



UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
PAULA FRANSON FERNANDES

**EFEITO IMUNOMODULATÓRIO DA SUPLEMENTAÇÃO PREVENTIVA DO
ÁCIDO GRAXO ÔMEGA-3 EM UM MODELO ANIMAL DA SÍNDROME DA
DOR REGIONAL COMPLEXA DO TIPO I**

Palhoça

2020

PAULA FRANSON FERNANDES

**EFEITO IMUNOMODULATÓRIO DA SUPLEMENTAÇÃO PREVENTIVA DO
ÁCIDO GRAXO ÔMEGA-3 EM UM MODELO ANIMAL DA SÍNDROME DA
DOR REGIONAL COMPLEXA DO TIPO I**

LINHA DE PESQUISA: NEUROCIÊNCIAS

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Franciane Bobinski

Coorientador: Prof. Dr. Daniel Fernandes Martins

Palhoça

2020

F41 Fernandes, Paula Franson, 1995 -

Efeito imunomodulatório da suplementação preventiva do ácido graxo ômega-3 em um modelo animal da síndrome da dor regional complexa do tipo I / Paula Franson Fernandes. – 2020.

54 f. : il. color. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Sul de Santa Catarina, Pós-graduação em Ciências da Saúde.

Orientação: Prof. Franciane Bobinski

1. Inflamação - Tratamento. 2. Ácidos graxos Ômega-3. 3. Edema - Tratamento. 4. Citocinas. I. Bobinski, Franciane. II. Universidade do Sul de Santa Catarina. III. Título.

CDD (21. ed.) 617.22



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - MESTRADO

Título da Dissertação

Efeito imunomodulatório da suplementação preventiva do ácido graxo ômega-3 em um modelo animal da síndrome da dor regional complexa do tipo I.

PAULA FRANSON FERNANDES

AUTOR

Aprovado pela Banca Avaliadora de Defesa da Dissertação em 18 de fevereiro de 2020.

Doutora Franciane Bobinski (orientador) Franciane Bobinski

Doutora Amanda Della Giustina (Avaliador externo - IESGF) AG

Doutora Anna Paula Piovezan (avaliador interno) Anna Paula Piovezan

Professor Doutor Jefferson Traebert

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - UNISUL

Dedicatória

Aos meus pais, que foram e são minha
fortaleza nos momentos mais difíceis.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me dar força e sabedoria para enfrentar todas as adversidades da vida.

Aos meus pais, Sandra e Evaldo que me proporcionaram a melhor educação para chegar até aqui, por fazerem o possível e o impossível para me verem sempre feliz, e que mesmo longe, me deram todo amor e força para continuar. Obrigada, mãe, por aguentar todos os meus telefonemas e ouvir minhas histórias. À minha irmã, quem eu sempre me espelhei, admiro sua inteligência e força de vontade. E à toda minha família (Avós, tios, tias, primos e primas) que me apoiou. Eu amo muito vocês.

À minha orientadora, professora Dra. Franciane (mais conhecida por prof. Fran). Obrigada por todos os ensinamentos, broncas, risadas e pela amizade. Eu não sei o que teria sido de mim sem você. Obrigada por acreditar em mim e tornar tudo mais fácil. Gostaria que todos estudantes tivessem uma professora igual a você.

Ao meu co-orientador, professor Dr. Daniel, que me ajudou desde a inscrição do mestrado, que me apresentou ao LaNEx e me ensinou muito durante todo o processo. Admiro sua inteligência e as mil coisas que você faz ao mesmo tempo.

Ao Dr. Afonso e ao Instituto Salgado, que me proporcionaram todo suporte durante esses dois anos de mestrado. Afonso, obrigada por acreditar em mim e pela sua amizade, te admiro muito, você sempre será exemplo para mim.

À Tay, minha companheira de moradia, de laboratório, de vida. Obrigada por todos os momentos bons e ruins que passamos juntas (dá para escrever um livro).

À todos meus companheiros de faculdade, de vida, de laboratório. Sem vocês eu teria enlouquecido. Tay, Carlos, Vê, Ge, Dani, Dai, Ju, Alice, Gui, Bruninha, Ka, Cristian, Lari, Yuri, Rafa, Tai, Dudu, Ana G., Rapha, Hiago, Victor, e todas as amigas que fiz durante esses dois anos, vou levar vocês no coração seja onde for. Aos meus amigos do Paraná que sempre me receberam de braços abertos e me apoiaram nas minhas loucuras, Fer, Manel, Tom, Camis, Bi, Renan, Baksa, Elo, Lê, Nat e Thami.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde e ao Laboratório de Neurociências Experimental da UNISUL, todos os professores e colaboradores.

A todos aqueles que, de alguma maneira, contribuíram durante todo o mestrado.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001, com o apoio do Programa de Suporte à Pós-Graduação de Instituições

Comunitárias de Ensino Superior (PROSUC/CAPES), com o apoio da Universidade do Sul de Santa Catarina (UNISUL) e do Instituto Salgado de Saúde Integral.

RESUMO

Introdução: A Síndrome da Dor Regional Complexa (SDRC) é conhecida por apresentar manifestações clínicas autonômicas, sensoriais, motoras e tróficas, desencadeada por um trauma ou processo cirúrgico, e se estabelece após um processo inflamatório seguido de uma lesão. Apresenta um aumento de citocinas pró-inflamatórias, e uma diminuição das citocinas anti-inflamatórias e pró-resolutivas. O ômega-3, rico em ácido eicosapentaenoico (EPA) e ácido docosaenoico (DHA), é conhecido por suas propriedades anti-inflamatórias e pró-resolutivas. Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi verificar o efeito da suplementação preventiva com ômega-3 no edema da pata, nas concentrações da interleucina (IL)-4, IL-10, fator de crescimento transformador β -1 (TGF- β 1), fator de necrose tumoral (TNF) e proteína quimioatrativa de monócitos 1 (MCP-1) na pele e músculo da pata e, por fim, no imunoconteúdo de NOS 2 e CD86 (macrófagos M1) e Arginase-1 (macrófagos M2) no músculo de camundongos submetidos ao modelo de Dor Pós-Isquemia Crônica (DPIC). **Metodologia:** Camundongos *Swiss* fêmeas foram divididos em 4 grupos: (1) Salina/Sham; (2) Salina/DPIC; (3) Óleo de milho/DPIC e (4) Ômega-3/DPIC. Foi realizada a suplementação com salina (0,9 %), óleo de milho (1.500 mg/Kg) ou ômega-3 (1.500 mg/Kg) por 30 dias preventivamente e, posteriormente conforme os dois protocolos experimentais, até o 2º ou 15º dias após a DPIC. O modelo de DPIC foi realizado pela aplicação de um torniquete na pata posterior direita dos camundongos, induzindo um processo de isquemia e reperfusão. A avaliação da espessura da pata foi utilizada para o acompanhamento do edema até 96 horas após a lesão. ELISA foi utilizado para mensuração das citocinas pró- e anti-inflamatórias e o ensaio de Western Blotting para a imunomarcagem de NOS 2 e CD86 e Arginase-1. **Resultados:** O ômega-3 diminuiu o edema da pata dos animais lesionados, aumentou as concentrações de IL-4 no músculo após 48 horas, e ainda, aumentou as concentrações de IL-10, 15 dias após a DPIC. O ômega-3 não alterou as concentrações de MCP-1, TNF e TGF- β 1, 48 horas após a DPIC, assim como, não alterou os níveis de NOS 2, CD86 e Arginase-1. **Conclusão:** Os resultados demonstram um consistente efeito imunomodulatório da suplementação preventiva do ômega-3 em um modelo animal de SDRC-I.

Descritores: Ômega-3; PUFAs; Síndrome da Dor Regional Complexa; Edema; Citocinas.

