.*, 581, 3723–3733.
- Aguggia, M. (2003). Neurophysiology of pain. *Neurological Sciences*, 24(Suppl 2), S57-S60.
- Akira, S., Takeda, K., Kaisho, T. (2001). Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol.* 2, 675–680.
- Araldi, D., Ferrari, L. F., Lotufo, C. M., Vieira, A. S., Athié, M. C., Figueiredo, J. G., Duarte, D. B., Tambeli, C. H., Ferreira, S. H., & Parada, C. A. (2013). 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*, 110(9), 3603–3608. <https://doi.org/10.1073/pnas.1220668110>
- Atri, C., Guerfali, F. Z., Laouini, D. (2018). Role of Human Macrophage Polarization in Inflammation during Infectious Diseases. *International journal of molecular sciences*, 19, 1801. doi: 10.3390/ijms19061801
- Basak, S., Kim, H., Kearns, J.D., Tergaonkar, V., O'Dea, E. (2007). Werner SL, Benedict CA, Ware CF, Ghosh G, Verma IM. A fourth I κ B protein within the NF- κ B signaling module. *Cell.*; 128, 369–381.
- Basbaum, A. I., Bautista, D. M., Grégory, S., Julius, D. (2009). Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. *Cell*, 139, 267-284. doi: 10.1016/j.cell.2009.09.028.
- Basbaum, A. I., Jessell, T. (1999). The Perception of Pain. In: Kandel, ER.; Schwartz, J.; Jessell, T. *Principles of Neuroscience*. New York: Appleton and Lange, 2000., 472-491. doi: 10.6064/2012/561761
- Bazzoni F, Beutler B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Engl J Med* 1996; 334(26): 1717-25.
- Befort K. (2015). Interactions of the opioid and cannabinoid systems in reward: Insights from knockout studies. *Frontiers in pharmacology*, 6, 6. doi: 10.3389/fphar.2015.00006
- Benard, C., Cultrone, A., Michel, C., Rosales, C., Segain, J.P., Lahaye, M. (2010).

Degraded carrageenan causing colitis in rats induces TNF secretion and ICAM-1 upregulation in monocytes through NF-kappaB activation. PLoS One. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008666>.

Bhattacharyya, S., Gill, R., Ling Chen, M., Zhang, F., Linhardt, R. J., Dudeja, P.K. (2008) Toll-like receptor 4 mediates induction of the Bcl10-NF_B-interleukin-8 inflammatory pathway by carrageenan in human intestinal epithelial cells. J Biol Chem. <https://doi.org/10.1074/jbc.M708833200>.

Biswas, S K, Gangi L, Paul S, Schioppa T, Saccani A, Sironi M, et al. A distinct and unique transcriptional program expressed by tumor-associated macrophages (defective NF-kappa Band enhanced IRF-3/STAT1 activation). Blood (2006) 107(5):2112–22. doi:10.1182/blood-2005-01-0428 107.

Bonica, J.J. (1990). The management of pain (2nd ed.). Philadelphia, PA.

Brennan, J. J., & Gilmore, T. D. (2018). Evolutionary Origins of Toll-like Receptor Signaling. Molecular biology and evolution, 35(7), 1576–1587. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy050>

Campbell, W. B., & Halushka, P. V. (1996). Lipid-derived autacoids: Eicosanoids and platelet-activating factor. In J. G. Hardman, L. E. Limbird, et al. (Eds.), Goldman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics (International Edition, pp. 601-606). McGraw-Hill.

Carvalho, N. S., Lemes, J. B. P., Pagliusi, M., Jr, Machado, A. C. D. S., Malange, K. F., Pral, L. P., Fachi, J. L., Nishijima, C. M., Dos Santos, G. G., Tambeli, C. H., Sartori, C. R., Vinolo, M. A. R., & Parada, C. A. (2022). Neutrophil-Derived COX-2 has a Key Role during Inflammatory Hyperalgesia. Inflammation, 45(6), 2280–2293. <https://doi.org/10.1007/s10753-022-01690-5>

Chen, L., Deng, H., Cui, H., Fang, J., Zuo, Z., Deng, J., Li, Y., Wang, X., & Zhao, L. (2018). Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. Oncotarget, 9(6), 7204–7218. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23208>

Chen, S., Saeed, A.F., Liu, Q. et al. Macrophages in immunoregulation and therapeutics. Sig Transduct Target Ther 8, 207 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41392->

023-01452-1

Cohen, S. M., & Ito, N. (2002). A Critical Review of the Toxicological Effects of Carrageenan and Processed Eucheuma Seaweed on the Gastrointestinal Tract. *Critical Reviews in Toxicology*, 32(5), 413–444. <https://doi.org/10.1080/20024091064282>

Collins, T. (2000). Inflamação aguda e cr nica. In: COTRAN, S; KUMAR, V; COLLINS, T. *Patologia estrutural e funcional*. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 44-78.