ABSTRACT

Introduction: Complex Regional Pain Syndrome (CRPS) is known to present autonomic, sensory, motor and trophic clinical manifestations, triggered by a trauma or surgical process, and is established after an inflammatory process followed by the injury. It presents an increase of pro-inflammatory cytokines, and a decrease of anti-inflammatory and pro-resolutive cytokines. Omega-3, a fish oil rich in eicosapentaenoic acid (EPA) and docosaenoic acid (DHA), is known for its anti-inflammatory and pro-resolutive properties. Therefore, the objective of this study was to verify the effect of the preventive supplementation with omega-3 on the paw edema, in the concentrations of interleukin (IL)-4, IL-10, transforming growth factor β -1 (TGF- β 1), tumor necrosis factor (TNF) and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in the skin and paw muscle and finally in the immunocontent of NOS 2 and CD86 (macrophages M1) and Arginase-1 (macrophages M2) in the paw muscle of mice submitted to the model of Chronic Post-Ischemia Pain (CPIP). **Methodology:** Swiss female mice were divided into 4 groups: (1) Saline/Sham; (2) Saline/CPIP; (3) Corn oil/CPIP and (4) Omega-3/CPIP. Saline (0.9%), corn oil (1.500 mg/Kg) or omega-3 (1.500 mg/Kg) were added for 30 days preventively and then, according to the two experimental protocols, until the 2nd or 15th day after CPIP. The CPIP model was performed by applying a tourniquet on the posterior right paw of the mice, inducing a process of ischemia and reperfusion. The evaluation of the leg thickness was used to follow the edema up to 96 hours after the injury. ELISA was used to measure pro- and anti-inflammatory cytokines and the Western Blotting assay for NOS 2 and CD86 and Arginase-1 immunomarkers. **Results:** Omega-3 decreased paw edema in injured animals, increased IL-4 concentrations in muscle after 48 hours, and increased IL-10 concentrations 15 days after IDP. The omega-3 did not change the concentrations of MCP-1, TNF and TGF- β 1.48 hours after CPIP, as well as it did not change the levels of NOS 2, CD86 and Arginase-1. **Conclusion:** The results demonstrate a consistent immunomodulatory effect of preventive omega-3 supplementation in an animal model of CRPS-I.

Key-words: Omega-3; PUFAs; Complex Regional Pain Syndrome; Edema; Cytokines.

LISTAS

Lista de abreviaturas

AA - Ácido Araquidônico

ALX/FPR2 – Lipoxina derivada da Aspirina/Receptor 2 do peptídeo N-formil

ANOVA - Análise de Variância

BLT1 - receptor 1 do Leucotrieno B

CCR2 – Receptor de quimiocina C-C tipo 2

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

CFA - Adjuvante completo de Freund

CGRP - Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina

Chem23 - Receptor de chemerina 23

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

COX - Cicloxigenase

DBCA - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a utilização de Animais para fins científicos e didáticos

DHA - Ácido docosaenoico

DP- Desvio padrão

DPIC - Dor pós-isquemia crônica

EDTA - ácido etileno-diamino-tetra-acético

ELISA - Ensaio de Imunoabsorção Ligado à Enzima

eNOS – Óxido Nítrico endotelial

EPA - Ácido eicosapentaenoico

GPR18 – Receptor 18 acoplado à proteína G

GPR32 - Receptor 32 acoplado à proteína G

IASP - Associação Internacional para Estudo da Dor

IL- Interleucina

IL-1RA - Antagonista do Receptor de Interleucina-1

IFN- γ - Interferon Gama

INC – Instituto de Neurologia de Curitiba

i.g - Intragástrica

i.p. – Intraperitoneal
LOX - Lipoxigenase
LTB₄ – Leucotrieno B₄
LTs - Leucotrienos
MCP-1 - Proteína quimioatrativa de monócitos 1
MHCII - Complexo de histocompatibilidade principal classe II
MIA - Morte Indolor Assistida
MIP-1 β - Proteína Inflamatória Macrofágica-1 β
M1 - Macrófago do tipo 1
M2 - Macrófago do tipo 2
NGF – Fator de Crescimento do Nervo
NOS2 - Óxido Nítrico Sintase 2
PBS – Tampão fosfato-salino
PGs - Prostaglandinas
PGE - Prostaglandina da série E
PGF - Prostaglandina da série F
PMSF – Fenilmetilsulfonilfluoreto
PUFAs - Ácidos graxos poli-insaturados
EROs - Espécies Reativas do Oxigênio
SDRC - Síndrome da Dor Regional Complexa
SNC – Sistema Nervoso Central
SPMs - Mediadores lipídicos pró-resolutivos (do inglês, *specialized pro-resolving mediators*)
sTNFR – Receptores solúveis do TNF
SP – Substância P
TGF- β - Fator de Crescimento Transformador beta
TNF - Fator de Necrose Tumoral
TXs – Tromboxanos
UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina
WB - Western Blotting

Lista de quadros

Quadro 1 – Variáveis de estudo.....	39
-------------------------------------	----

Lista de figuras

Figura 1 - SDRC em humanos.....	18
Figura 2 - Estágios do modelo de DPIC em camundongos.....	22
Figura 3 - Ação anti-inflamatória e pró-resolutiva dos mediadores pró-resolutivos.....	25
Figura 4 - Estrutura e metabolismo do ômega-6 e 3	26
Figura 5 - A visão atual das ações anti-inflamatórias dos PUFAs EPA e DHA	27
Figura 6 - Metabolismo de SPMs derivados do EPA e seus respectivos receptores.....	29
Figura 7 - Metabolismo dos SPMs derivados do DHA e seus respectivos receptores...	30
Figura 8 - Desenho experimental.....	36

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	REFERENCIAL TEÓRICO	16
1.1.1	Síndrome da Dor Regional Complexa	16
1.1.2	Fisiopatologia da Síndrome da Dor Regional Complexa	18
1.1.3	A fase pró-resolutiva da inflamação e o papel do ômega-3	23
1.1.4	Os ácidos graxos poli-insaturados e a cascata do ácido araquidônico	25
2	OBJETIVOS	31
2.1	OBJETIVO GERAL	31
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
3	MÉTODOS.....	32
3.1	TIPO DE ESTUDO	32
3.2	MATERIAL E EQUIPAMENTOS	32
3.3	ANIMAIS	33
3.3.1	Critérios de Exclusão	33
3.3.2	Cálculo amostral.....	34
3.4	DELINEAMENTO DO ESTUDO	35
3.5	ENSAIOS/TESTES/TÉCNICAS	35
3.5.1	Indução do modelo animal de DPIC	35
3.5.2	Tratamento com ômega-3 e óleo de milho.....	36
3.5.3	Avaliação da espessura da pata.....	37
3.5.4	Ensaio bioquímicos	37
3.5.4.1	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática	37
3.5.4.2	Western Blotting.....	38
3.6	VARIÁVEIS DE ESTUDO.....	39
3.7	PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS	39
3.8	ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA	40
4	ARTIGO CIENTÍFICO.....	41
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	43
	REFERÊNCIAS	44
	ANEXO A – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UNISUL.....	52

1 INTRODUÇÃO

A Síndrome da Dor Regional Complexa (SDRC) é uma patologia que causa grave déficit funcional, caracterizada pela presença de dor crônica e debilitante. A SDRC surge após um trauma ou um processo cirúrgico em um membro e se estabelece após o processo inflamatório desencadeado pela lesão. É conhecida por apresentar manifestações clínicas autonômicas, sensoriais, motoras e tróficas, e geralmente envolve uma extremidade ou região do corpo^{1,2}.

A SDRC é dividida em dois tipos: SDRC do tipo I, que surge após um trauma tecidual em que inicialmente não há dano de nervo, e a SDRC do tipo II, onde é identificado dano de nervo (causalgia). No entanto, esta diferença é controversa, porque a fratura óssea ou a cirurgia lesionarão as fibras nervosas periféricas, mas por convenção, a SDRC pós-fratura e pós-cirúrgica é quase sempre classificada como SDRC do tipo I. Além disso, estudos patológicos em pacientes com a SDRC, que tiveram membros amputados e posteriormente foram realizadas biópsias da pele, mostraram degeneração de fibras nervosas de pequeno diâmetro, do tipo C e A δ ²⁻⁴.

Nos pacientes com SDRC, a dor regional é o sintoma mais importante, ela aumenta durante os movimentos e quando há mudanças de temperatura no membro afetado. Também há alterações vasomotoras e sudomotoras. Os sujeitos acometidos apresentam edema, alterações na motricidade e modificações tróficas nos tecidos acometidos. Alguns pacientes manifestam os membros quentes ou frios, alodinia, hiperalgesia, excesso de suor, e mudanças na aparência da pele e unhas^{5,6}.

A incidência da SDRC é maior em mulheres com idade entre 40-60 anos, e afeta principalmente os membros inferiores⁶. A principal causa é devido a fraturas nas partes distais dos membros^{7,8}. A incidência da SDRC após uma fratura é estimada em 1-2%, sendo que 19% dos casos acontecem no pós-operatório^{3,9}. Num estudo conduzido nos Estados Unidos, Sandroni e colaboradores (2003)⁸ mostraram uma incidência anual de 5,5 para cada 100.000 pessoas em risco, com uma prevalência anual de 20,6 por 100.000 pessoas. Em outro estudo conduzido na Noruega, foi encontrado uma incidência de 26,2 por 100.000 pessoas por ano⁷.

Em relação ao prognóstico, um estudo longitudinal mostrou que durante o primeiro ano após o desenvolvimento da SDRC, 70% dos pacientes tiveram melhora principalmente na funcionalidade do membro lesionado e nos sintomas visíveis (edema, cor da pele e transpiração). Entretanto, 25% dos pacientes continuaram inclusos no

diagnóstico da SDRC, e apenas 5% estavam sem queixas^{10,4}. Outro estudo mostrou que fatores psicológicos podem influenciar o prognóstico da SDRC, como o medo relacionado à dor e ao dano tecidual, a ansiedade, o estresse ou a depressão¹¹.

A inflamação pós-traumática, a disfunção vasomotora e a plasticidade neuronal é o que caracteriza a fisiopatologia da SDRC¹². Logo após a lesão tecidual, ocorre a resposta imune inata na pele e tecido subcutâneo. Em alguns modelos animais como os de fratura ou isquemia e reperfusão, logo no primeiro dia após a lesão, além das células imunológicas, os queratinócitos se proliferam e expressam citocinas, como a interleucina (IL)-6 e o fator de necrose tumoral (TNF) que também provocam dor e hiperalgesia através da sensibilização dos nociceptores e neurônios periféricos. Esses neurônios sintetizam e liberam neuropeptídeos, tanto periféricamente quanto no seu terminal central, (substância P [SP] e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina [CGRP]) que são alguns dos mediadores responsáveis pelos sinais da inflamação¹³.

No soro de pacientes com SDRC do tipo I, as concentrações de receptores solúveis do TNF (sTNFR) e as citocinas pró-inflamatórias: TNF, IL-1 e IL-8 estão aumentadas, enquanto citocinas anti-inflamatórias, como a IL-4, IL-10 e o fator de crescimento transformador- β (TGF- β) estão diminuídas^{14,15}. Durante o curso da doença e sua cronificação, a maioria dos sinais da inflamação cessa, mostrando mudanças na fisiopatologia. O próximo passo é a plasticidade neuronal do sistema nervoso central (SNC), que também é induzida pela inflamação ou desenvolvida em paralelo, e é responsável pela manutenção da dor crônica neuropática¹⁶.

Apesar dos diversos estudos experimentais e clínicos realizados na área, até o presente momento não existe um tratamento estabelecido e totalmente eficaz para a SDRC, tanto do tipo I quanto do tipo II^{6,17}. Os tratamentos utilizados incluem o uso de medicamentos como anti-inflamatórios (na fase aguda), antidepressivos e opioides; e terapias como a fisioterapia, a terapia ocupacional, a psicoterapia e a socioterapia¹⁶. Uma vez que as terapias atualmente disponíveis não aliviam adequadamente a dor em todos os pacientes, e os efeitos colaterais dos tratamentos medicamentosos frequentemente limitam o seu uso, permanece a necessidade de desenvolver novas abordagens para que se estabeleça um tratamento efetivo, seguro e até mesmo preventivo, frente ao prognóstico que SDRC apresenta, devido à sua fisiopatologia multifacetária.

O ômega-3 e seus derivados são conhecidos pelas suas propriedades pró-resolutivas e anti-inflamatórias¹⁸⁻²⁰, funções que beneficiariam os pacientes na prevenção

do desenvolvimento, ou mesmo no tratamento, da SDRC. Os mais abundantes ácidos graxos são os insaturados, sendo que um deles é o ácido graxo ômega-6 ou ácido linoleico. Este pode ser dessaturado com a inserção de uma dupla ligação para formar o ácido α -linolênico, também conhecido como o ácido graxo poli-insaturado (PUFA), ômega-3. A mesma enzima que faz a dessaturação o ômega-6, converte o ácido α -linolênico em ácido eicosapentaenoico (EPA) e depois este em ácido docosaexaenoico (DHA)¹⁸.

Sabe-se também que o ômega-3 dá origem a uma família de mediadores denominados resolvinas, que derivam tanto do EPA, quanto do DHA, e estes possuem intensa propriedade anti-inflamatória¹⁹, são protetores do tecido, e tem funções de estimular a resolução da inflamação²⁰. Estudos clínicos vêm demonstrando que o EPA e o DHA modulam a síntese de citocinas pró-inflamatórias como a IL-6, a interleucina-1 beta (IL-1 β) e o TNF em doenças inflamatórias. Além disso, têm se mostrado efetivo em amenizar os efeitos da inflamação, incluindo a quimiotaxia de leucócitos, a expressão de moléculas de adesão no endotélio, e a produção de eicosanoides como as prostaglandinas (PGs), os tromboxanos (TXs) e os leucotrienos (LTs), que são derivados do ácido araquidônico (AA)^{18,21,22}.

Muitos estudos sugerem que a suplementação de ômega-3 tem efeitos benéficos em patologias humanas e modelos animais. Alguns desses efeitos incluem potencial antitrombótico, imunorregulatório, e respostas anti-inflamatórias relevantes em doenças como arteriosclerose, artrite, asma, periodontite, assim como, efeitos antitumoral e antimetástase²³. Ainda, um estudo demonstrou que o ômega-3 modula a transmissão da dor inflamatória regulando a transmissão do sinal nociceptivo no corno posterior da medula espinal^{24,25}. Além da modulação da função imune periférica, o ômega-3 também tem ação central. O DHA, derivado do ômega-3 é o PUFA mais encontrado no encéfalo e contribui para regular a sinalização e a função da micróglia, a célula imunológica efetora do SNC, principalmente no contexto de neuroinflamação e do comportamento^{26,27,28}.

Pacientes com a dieta rica em ácido graxo ômega-3 são menos propensos a desenvolver processos neurodegenerativos ou funcionais, e perda cognitiva na progressão de doenças neurodegenerativas²⁹. Por outro lado, indivíduos com a cognição normal também são beneficiados com a suplementação de ômega-3. Já foi demonstrado que a suplementação está positivamente associada com um volume médio maior do hipocampo, córtex cingulado e das áreas orbitofrontais²⁹.

As doenças inflamatórias, como a SDRC, têm reduzido a qualidade de vida dos indivíduos acometidos e onerado o sistema de saúde e de seguridade social. O paciente com um quadro de doença inflamatória apresenta, na maioria das vezes, uma dor crônica incapacitante que faz com que ele se afaste do trabalho, da vida social, e deixe de lado as atividades físicas e atividades básicas do dia-a-dia. Todo este quadro gera um prejuízo tanto para o paciente quanto para a economia do país, visto que há uma alta incidência e prevalência de doenças inflamatórias crônicas³⁰.

Ao mesmo tempo em que podemos visualizar um crescente número de pesquisas científicas relacionadas ao tema, muitas perguntas e dúvidas sobre o processo fisiopatológico da síndrome e terapias emergentes ainda necessitam de esclarecimentos. Nesse contexto nos questionamos se em camundongos submetidos a um modelo que mimetiza a SDRC do tipo I, o modelo de dor pós-isquemia crônica (DPIC), a suplementação prévia com ômega-3 teria efeitos benéficos sobre a regulação do sistema imunológico durante o processo inflamatório?

1.1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1.1 Síndrome da Dor Regional Complexa

Um das primeiras publicações sobre a SDRC foi feita por Mitchell em 1864, que a denominou como causalgia. Essa denominação sofreu várias mudanças devido as novas descobertas sobre sua patogenia³¹. Em 1994, a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) introduziu o termo SDRC³. O termo descreve que há uma variedade de condições dolorosas regionais após uma lesão, nas quais, a magnitude e duração excedem o esperado e mostram uma progressão variável com o tempo³². Esta síndrome é conhecida por apresentar dor neuropática e alterações autonômicas, motoras e tróficas, afetando uma ou mais extremidades do corpo. Estas complicações clínicas características da SDRC surgem quase sempre após um traumatismo ou processo cirúrgico, geralmente resultante de isquemia e reperfusão tecidual^{3,33}. Embora a sua causa ainda não esteja totalmente elucidada, alguns estudos apontam uma possível predisposição genética^{34,8}.

A síndrome pode se apresentar com dor regional intensa, com sintomas de alodinia (estímulos, geralmente não dolorosos, que provocam dor) e hiperalgesia

(estímulos dolorosos que provocam sensações dolorosas mais intensas que o habitual), edema ou sudorese, mudanças na cor e temperatura da pele, fraqueza, tremores e redução da amplitude de movimento. Sendo assim, ela prejudica a prática de algumas atividades diárias por causar prejuízos na função motora e sensorial³³. Fatores psicológicos também estão associados aos sintomas da SDRC, o estudo de Bean e colaboradores (2015)¹¹ mostrou que aqueles pacientes mais ansiosos, estressados, depressivos e que tinham medo da dor, exibiram maior intensidade de dor, incapacidade e piora dos sintomas durante o acompanhamento¹¹.