Cong HH, Khaziakhmetova VN, Zigashina LE. Rat paw oedema modeling and NSAIDs: Timing of effects. *Int J Risk Saf Med*. 2015;27 Suppl 1:S76-7. doi: 10.3233/JRS-150697. PMID: 26639722.

Couper, K., Blount, D., & Riley, E. (2008). IL-10: The Master Regulator of Immunity to Infection. *The Journal of Immunology*, 180, 5771 - 5777. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.9.5771>.

Cummins, T., Sheets, P. L., & Waxman, S. (2007). The roles of sodium channels in nociception: Implications for mechanisms of pain. *Journal of Pain*, 129(3), 343-357. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2007.07.026>

Cunha, F. Q., Lorenzetti, B. B., Poole, S. & Ferreira, S. H. (1991). Interleukin-8 as a mediator of sympathetic pain. *Br. J. Pharmacol.* 104, 765–767.

Cunha, F. Q., Poole, S., Lorenzetti, B. B. & Ferreira, S. H. (1992). The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. *Br. J. Pharmacol.* 107, 660–664.

Cunha, L., Grenha, A. (2016). Sulfated seaweed polysaccharides as multifunctional materials in drug delivery applications mar. *Drugs*. <https://doi.org/10.3390/md14030042>

Czerkies, M., Kwiatkowska, K. (2014). Toll-Like Receptors and their Contribution to Innate Immunity: Focus on TLR4 Activation by Lipopolysaccharide. *Adv Cell Biol.* 4, 1–23.

Davis, A., Robson J. The dangers of NSAIDs: look both ways. *Br J Gen Pract.* 2016

Apr;66(645):172-3. doi: 10.3399/bjgp16X684433. PMID: 27033477; PMCID: PMC4809680.

de Moraes-Zani, K., Nunes, F. P., da Silva, J. B., Ferreira, M. J., Grego, K. F., Lopes-Ferreira, M., Tanaka, A. S., & Tanaka-Azevedo, A. M. (2013). The anti-inflammatory action of Bothrops jararaca snake antithrombin on acute inflammation induced by carrageenan in mice. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]*, 62(8), 733–742. doi: 10.1007/s00011-013-0628-x

Dib-Hajj, S., Cummins, T., Black, J., & Waxman, S. (2010). Sodium channels in normal and pathological pain. *Annual Review of Neuroscience*, 33(1), 325-347. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-060909-153234>

Dinarello, C. A. (1996). Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*, 87(6), 2095-2147.

Djoughri, L. (2016). Aδ-fiber low threshold mechanoreceptors innervating mammalian hairy skin: A review of their receptive, electrophysiological and cytochemical properties in relation to Aδ-fiber high threshold mechanoreceptors. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 61, 225-238. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2015.12.009>.

dos Santos, G. G. (2018) Mecanismo de ação analgésica da dipirona: Envolvimento dos receptores canabinóides CB1 e CB2 no tecido periférico. 2018. 71 f. Dissertação (Doutorado) - Curso de Biologia Funcional e Molecular na Área de Fisiologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

dos Santos, G. G., Dias, E. V., Teixeira, J. M., Athie, M. C., Bonet, I. J., Tambeli, C. H., & Parada, C. A. (2014). The analgesic effect of dipyrone in peripheral tissue involves two different mechanisms: neuronal K(ATP) channel opening and CB(1) receptor activation. *European journal of pharmacology*, 741, 124–131. doi: 10.1016/j.ejphar.2014.07.019

dos Santos, G. G., Li, R., Ng, M., Lemes, J., Vieira, W. F., Nagy, I., Tambeli, C. H., Parada, C. A. (2020b). CB1 receptor-dependent desensitisation of TRPV1 channels contributes to the analgesic effect of dipyrone in sensitised primary sensory neurons. *British journal of pharmacology*, 177, 4615–4626. doi: 10.1111/bph.15170

dos Santos, G. G., Vieira, W. F., Vendramini, P. H., Bassani da Silva, B., Fernandes Magalhães, S., Tambeli, C. H., Parada, C. A. (2020a) Dipyrone is locally hydrolyzed to 4-methylaminoantipyrine and its antihyperalgesic effect depends on CB2 and kappa-opioid receptors activation. *European journal of pharmacology*, 874, 173005. doi: 10.1016/j.ejphar.2020.173005

Edwards, J., Meseguer, F., Faura, C., Moore, R. A., McQuay, H. J., Derry, S. (2010). Single dose dipyrone for acute postoperative pain. *The Cochrane database of systematic reviews*, 9. doi: 10.1002/14651858.CD003227.pub2

Eming, S. A., Wynn, T. A., & Martin, P. (2017). Inflammation and metabolism in tissue repair and regeneration. *Science (New York, N.Y.)*, 356(6342), 1026–1030. <https://doi.org/10.1126/science.aam7928>

England, S., Bevan, S., & Docherty, R. J. (1996). PGE2 modulates the tetrodotoxin-resistant sodium current in neonatal rat dorsal root ganglion neurones via the cyclic AMP-protein kinase A cascade. *Journal of Physiology*, 495(Pt 2), 429-440.

Epelman S, Lavine KJ, Randolph GJ. 2014. Origin and functions of tissue macrophages. *Immunity* 41(1):21-35.

Fabre, T., Kared, H., Friedman, S. L., & Shoukry, N. H. (2014). IL-17A enhances the expression of profibrotic genes through upregulation of the TGF- β receptor on hepatic stellate cells in a JNK-dependent manner. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 193(8), 3925–3933. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400861>

Ferreira, S. H. (1972). Prostaglandins, aspirin-like drugs and analgesia. *Nature New Biology*, 240, 200-203.

Ferreira, S. H. (1973). Inflammation, prostaglandins and aspirin-like drugs. *Transactions of the Medical Society of London*, 89, 20-31.

Ferreira, S. H., & Vane, J. R. (1967). Prostaglandins: their disappearance from and release into the circulation. *Nature*, 216, 868-873.

Ferreira, S. H., Lorenzetti, B. B. & Poole, S. (1993). Bradykinin initiates cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia. *Br. J. Pharmacol.* 110, 1227–1231.

Fitzpatrick, F. 2005. Cyclooxygenase enzymes: Regulation and function. *Current Pharmaceutical Design* 10: 577–588. <https://doi.org/10.2174/1381612043453144>.

Floege, J., Lüscher, B., Müller-Newen, G.(2012). Cytokines and inflammation. *European Journal of Cell Biology*, 91 (6-7), 427. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2012.01.003>.

Garcia-Leme, J. (1989). *Hormones and inflammation*. Boca Raton: CRC Press.

Gold, M. S., Levine, J. D., & Correa, A. M. (1998). Modulation of TTX-R INa by PKC and PKA and their role in PGE2-induced sensitization of rat sensory neurons in vitro. *Journal of Neuroscience*, 18(24), 10345-10355.

Gunaydin et al., 2018)C., & Bilge, S. S. (2018). Effects of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs at the Molecular Level. *The Eurasian journal of medicine*, 50(2), 116–121. <https://doi.org/10.5152/eurasianjmed.2018.0010>.

Gwanyanya, A., Macianskiene, R., Mubagwa, K. (2012). Insights into the effects of diclofenac and other non-steroidal anti-inflammatory agents on ion channels. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 64, 1359–1375. doi: 10.1111/j.2042-7158.2012.01479.x

Hannood, S., Nasuruddin, D. N.(2022) Acute Inflammatory Response. [Updated 2022 Nov 14]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK556083/>

Havixbeck, Jeffrey J., Aja M. Rieger, Michael E. Wong, Jordan W. Hodgkinson, and Daniel R. Barreda. 2016. Neutrophil contributions to the induction and regulation of the acute inflammatory response in teleost fish. *Journal of Leukocyte Biology* 99: 241–252. <https://doi.org/10.1189/jlb.3hi0215-064r>.

Hay, C., & De Belleruche, J. (1997). Carrageenan-induced hyperalgesia is associated with increased cyclo-oxygenase-2 expression in spinal cord. *Neuroreport*, 8(5), 1249-1251.

Henschke, N., Kamper, S. J., & Maher, C. G. (2015). The epidemiology and economic consequences of pain. *Mayo Clinic proceedings*, 90(1), 139–147.