Atualmente o diagnóstico é baseado nos sintomas e sinais clínicos, sendo que vários métodos foram desenvolvidos, incluindo o critério de Budapeste, o critério de Veldmann e o critério da IASP³³. Estes critérios incluem os principais sintomas apresentados pelos indivíduos com SDRC: alterações sensoriais de alodinia ou hiperalgesia, alterações vasomotoras de temperatura e coloração da pele, presença de edema (figura 1) ou suor, alterações motoras e tróficas como diminuição da amplitude de movimento, fraqueza e tremores¹².

A doença pode ser dividida em quatro estágios, sendo eles: estágio I, definido como a fase quente e hipertrófica; estágio II, definido como a fase intermediária; estágio III, definido como a fase fria ou crônica inicial; e o estágio IV, definido como a fase crônica, onde aparecem os sinais tróficos, a distonia e pode definir a estabilização da doença ou sua cura³⁵.

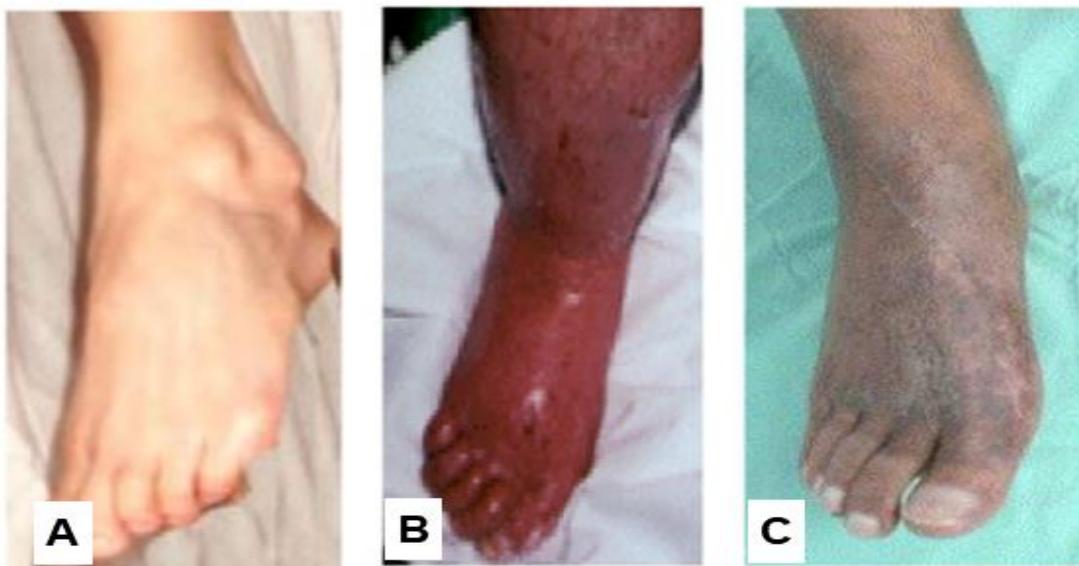


Figura 1 – SDRC em humanos.

Legenda: Fotografias mostrando algumas fases da SDRC em pés humanos. No painel A podemos ver um membro normal. No painel B notamos um membro hiperêmico, edematoso, que representa a fase quente e hipertrófica do estágio I da síndrome. No painel C notamos uma pele seca, cianótica, como na fase fria da SDRC que ocorre no estágio III.

Fonte: Adaptado de Laferrière e colaboradores (2008)³⁶

1.1.2 Fisiopatologia da Síndrome da Dor Regional Complexa

Três principais vias fisiopatológicas são relacionadas ao desenvolvimento da SDRC: mecanismos inflamatórios, disfunção vasomotora e neuroplasticidade sensorial¹². As alterações iniciam a partir da inflamação promovida pelo trauma inicial e a ativação da resposta imunológica, essa fase é caracterizada por ser de curta duração (horas ou dias), designada a reconhecer e remover o agente lesivo, recrutar leucócitos, eliminar *debris* celulares, regular a resposta inflamatória e reparar o tecido³⁷.

A dor é provocada por lesão dos tecidos, onde poderá haver sangramento e, portanto, anóxia do tecido pelos vasos que se romperam. As próprias células do tecido lesionado também liberam substâncias como a bradicinina, as PGs e as prostaciclina, que são rapidamente liberadas e modulam o processo inflamatório, incluindo a vasodilatação, o aumento da permeabilidade vascular e o extravasamento plasmático^{32,38}.

Quando o tecido é lesado por isquemia e reperfusão há um considerável aumento na liberação de espécies reativas de oxigênio e ativação de células residentes, principalmente macrófagos, que aumentam a sinalização de citocinas como a IL-6, IL-1 β e o TNF e contribuem para a inflamação neurogênica. Esses mediadores são característicos do quadro inicial da SDRC do tipo I, os quais induzem e regulam a resposta inflamatória¹².

Há relatos na literatura de que o TNF está aumentado na pele de pacientes que desenvolveram a SDRC, persistindo por meses após o trauma³⁹. Também, foi demonstrada a expressão sistêmica elevada de citocinas pró-inflamatórias (TNF e IL-2) e redução da expressão de citocinas anti-inflamatórias (IL-4 e IL-10) no soro, plasma e líquido cefalorraquidiano de pacientes acometidos^{15,40-42}. Ainda, um estudo comparou os níveis de citocinas no líquido de bolhas de sucção induzidas artificialmente, nos membros afetados e contralaterais de sujeitos com a SDRC-I, com uma duração média de doença entre $2,75 \pm 1,25$ anos, encontrando níveis aumentados do antagonista do receptor de interleucina-1 (IL-1ra), IL-6, IL-8, TNF, IL-12, proteína quimioatrativa de monócitos-1 (MCP-1) e proteína inflamatória macrofágica-1 β (MIP-1 β) na extremidade superior afetada³⁵. Esses mediadores inflamatórios promovem o recrutamento de leucócitos para o local da lesão. Com o aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade vascular os leucócitos se marginalizam, rolam pela parede do vaso e se aderem firmemente ao endotélio, assim eles transmigram entre as células endoteliais para o tecido lesionado, em direção ao estímulo quimiotático³⁷.

O sinal mais visível durante a iniciação da inflamação neurogênica na SDRC-I é a disfunção vasomotora, onde a temperatura do membro afetado é inconstante e há extravasamento de plasma provocando edema e dor, que é desencadeada pela ativação de nociceptores cutâneos e provoca a despolarização retrógrada do neurônio, causando a liberação de substância P e CGRP⁴³. Junto ao extravasamento plasmático e a liberação de substância P e CGRP, os queratinócitos e outras células residentes no tecido são estimulados e expressam citocinas pró-inflamatórias como: IL-2, TNF, Interferon gama (IFN- γ), IL-6, IL-1, e IL-8, assim como, diminuem a síntese de citocinas anti-inflamatórias como a IL-4, a IL-10 e o TGF1 β ^{12,14,15,42,44}. Eicosanoides como a PGE2 e PGD2 também são liberados pelas próprias células do tecido, e aumentam a permeabilidade vascular³². Esses mediadores, juntamente com fator de crescimento do nervo (NGF) podem excitar os nociceptores e levar a sensibilização periférica, assim

como auxiliam a liberação de mais neuropeptídeos inflamatórios dos neurônios aferentes primários, contribuindo para a geração do edema e da dor^{12,45,46}.

A subsequente formação de mediadores durante o progresso da doença e a interação de células envolvidas no processo inflamatório, contribuem para o complexo mecanismo no qual a microcirculação é afetada. Há três padrões distintos nas alterações de temperatura: no primeiro, aquele que ocorre com menos de seis meses de duração, o membro lesionado fica quente e a perfusão cutânea é maior que no membro contralateral; no segundo, a temperatura é mais quente ou mais fria e a perfusão pode ser maior ou menor, dependendo da atividade simpática; e no terceiro, aquele que ocorre nos casos com mais de seis meses de duração, o membro lesionado fica frio e a sua temperatura e perfusão ficam menores que no membro contralateral. Essa termorregulação é provavelmente causada por mudanças funcionais da medula espinal, tronco encefálico ou cérebro, que são desencadeadas pelo trauma inicial. Também, há estudos que mostram que as extremidades quentes ou frias estão relacionadas com uma alta expressão local de mediadores vasoconstritores ou vasodilatadores, resultando em diminuição ou aumento do fluxo sanguíneo na pele^{32,47}.

A neuroplasticidade sensorial mal adaptada que leva ao estado de dor neuropática se inicia juntamente com o processo inflamatório, devido às fibras nociceptivas que se ativam e se sensibilizam pela liberação dos diversos mediadores inflamatórios citados anteriormente. Essa sensibilização periférica faz com que até mesmo estímulos leves disparem a abertura de diferentes canais iônicos nos neurônios, gerando potenciais de ação que serão conduzidos ao SNC e interpretados como dor nas áreas suprasegmentares³⁸.