<https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2014.09.010>

Huang, J., Zhang, X., & McNaughton, P. A. (2006). Inflammatory pain: the cellular basis of heat hyperalgesia. *Current Neuropharmacology*, 4(3), 197-206.

Ibrahim, M. M., Porreca, F., Lai, J., Albrecht, P. J., Rice, F. L., Khodorova, A., Davar, G., Makriyannis, A., Vanderah, T. W., Mata, H. P., Malan, T. P., Jr (2005). CB2 cannabinoid receptor activation produces antinociception by stimulating peripheral release of endogenous opioids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 3093–3098. doi: 10.1073/pnas.0409888102

Julius, D., & Basbaum, A. I. (2001). Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, 413(6852), 203-210.

Kaminska, B. (2005) MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy--from molecular mechanisms to therapeutic benefits. *BBA.*, 1754, 253–262.

Kashfi, K.; Kannikal, J.; Nath, N. (2021) Macrophage Reprogramming and Cancer Therapeutics: Role of iNOS-Derived NO. *Cells*, 10, 3194. <https://doi.org/10.3390/cells10113194>

Kawabata A. (2011). Prostaglandin E2 and pain--an update. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 34(8), 1170–1173. <https://doi.org/10.1248/bpb.34.1170>

Khasar, S. G., Ouseph, A. K., Chou, B., Ho, T., Green, P. G., & Levine, J. D. (1995). Is there more than one prostaglandin E receptor subtype mediating hyperalgesia in the rat hindpaw? *Neuroscience*, 64(4), 1161-1165.

Koerber, H. R., Mirnics, K., Brown, P. B., & Mendell, L. M. (1994). Central sprouting and functional plasticity of regenerated primary afferents. *Journal of Neuroscience*, 14(6), 3655-3671.

Kohama, I., Ishikawa, K., & Kocsis, J. D. (2000). Synaptic reorganization in the substantia gelatinosa after peripheral nerve neuroma formation: aberrant innervation of lamina II neurons by A β afferents. *Journal of Neuroscience*, 20(4), 1538-1549.

Konijnenbelt-Peters, J., van der Heijden, C., Ekhart, C., Bos, J., Bruhn, J., Kramers, C.

(2017). Metamizole (Dipyrone) as an Alternative Agent in Postoperative Analgesia in Patients with Contraindications for Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs. *Pain practice: the official journal of World Institute of Pain*, 17, 402–408. doi: 10.1111/papr.12467

Kuhn, D. C., & Willis, A. L. (1973). Proceedings: Prostaglandin E₂, inflammation and pain threshold in rat paws. *British Journal of Pharmacology*, 49(1), 183-184.

Lee, M. C., Mouraux, A., & Iannetti, G. D. (2009). Characterizing the cortical activity through which pain emerges from nociception. *Journal of Neuroscience*, 29(24), 7909-7916. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0014-09.2009>

Levy, L. (1969). Carrageenan paw edema in the mouse. *Life Sci.*, 11, 601–6.

Levy, M., Zylber-Katz, E. & Rosenkranz, B. Clinical Pharmacokinetics of Dipyrone and its Metabolites. *Clin. Pharmacokinet.* 28, 216–234 (1995). <https://doi.org/10.2165/00003088-199528030-00004>

Lopes, A.H., Silva, R.L., Fonseca, M.D. (2020). Molecular basis of carrageenan-induced cytokines production in macrophages. *Cell Commun Signal* 18, 141. <https://doi.org/10.1186/s12964-020-00621-x>

Lorenzetti, B. B., Veiga, F. H., Canetti, C. A., Poole, S., Cunha, F. Q. & Ferreira, S. H. (2002). *Eur. Cytokine Network*, 13, 456–461.

Loynes, Catherine A., Jou A. Lee, Anne L. Robertson, Michael Jg Steel, Felix Ellett, Yi. Feng, Bruce D. Levy, Moira K B. Whyte, and Stephen A. Renshaw. 2018. PGE₂ production at sites of tissue injury promotes an anti-inflammatory neutrophil phenotype and determines the outcome of inflammation resolution in vivo. *Science advances* 4: eaar8320. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aar8320>

Lutz, M. (2019). Metamizole (Dipyrone) and the Liver: A Review of the Literature. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 59(11), 1433–1442. doi:10.1002/jcph.1512

MacMicking, J., Xie, Q., & Nathan, C. (1997). Nitric oxide and macrophage function.. *Annual review of immunology*, 15, 323-50 . <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.IMMUNOL.15.1.323>.

Mantovani A., Biswas S., Galdiero M., Sica A., Locati M. (2013). Macrophage Plasticity and Polarization in Tissue Repair and Remodelling. *J Pathol*, 229 (2),176–85. doi: 10.1002/path.4133

Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in immunology*, 25, 677–686. doi: 10.1016/j.it.2004.09.015

Mantovani, Alberto, Marco A. Cassatella, Claudio Costantini, and Sébastien. Jaillon. (2011). Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology*11: 519–531. <https://doi.org/10.1038/nri3024>. Nature Publishing Group

Maytalman, E., Samur, D. N., Gunizi, O. C., Kozanoglu, I. (2023). The effects of metamizole on hematopoietic progenitor cells: Suppression of hematopoiesis stimulation in vitro. *Bratislavske lekarske listy*, 124(4), 320–329. https://doi.org/10.4149/BLL_2023_049

McMahon, S. B., & Koltzenburg, M. (1990b). Novel classes of nociceptors: beyond Sherrington. *Trends in Neurosciences*, 13(6), 199-201.

McMahon, S., & Koltzenburg, M. (1990a). The changing role of primary afferent neurones in pain. *Pain*, 43(3), 269-272.

Mehrad B, Standiford TJ. Role of cytokines in pulmonary antimicrobial host defense. *Immunol Res* 1999; 20(1): 15-27.

Meyer O. Role of TNF- α lpha and cytokines in the physiopathology of rheumatoid arthritis. Therapeutic perspectives. *Bull Acad Natl Med* 2003; 187935954

Millan, M. J. (1999). The induction of pain: an integrative review. *Prog. Neurobiol.*, 57, 1–164. doi: 10.1016/s0301-0082(98)00048-3

Molina-Holgado, E., Ortiz, S., Molina-Holgado, F., & Guaza, C. (2000). Induction of COX-2 and PGE(2) biosynthesis by IL-1beta is mediated by PKC and mitogen-activated protein kinases in murine astrocytes. *British journal of pharmacology*, 131(1), 152–159. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703557>

Mosser, D. M. The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol* (2003) 73(2):209–12. doi:10.1189/jlb.0602325

Murray, P. (2006). Understanding and exploiting the endogenous interleukin-10/STAT3-mediated anti-inflammatory response.. *Current opinion in pharmacology*, 6 4, 379-86 . <https://doi.org/10.1016/J.COPH.2006.01.010>.

Narumiya, S., Sugimoto, Y., Ushikubi, F. (1999). Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev.*, 79, 1193-226. doi: 10.1152/physrev.1999.79.4.1193

Nathan C. (2008). Metchnikoff's Legacy in 2008. *Nature immunology*, 9, 695–698. doi: 10.1038/ni0708-695

Németh T, Mócsai A (2012) The role of neutrophils in autoimmune diseases. *Immunol Lett* 143(1):9–19

Netea, M. G., Balkwill, F., Chonchol, M., Cominelli, F., Donath, M. Y., ... Dinarello, C. A. (2017). A guiding map for inflammation. *Nature immunology*, 18, 826–831. doi: 10.1038/ni.3790

Nourshargh S, Alon R. 2014. Leukocyte migration into inflamed tissues. *Immunity* 41(5):694-707.

Oishi, Y., & Manabe, I. (2018). Macrophages in inflammation, repair and regeneration. *International Immunology*, 30, 511–528. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxy054>.

Orecchioni M, Ghosheh Y, Pramod AB and Ley K (2019) Macrophage Polarization: Different Gene Signatures in M1(LPS+) vs. Classically and M2(LPS–) vs. Alternatively Activated Macrophages. *Front. Immunol.* 10:1084. doi: 10.3389/fimmu.2019.01084

Osma-Garcia, I.C., Punzón, C., Fresno, M. and Díaz-Muñoz, M.D. (2016), Dose-dependent effects of prostaglandin E2 in macrophage adhesion and migration. *Eur. J. Immunol.*, 46: 677-688. <https://doi.org/10.1002/eji.201545629>

Ouyang, W., Rutz, S., Crellin, N., Valdez, P., & Hymowitz, S. (2011). Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease.. *Annual review of immunology*, 29, 71-109. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-031210-101312>.