O fenômeno da neuroplasticidade ocorre quando o SNC se adapta à novas experiências, ocorrendo mudanças funcionais e estruturais, em pacientes com dor persistente, como a que ocorre na SDRC, ocorre uma mudança na conectividade em diferentes áreas do cérebro, em particular, entre o córtex pré-frontal medial e o córtex insular⁴⁸. A intensa neuroinflamação também induz ativação glial (micróglia e astrócitos) e perda neuronal na medula espinal, mostrando que a sinalização de SP e CGRP pelas fibras C aferentes auxiliam a ativação da neuroglia. Essa ativação, juntamente com a expressão de mediadores inflamatórios, contribuem para a manutenção da sensibilização central⁴⁹.

Um evento da sensibilização central é a ativação e regulação sustentada e intensa dos receptores glutamatérgicos, responsáveis pela transmissão do sinal nociceptivo da medula espinal até o córtex somatossensorial. Este mecanismo pode causar dor crônica, com sintomas de hiperalgesia, alodinia, dor em locais não lesionados (hiperalgesia secundária) e consequente prejuízo da função motora (distonia). Esses sintomas surgem como uma característica da plasticidade neuronal mal adaptada¹².

Coderre e colaboradores (2004)⁵⁰ perceberam que a SDRC geralmente é consequência do dano tecidual por isquemia e reperfusão, que também produz desvio arteriovenoso, conhecido por contribuir para a contratura isquêmica e síndrome compartimental no choque traumático ou torniquete. Neste contexto, eles desenvolveram um modelo animal de DPIC em ratos, para mimetizar os sinais e sintomas da SDRC em humanos, e assim, compreendessem o mecanismo molecular envolvido na geração da dor inflamatória e neuropática.

O modelo animal de SDRC em ratos, desenvolvido por Coderre e colaboradores (2004)⁵⁰, foi posteriormente adaptado e reproduzido por Millecamps e colaboradores (2010)⁵¹ em camundongos. Neste último, o animal é anestesiado, colocado um anel elástico de borracha no tornozelo para realizar o torniquete por um período de três horas, e em seguida o anel é cortado para ocorrer uma intensa reperfusão sanguínea da pata, como está demonstrado na figura 2.

O modelo de DPIC mimetiza a fisiopatologia da SDRC em pacientes com membros afetados frios, com aumento da vasoconstrição microvascular, hipóxia tecidual, acidose metabólica, tudo isso contribuindo para o edema e o aumento da temperatura da pata, que é observado por muitas horas, e também para a alodinia e hiperalgesia mecânica e térmica, que podem persistir por até 4 semanas⁵². Há evidências de um aumento na infiltração de macrófagos e neutrófilos no tecido lesionado 48 horas após a lesão, e consequente aumento de citocinas inflamatórias e produtos do estresse oxidativo na pele e músculo da pata lesionada, tudo isso contribuindo para perpetuar a sensibilização nociceptiva^{36,53-55}.



Figura 2 – Estágios do modelo de DPIC em camundongos.

Legenda: Fotografias representando a realização do modelo de DPIC em camundongos. Fotografia da pata traseira antes da realização do torniquete (A). Durante o torniquete, a pele fica fria e cianótica pela hipóxia do tecido (B). Logo após a reperusão (5 minutos), a pata fica quente, cheia de sangue e com edema, refletindo em intensa hiperemia (C). Quatro dias após a reperusão, o edema e a hiperemia ainda estão presentes, e a pata aparenta aspecto seco e brilhante (D).

Fonte: Reproduzido de Bratti (2011)⁵⁶.

Outros modelos animais foram desenvolvidos para o estudo da SDRC de diferentes etiologias. Como dito anteriormente, a fratura de membros é a principal causa da SDRC, nesse sentido Birklein e colaboradores (2014) utilizaram o modelo de fratura da tíbia⁵⁷ em roedores para estudar os mecanismos fisiopatológicos da SDRC¹³. A fratura da tíbia gera inflamação no local da lesão, com liberação de neuropeptídeos, citocinas inflamatórias e do TGF- β pelos queratinócitos, que são responsáveis pelos sinais e sintomas como dor, edema, calor e mudanças tróficas, representando a SDRC na fase inicial. Esse modelo também ativa a neuroglia espinal e aumenta a liberação dos neuropeptídeos e expressão de citocinas na medula espinal, assim como, induz plasticidade estrutural dos dendritos, e induz imunidade adaptativa pela produção de anticorpos IgM pelos linfócitos B. Por outro lado, esse modelo mimetiza a SDRC somente nos seus estágios iniciais⁴⁹.

Outro modelo relatado na literatura é a lesão do nervo isquiático utilizando a picada de uma agulha. Nesse modelo os animais desenvolvem hiperalgesia mecânica, porém os sintomas inflamatórios são menores que no modelo de fratura da tíbia e de

isquemia e reperfusão⁵⁸. Outros modelos animais como o da ligadura do nervo espinal, imobilização articular do joelho, trauma de tecidos moles com perfusão do sobrenadante do tecido muscular ou infusão intra-arterial de doadores de radicais livres são raramente utilizados^{49,59-61}.

Os modelos experimentais, como os citados acima, apresentam limitações experimentais, sendo assim, é improvável que repliquem inteiramente as transições temporais dos mecanismos biológicos que suportam todos sinais e sintomas no contexto clínico da SDRC. Porém, em relação às mudanças nociceptivas, inflamatórias e tróficas após a lesão, os modelos animais mimetizam os sinais e sintomas observados em humanos e nos dão a oportunidade de investigar a fase inicial da fisiopatologia da SDRC pós-traumática⁴⁹.

1.1.3 A fase pró-resolutiva da inflamação e o papel do ômega-3

Para que o tecido retorne à sua homeostase e função após a resposta inflamatória aguda em decorrência de um trauma tecidual, a resolução do processo inflamatório precisa ocorrer, e o tráfego de leucócitos para o local inflamado é considerado o gatilho inicial para o processo de resolução⁶².

Nessa fase inicial do processo inflamatório, mediadores lipídicos como PGs, juntamente com citocinas, quimiocinas e proteínas do complemento estimulam a quimiotaxia de células sanguíneas para o tecido lesionado. O tipo de leucócito infiltrado varia com o decurso da resposta inflamatória e com o gradiente de mediadores locais. A função desses leucócitos é de remover o agente lesivo e *debris* celulares, e também produzir mediadores que amplificam a resposta inflamatória e que recrutam e ativam mais leucócitos³⁷.

O processo pró-resolutivo é diferente do anti-inflamatório, a fase de resolução da inflamação é coordenada por diferentes vias bioquímicas que produzem diversos mediadores lipídicos com características pró-resolutivas, dentre eles os derivados do AA⁶³. Esses mediadores limitam a infiltração de neutrófilos o que regula a liberação de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas. Inicia-se a apoptose dos neutrófilos e a subsequente eferocitose por macrófagos. Os macrófagos da fase de resolução alteram o seu fenótipo de pró-inflamatório (M1) para anti-inflamatório (M2), e após a fagocitose de neutrófilos e *debris* celulares retornam para a circulação linfática ou sanguínea.

Finalmente, a vasodilatação e a permeabilidade vascular são revertidas, levando a restauração do tecido inflamado à sua função fisiológica normal^{37,64}.

Os macrófagos existem em estado de equilíbrio dinâmico com o ambiente lesionado e se tornam protagonistas no processo de resolução. De uma maneira geral, essas células exacerbam ou reparam a lesão, dependendo dos sinais do ambiente lesionado⁶⁵. Os macrófagos podem ser classificados em dois subconjuntos com fenótipos moleculares e funções efetoras distintos. O ambiente pró-inflamatório inicial promove a diferenciação dos macrófagos M1 “classicamente ativados”, essas células promovem a produção de metabólitos oxidativos (óxido nítrico e superóxido) e citocinas pró-inflamatórias, que são essenciais para a defesa do hospedeiro, mas podem causar dano colateral para a saúde do tecido inflamado⁶⁴. Além do mais, eles expressam altos níveis do complexo de histocompatibilidade principal classe II (MHCII), do marcador CD86, entre outros da mesma classe, bem como, expressam a enzima óxido nítrico sintase 2 (NOS2, também conhecida por iNOS) que é ativada para produzir óxido nítrico (NO)^{66,67}.