Pannell, M., Labuz, D., Celik, M. Ö., Keye, J., Batra, A., Siegmund, B., Machelska, H. (2016). Adoptive transfer of M2 macrophages reduces neuropathic pain via opioid peptides. *Journal of neuroinflammation*, 13, 262. doi: 10.1186/s12974-016-0735-z

Park, J. Y., Pillinger, M. H., & Abramson, S. B. (2006). Prostaglandin E2 synthesis and secretion: the role of PGE2 synthases. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)*, 119(3), 229–240. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2006.01.016>

Pasparakis, M., Luedde, T., Schmidt-Supprian, M. (2006). Dissection of the NF- κ B signalling cascade in transgenic and knockout mice. *Cell Death Differ.*, 13, 861–872.

Pierre, S. C., Schmidt, R., Brenneis, C., Michaelis, M., Geisslinger, G., Scholich, K. (2007). Inhibition of cyclooxygenases by dipyrone. *British journal of pharmacology*, 151, 494–503. doi: 10.1038/sj.bjp.0707239

Poole, S., Cunha, F. Q., & Ferreira, S. H. (1999). Hyperalgesia from subcutaneous cytokine. *Cytokines and Pain*, 59-87.

Porreca, F., Lai, J., Bian, D., Wegert, S., Ossipov, M. H., Eglen, R. M., Kassotakis, L., Novakovic, S., Rabert, D. K., Sangameswaran, L., & Hunter, J. C. (1999). A comparison of the potential role of the tetrodotoxin-insensitive sodium channels, PN3/SNS and NaN/SNS2, in rat models of chronic pain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(14), 7640-7644.

Porta C, Rimoldi M, Raes G, Brys L, Ghezzi P, DiLiberto D, et al. Tolerance and M2 (alternative) macrophage polarization a rerealted processes orchestrated by p50 nuclear factor kappa B. *Proc Natl Acad Sci USA* (2009) 106(35):14978–83. doi:10.1073/pnas.0809784106

Rath, M., Müller, I., Kropf, P., Closs, E., & Munder, M. (2014). Metabolism via Arginase or Nitric Oxide Synthase: Two Competing Arginine Pathways in Macrophages. *Frontiers in Immunology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00532>.

Riedel, W., Neeck, G. (2001). Nociception, pain, and antinociception: current concepts. *Zeitschrift Für Rheumatologie*, 60, 404-415. doi: <https://doi.org/10.1007/s003930170003>

Rogosch, T., Sinning, C., Podlewski, A., Watzer, B., Schlosburg, J., Lichtman, A. H., Cascio, M. G., Bisogno, T., Di Marzo, V., Nüsing, R., Imming, P. (2012). Novel bioactive metabolites of dipyron (metamizol). *Bioorganic & medicinal chemistry*, 20, 101–107. doi: 10.1016/j.bmc.2011.11.028

Rosenfeld, G. (1971). Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. In: Burcherl W, Buckley EE, Deulofeu V, editors. *Venomous animals and their venoms*. New York: Academic Press, 345–841.

Rothwell, N. J., & Luheshi, G. N. (2000). Interleukin 1 in the brain: biology, pathology and therapeutic target. *Trends in Neurosciences*, 23(12), 618-625.

Rubartelli, A., Lotze, M. T. (2007). Inside, outside, upside down: damage-associated molecular-pattern molecules (DAMPs) and redox. *Trends immunol.*, 28, 429–436.

Sabatowski, R., Schafer, D., Kasper, S. M., Brunsch, H., Radbruch L. (2004). Pain Treatment: A Historical Overview. *Current Pharmaceutical Design*, 10, 701-716. doi: 10.2174/1381612043452974

Saraiva, M., & O'Garra, A. (2010). The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nature Reviews Immunology*, 10, 170-181. <https://doi.org/10.1038/nri2711>.

Scheurlen, K. M., Snook, D. L., Gardner, S. A., Eichenberger, M. R., Galandiuk, S. (2021). Macrophage Differentiation and Polarization into an M2-Like Phenotype using a Human Monocyte-Like THP-1 Leukemia Cell Line. *J. Vis. Exp.*, 174. doi:10.3791/62652.

Schmid, T, Brüne, B. (2021). Prostanoids and Resolution of Inflammation – Beyond the Lipid-Mediator Class Switch. *Front. Immunol.*, 12, 714042. doi: 10.3389/fimmu.2021.714042

Schroeder, S. D. (2014). Efeitos Antinociceptivos da dipirona e seus principais metabólitos na nocicepção aguda e hiperalgesia mecânica induzidas por endotelina-1 na pata de camundongos. 2014. 115 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

Sebire, N. (2010). *Basic Science in Obstetrics and Gynaecology* (Quarta Edição).