Por outro lado, macrófagos ativados na presença de citocinas anti-inflamatórias se diferenciam em um fenótipo M2, chamados de “alternativamente ativados”. Eles podem ser subdivididos especificamente em M2a, M2b, M2c e M2d, baseados nos seus perfis de expressão gênica^{68,69}. Os macrófagos M2a são ativados por IL-4, IL-13 ou infecções por fungos ou helmintos. Os macrófagos M2b são ativados por ligantes do receptor de IL-1, complexos imunes e lipopolisacarídeos. Os macrófagos M2c são ativados por IL-10, TGF- β e glicocorticoides. E por fim o tipo M2d, que é ativado por IL-6 e adenosina. Os macrófagos do fenótipo M2 expressam diversos marcadores, como por exemplo: MHCII, arginase-1, algumas quimiocinas como CD163, CD86, CD200R, CD206, entre outros^{69,70}.

Os macrófagos que apresentam o fenótipo M2 são conhecidos, na sua maioria, por promoverem angiogênese e remodelação da matriz extracelular, suprimindo a resposta imunológica^{65,71}. Durante a fase de resolução da inflamação, após a apoptose dos neutrófilos, os macrófagos interrompem a produção de mediadores pró-inflamatórios como o TNF, a IL-1 β e a IL-6, e começam a liberar substâncias anti-inflamatórias como a IL-10, o TGF- β e a IL-1ra⁶⁴. Se o processo de mudança de fenótipo destes macrófagos não ocorrer, levará a falha da resolução da inflamação, o que pode gerar inflamação tecidual persistente¹⁹. Além disso, um desequilíbrio entre os fenótipos M1 e M2 está relacionado ao desenvolvimento de dor neuropática^{72,73}.

A interação celular no foco inflamatório pode promover a biossíntese de um grupo especializado de mediadores lipídicos, com função anti-inflamatória e pró-resolutiva, sintetizados pela ação sequencial das lipoxigenases e de outras enzimas⁴⁰. Em estudos com exsudatos da fase resolutiva, foram descobertos bioativos derivados de ácidos graxos essenciais, mais especificamente sintetizados a partir do EPA e do DHA, chamados de resolvinas, maresinas e protectinas, que são agonistas com funções de estimular a resolução da inflamação (como demonstrado na figura 3). Estudos com humanos e camundongos já demonstraram que as ações desses produtos incluem o influxo limitado de neutrófilos *in vivo* e a redução da transmigração de neutrófilos, ou seja, limitam a infiltração dessas células no tecido lesionado. Também estimulam a eferocitose pelos macrófagos (*clearance* de *debris* celulares e células apoptóticas) e a contra-regulação de citocinas como o TNF^{24,62,74}.

O ômega-3 (EPA e DHA) tem sido estudado por conter propriedade anti-inflamatória, através do qual compete com o AA, reduzindo os eicosanoides pró-inflamatórios⁶², como será explicado no próximo tópico.

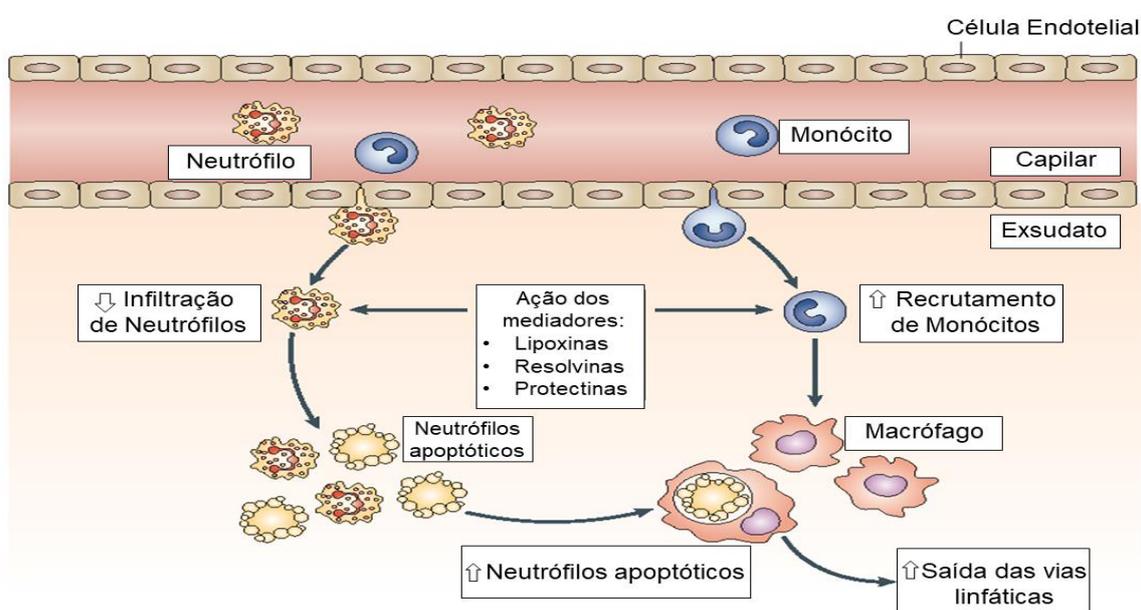


Figura 3 – Ação anti-inflamatória e pró-resolutiva dos mediadores pró-resolutivos.

Legenda: Processo anti-inflamatório e pró-resolutivo envolvendo mediadores lipídicos pro-resolução.

Fonte: Adaptado de Serhan, et al. (2008)⁷⁵

1.1.4 Os ácidos graxos poli-insaturados e a cascata do ácido araquidônico

Os PUFAs são nomeados identificando o número de duplas ligações e a sua posição contada do terminal metil da cadeia. Dentre os mais conhecidos PUFAs, está o ômega-6 ou ácido linoleico, este pode ser dessaturado com a inserção de uma dupla ligação para formar o ácido araquidônico⁷⁶. Usando as mesmas enzimas que metabolizam o ácido linoleico, o ácido α -linolênico é convertido em EPA, e este EPA será convertido e produzirá o DHA (figura 4)⁷⁶. A ligação entre os ácidos graxos e a inflamação está relacionada ao fato de que a família de mediadores inflamatórios eicosanoides é gerada do PUFA de 20 carbonos, liberado dos fosfolipídios de membranas de células inflamatórias. Essas células contêm grandes proporções de ômega-6 e pequenas proporções de ômega-3 (principalmente EPA)⁷⁶. Desta forma, o AA é o principal substrato da síntese desses eicosanoides, dentre os quais se destacam as PGs, TXs e LTs.

Existem duas classes de enzimas responsáveis pela metabolização do AA: as cicloxigenases (COXs) e as lipoxigenases (LOXs) (figura 5). As COXs se apresentam com duas isoformas: a COX-1, que é constitutiva e apresenta papel na manutenção da integridade do epitélio da mucosa do estômago e do intestino; e a COX-2, que é principalmente induzida, tendo sua expressão aumentada por estímulos inflamatórios, ambas dão origem às PGs da série 2 (predominantemente COX-2) e TXs¹⁸.

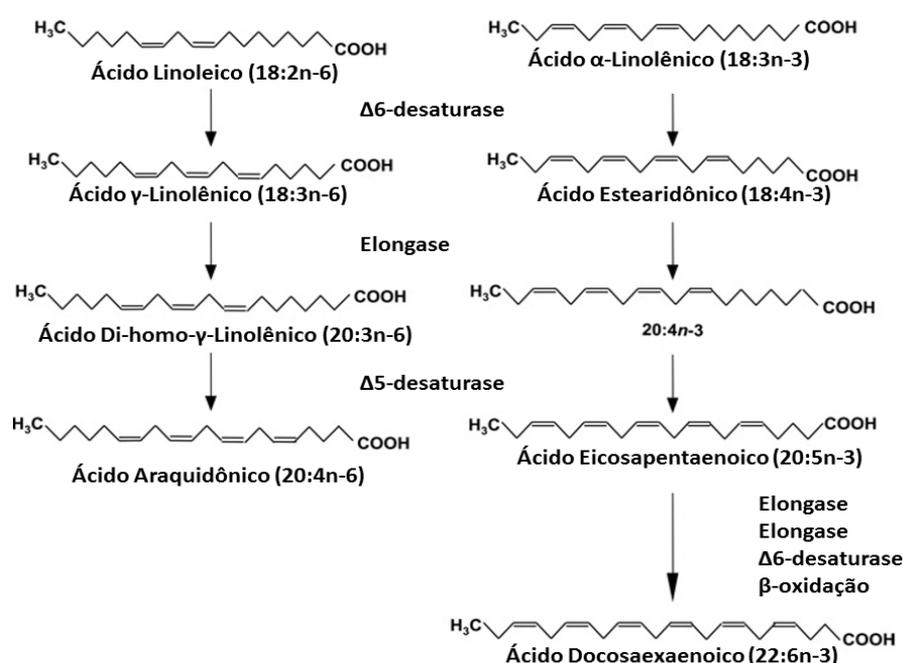


Figura 4 – Estrutura e metabolismo do ômega-6 e 3.

Legenda: Na figura vemos o ácido linoleico dessaturando até formar ácido araquidônico.

E o ácido α -linolênico se dessaturando para formar o EPA e em seguida em DHA.

Fonte: Adaptado de Calder (2005)⁷⁶.

As enzimas LOXs atuam em processos de sinalização celular, alterações estruturais e patológicas e no metabolismo dos ácidos graxos. São identificadas três principais isoformas, a 15-LOX, a 5-LOX e a 12-LOX. Destaca-se a 5-LOX que produz os LTs que apresentam importante papel no processo inflamatório, dentre eles, o LTB₄ (produzido por neutrófilos, monócitos e macrófagos) apresenta funções como o aumento da permeabilidade vascular, a quimiotaxia de leucócitos, a liberação de enzimas lisossomais, aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a produção de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF, a IL-1 β e a IL-6^{77,78,79}.

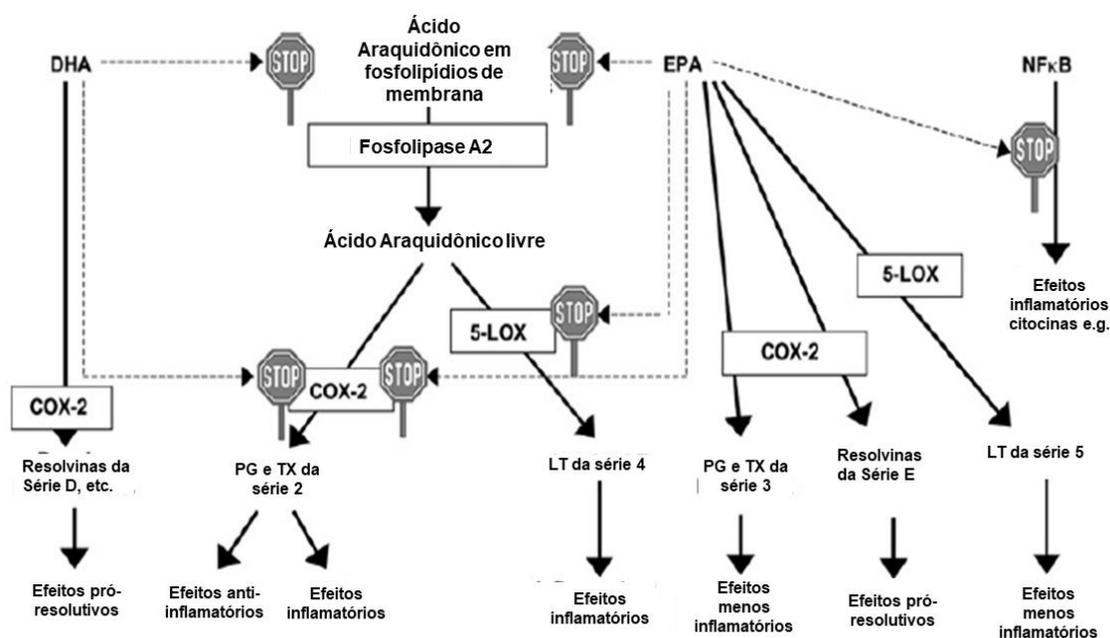


Figura 5 – A visão atual das ações anti-inflamatórias dos PUFAs: EPA e DHA.

Legenda: A figura mostra que o ácido araquidônico pode formar as COX e as LOX, e estas produzem os eicosanoides, tanto com efeitos pró-inflamatórios (a maioria), quanto anti-inflamatórios. A imagem mostra que quando há EPA e DHA disponível na célula, haverá menos AA para formação de eicosanoides, e haverá produção das resolvinas, que possuem papéis anti-inflamatórios. STOP: Quando a ação é bloqueada.

Fonte: Adaptado de Calder (2005)⁷⁶.

As PGs são formadas em células específicas, por exemplo, monócitos e macrófagos produzem grandes quantidades de PGE₂ e PGF₂; neutrófilos produzem moderadamente PGE₂ e o mastócito produz PGD₂. Dentre as PGs, se destaca a PGE₂, que possui efeitos pró-inflamatórios, incluído a febre, aumento da permeabilidade do vaso e vasodilatação, aumento da dor e edema causados por outros agentes como a histamina e a bradicinina⁷⁶.

Por outro lado, estudos demonstraram efeitos anti-inflamatórios da PGE₂, sendo que esta inibe a 5-LOX, conseqüentemente diminui os leucotrienos, e induz a 15-LOX, que é responsável por formar a lipoxina, que é conhecida por seus efeitos anti-inflamatórios e pró-resolutivos^{80,81}. O aumento do consumo de óleo de peixe, rico em PUFAs EPA e DHA, resulta no aumento da proporção desses ácidos graxos em fosfolipídios de células inflamatórias, parcialmente as custas do AA. Assim, haverá menos substrato para a síntese de eicosanoides derivados do AA¹⁸.

Vários mediadores lipídicos enzimaticamente oxigenados derivados do PUFA ômega-3, como o EPA e DHA foram identificados recentemente com uma função especializada de mediadores pró-resolutivos. Esses mediadores são chamados de resolvinas, protectinas e maresinas, e são potentes anti-inflamatórios, protetores do tecido, e tem funções de estimular a resolução da inflamação²⁰. As resolvinas podem derivar tanto do EPA quanto do DHA, já as maresinas e protectinas são produzidas através do DHA como ilustrado nas figuras 6 e 7⁸².

Os mediadores lipídicos pró-resolutivos (do inglês, *specialized pro-resolving mediators*, SPMs) são produzidos em quantidades e tempos diferentes, alguns deles aparecem em fases mais iniciais da inflamação, outros no pico da inflamação aguda, alguns em fases mais tardias, e alguns em quantidades elevadas do início ao fim do processo inflamatório. Os SPMs agem em diferentes receptores acoplados à proteína G, presentes em células imunes e endoteliais, como ilustrado nas figuras 6 e 7, como o receptor de chemerina 23 (Chem23), o receptor 1 do Leucotrieno B (BLT1), o receptor 32 acoplado à proteína G (GPR32), o receptor da lipoxina derivada da aspirina/receptor 2 do peptídeo N-formil (ALX/FPR2) e o receptor 18 acoplado à proteína G (GPR18)⁸².

O termo resolvina, produto da interação da fase de resolução, foi introduzido por significar que as novas estruturas são mediadores endógenos, de ação local, que possuem potentes propriedades anti-inflamatórias e imunorregulatórias. Ao nível celular, isso inclui a redução da infiltração de neutrófilos, regulação do eixo citocina-quimiocina e regulação da liberação de EROs, assim como diminuição da magnitude da resposta inflamatória⁸³.

As resolvinas derivam do EPA e do DHA com duas formas estruturais quimicamente únicas: as resolvinas da série E (derivadas do EPA) e as resolvinas da série D (derivadas do DHA). A resolvina E1, reduz a inflamação *in vivo* e bloqueia a migração transendotelial de neutrófilos em humanos. Ela é produzida por indivíduos saudáveis e

pode estar aumentada no plasma de indivíduos que consomem o EPA e/ou aspirina²⁴. A resolvina E2 reduz a infiltração de neutrófilos, exibindo ações anti-inflamatórias potentes. Essa resolvina pode contribuir para as ações benéficas que foram atribuídas aos PUFAs ômega-3 em doenças humanas, como inflamação da pele, peritonite, doença periodontal e colite⁸³.

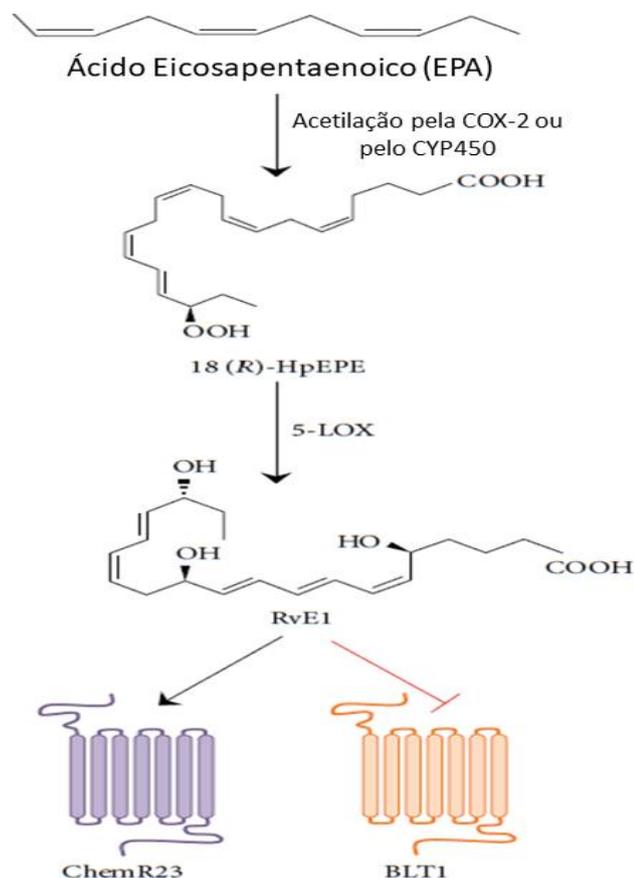


Figura 6 – Metabolismo de SPMs derivados do EPA e seus respectivos receptores.