Sims, J. E., Painter, S. L., & Gow, I. R. (1995). Genomic organization of the type I and type II IL-1 receptors. *Cytokine*, 7(6), 483-490.

Siracusa, R., Paola, R. D., Cuzzocrea, S., & Impellizzeri, D. (2021). Fibromyalgia: Pathogenesis, Mechanisms, Diagnosis and Treatment Options Update. *International journal of molecular sciences*, 22(8), 3891. <https://doi.org/10.3390/ijms22083891>

Su, T. F., Zhang, L. H., Peng, M., Wu, C. H., Pan, W., Tian, B., Shi, J., Pan, H. L., Li, M. (2011). Cannabinoid CB2 receptors contribute to upregulation of β -endorphin in inflamed skin tissues by electroacupuncture. *Molecular pain*, 7, 98. doi: 10.1186/1744-8069-7-98

Sznejder, H., Amand, C., Stewart, A., Salazar, R., Scala, W. (2022). Real world evidence of the use of metamizole (dipyrone) by the Brazilian population. A retrospective cohort with over 380,000 patients. *Einstein (Sao Paulo)*. 6(20). doi: 10.31744/einstein_journal/2022AO6353. PMID: 35584441; PMCID: PMC9060643.

Takeda, K., & Akira, S. (2015). Toll-like receptors. *Current protocols in immunology*, 109, 14.12.1–14.12.10. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im1412s109>

Tannahill, G., Curtis, A., Adamik, J. et al. Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 β through HIF-1 α . *Nature* 496, 238–242 (2013). <https://doi.org/10.1038/nature11986>

Tecchio, Cristina, Alessandra Micheletti, and Marco A. Cassatella. 2014. Neutrophil-derived cytokines: Facts beyond expression. *Frontiers in Immunology* 5: 1–8. <https://doi.org/10.3389/fmmu.2014.00508>.

Tilley, S. L., Coffman, T. M., Koller, B. H. (2001). Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes. *The Journal of clinical investigation*, 108, 15–23. doi: 10.1172/JCI13416

Toda, G., Yamauchi, T., Kadowaki, T., & Ueki, K. (2020). Preparation and culture of bone marrow-derived macrophages from mice for functional analysis. *STAR protocols*, 2(1), 100246. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2020.100246>

Trifan, O. C., & Hla, T. (2003). Cyclooxygenase-2 modulates cellular growth and

promotes tumorigenesis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 7(3), 207-222.

Trivedi, M., Shaikh, S., Gwinnut, C. (2007). Pharmacology of Opioids. Originally published in *Anaesthesia Tutorial of the Week*.

Turcotte, C., Blanchet, M. R., Laviolette, M., Flamand, N. (2016). The CB2 receptor and its role as a regulator of inflammation. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 73(23), 4449–4470. doi: 10.1007/s00018-016-2300-4

Vale, Nilson do. (2006). Desmistificando o uso da dipirona. In: CAVALCANTI, Ismar. *Medicina Peri Operatória*. Rio de Janeiro: Sociedade de anesthesiologia do Estado do Rio de Janeiro. Cap. 126.

Vane, J. R. (1971). Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature New Biology*, 231, 232-235.

Vanegas, H., & Schaible, H. G. (2001). Prostaglandins and cyclooxygenases in the spinal cord. *Progress in Neurobiology*, 64(4), 327-363.

Vats, D., Mukundan, L., Odegaard, J. I., Zhang, L., Smith, K. L., Morel, C. R., Wagner, R. A., Greaves, D. R., Murray, P. J., & Chawla, A. (2006). Oxidative metabolism and PGC-1 β attenuate macrophage-mediated inflammation. *Cell metabolism*, 4(1), 13–24. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.05.011>

Walters, E. T. (2012). Nociceptors as chronic drivers of pain and hyperreflexia after spinal cord injury: An adaptive-maladaptive hyperfunctional state hypothesis. *Frontiers in Physiology*, 3(309). <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00309>

Wang, N., Liang, H., & Zen, K. (2014). Molecular Mechanisms That Influence the Macrophage M1–M2 Polarization Balance. *Frontiers in Immunology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00614>.

Wang, V.; Mullally, W. (2020). Pain Neurology. *American Journal of Medicine*, 133, 273-280. doi: 10.1016/j.amjmed.2019.07.029

Wesche, H., Henzel, W. J., Shillinglaw, W., Li, S., & Cao, Z. (1997). MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity*, 7(6), 837-847.

Woolf, C. J. (2010). What is this thing called pain?. *Journal of Clinical Investigation*, 120, 3742-3744. doi: 10.1172/JCI45178

Zhang, B., Yao, G., Zhang, Y., Gao, J., Yang, B., Rao, Z., & Gao, J. (2011). M2-polarized tumor-associated macrophages are associated with poor prognoses resulting from accelerated lymphangiogenesis in lung adenocarcinoma. *Clinics (Sao Paulo, Brazil)*, 66(11), 1879–1886. <https://doi.org/10.1590/s1807-59322011001100006>

Zhang, J. M., & An, J. (2007). Cytokines, inflammation, and pain. *International anesthesiology clinics*, 45(2), 27–37. <https://doi.org/10.1097/AIA.0b013e318034194e>

Zhang, Y., Shaffer, A., Portanova, J., Seibert, K., & Isakson, P. C. (1997). Inhibition of cyclooxygenase-2 rapidly reverses inflammatory hyperalgesia and prostaglandin E2 production. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 283(3), 1069-1075.

ANEXOS

ANEXO I - PARECER DO TERMO DE APROVAÇÃO DA PESQUISA PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO CEUA nº 4/2022



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada Investigação de novos mecanismos analgésicos associados a analgesia periférica induzida pela dipirona: avaliação da contribuição do receptor canabinoide do tipo 2 (CB2) de macrófagos, registrada com o nº 5931-1/2021, sob a responsabilidade de Prof. Dr. Carlos Amílcar Parada e Cecília Costa Fagundes, Ana Carolina Dos Santos Machado, 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 reunião de 18/11/2021.

Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	01/01/2022 a 01/01/2024
Vigência da autorização para manipulação animal:	18/11/2021 a 01/01/2024
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogêneo / HanUnib: WH (Wistar)
No. de animais:	12
Idade/Peso:	7.00 Semanas / 200.00 Gramas
Sexo:	12 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogêneo / HanUnib: WH (Wistar)
No. de animais:	18
Idade/Peso:	7.00 Semanas / 200.00 Gramas
Sexo:	18 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogêneo / HanUnib: WH (Wistar)
No. de animais:	30
Idade/Peso:	7.00 Semanas / 200.00 Gramas
Sexo:	30 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogêneo / HanUnib: WH (Wistar)
No. de animais:	30
Idade/Peso:	7.00 Semanas / 200.00 Gramas
Sexo:	30 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogêneo / HanUnib: WH (Wistar)
No. de animais:	30
Idade/Peso:	7.00 Semanas / 200.00 Gramas
Sexo:	30 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogêneo / HanUnib: WH (Wistar)
No. de animais:	30
Idade/Peso:	7.00 Semanas / 200.00 Gramas
Sexo:	30 Machos
Origem:	CEMIB/ UNICAMP
Biotério onde serão mantidos os animais:	Biotério 1 - Área de Fisiologia e Biofísica, DBEF/IB/UNICAMP

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

Campinas, 12 de janeiro de 2022.

Prof. Dr. Wagner José Fávoro
Presidente

Rosângela dos Santos
Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo até 05 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação do relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam aceitos eticamente.

Documento assinado eletronicamente por **WAGNER JOSE FAVARO, PRESIDENTE DA CEUA/UNICAMP**, em 13/01/2022, às 11:08 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.

Documento assinado eletronicamente por **ROSANGELA DOS SANTOS, SECRETÁRIA EXECUTIVA CEUA/UNICAMP**, em 13/01/2022, às 14:20 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.



A autenticidade do documento pode ser conferida no site:
sigad.unicamp.br/verifica, informando o código verificador:
811963AB 5E304359 A8F9525D 53EA2E5F



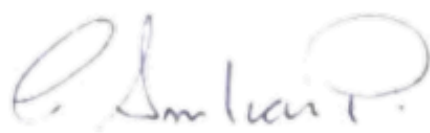
ANEXO II – DECLARAÇÃO DE DIREITOS AUTORAIS

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 **Investigação dos mecanismos moleculares associados à ação imunomodulatória da dipirona na inflamação**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 30/11/2024

Assinatura : 
Nome do(a) autor(a): **Cecília Costa Fagundes**
RG n.º 59581425-6

Assinatura : 
Nome do(a) orientador(a): **Carlos Amílcar Parada**
RG n.º 7962382