Legenda: A figura nos mostra o metabolismo das resolvinas da série E a partir do EPA, o qual é acetilado pela COX-2 ou pelo citocromo P450, o produto 18 (R)-HpEPE é acetilado pela 5-LOX derivada de neutrófilos, que será convertido em resolvinas da série E, o qual agirá ativando o receptor Chem23 e antagonizando o BLT1, o qual teria ações pró-inflamatórias por mais do LTB4.

Fonte: Adaptado de Leuti, et al. (2019)⁸²

Além das ações destacadas anteriormente, o estudo de Xu e colaboradores (2010)⁸⁴ demonstrou que a resolvina E1 e a resolvina D1, administradas por via periférica (intraplantar) e por via central (intratecal), podem inibir a hiperalgesia mecânica e térmica, assim como diminuir a infiltração de neutrófilos, o edema da pata e a expressão de citocinas pró-inflamatórias, em modelos animais de dor inflamatória induzidos por formalina, carragenina e adjuvante completo de Freund (CFA). Esse estudo mostra que as resolvinas podem ser utilizadas como analgésicos para o tratamento da dor

inflamatória, por exemplo, na artrite reumatóide⁸⁴. Além do mais, as resolvinas da série D têm habilidade de regular estados redox celulares e teciduais, limitando ou suprimindo o estresse oxidativo⁸².

Já foi demonstrado que a resolvina D1 pode reduzir a liberação de IL-1 β mediada por EROs⁸⁵, além do mais, ela diminui a morte de macrófagos causadas pelas EROs devido ao excesso de eferocitose⁸⁶. A resolvina D2, se mostrou importante na diminuição do influxo de neutrófilos, agindo no tônus de capilares e na adesão de leucócitos, modulando a atividade da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e níveis locais de NO⁸⁷.

Apesar da diversidade de tratamentos disponíveis para doenças de caráter inflamatório como a SDRC, nenhum deles são totalmente eficazes e seguros, pois não aliviam adequadamente os sintomas e apresentam efeitos colaterais nocivos para os pacientes. Sendo assim, escolhemos o tratamento preventivo com ômega-3, por já ter demonstrado seu potencial anti-inflamatório e pró-resolutivo, além do mais pode ser facilmente prescrito pelos profissionais da saúde e de fácil acesso para os pacientes como um tratamento complementar para a SDRC.

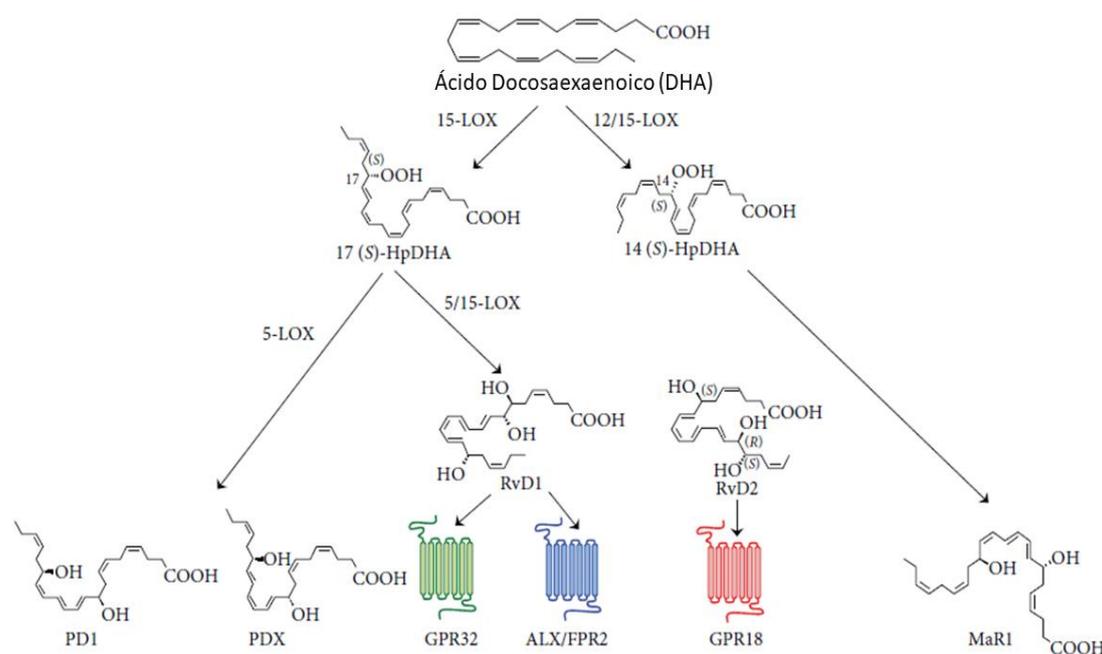


Figura 7 - Metabolismo dos SPMs derivados do DHA e seus respectivos receptores.

Legenda: A figura nos mostra esquematicamente o DHA sendo acetilado pela enzima 15-LOX para formar o 17(S)-HpDHA, que em seguida será acetilado pela enzima 5-LOX para formar as protectinas, ou pelas 5/15-LOX para formar resolvinas da série D (RvD1, RvD2, RvD3, RvD4, RvD5 e RvD6), que terão suas ações em seus respectivos receptores. Por outro lado, o DHA pode ser convertido em maresinas, em macrófagos, através das ações das 12/15-LOX.

Fonte: Adaptado de Leuti, et al. (2019)⁸²

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito imunomodulatório da suplementação de ômega-3 no processo inflamatório em um modelo animal de DPIC.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o efeito da suplementação com ômega-3 sobre o edema da pata de camundongos com DPIC.

Verificar o efeito da suplementação com ômega-3 sobre as concentrações de citocinas: TGF- β , IL-4, IL-10, TNF e MCP-1 no músculo e pele da pata de camundongos submetidos ao modelo de DPIC.

Avaliar o efeito da suplementação com ômega-3 sobre o fenótipo de macrófagos (M1 e M2), no músculo da pata de camundongos submetidos ao modelo de DPIC.

3 MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDO

Este estudo possui natureza experimental pré-clínica.

3.2 MATERIAL E EQUIPAMENTOS

Os materiais e equipamentos utilizados serão listados a seguir, com seus respectivos fabricantes e locais de origem. Fish Oil/Ômega-3 (Natural Quanta, Orlando-FL, EUA). Óleo de milho (Liza, Mairinque-SP, Brasil). Micrômetro digital universal (Insize, Loganville, Georgia, EUA). Seringa para gavagem (Bonther Equipamentos para Ensino e Pesquisa, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil). Tiopental (Cristália, São Paulo, Brasil). Cetamina (Vetnil, São Paulo, Brasil). Xilazina (Ceva, São Paulo, Brasil). Isoflurano (Isoforine®, Cristália Prod. Quím. Farm. Ltda., São Paulo, SP, Brasil). Anéis elásticos (Elástico Ligadura 000-1237 Uniden, São Paulo, Brasil). Balança de alta precisão (Shimadzu Corporation, Japão). Para os Ensaios de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) foi utilizado: Tween® 20, fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF), ácido etileno-diamino-tetra-acético (EDTA), aprotinina, cloreto de benzetônio e albumina de soro bovino (BSA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), Kits de ELISA para camundongos (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) e Leitor de placas (Perlong DNM-9602, Nanjing Perlove Medical Equipment Co, Nanjing, China). Para o Western Blotting foi utilizado: Tampão de lise RIPA, Ortovanadato de sódio, PMSF, Coquetel de inibidores de proteases e tampão Laemmli (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), membrana de PVDF (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), anticorpo monoclonal Rabbit anti-iNOS/NOS 2 (NBP1-33780, Novus Biologicals, Centennial, CO, EUA), anticorpo monoclonal Rabbit anti-Arginase-1 (93668S, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EUA), anticorpo monoclonal Mouse anti-CD86 (ab213044, Abcan, Cambridge, MA, EUA), Solução de Ponceau S (Ponceau S solution, P7170, Sigma-Aldrich, MO, EUA), kit de quimiluminescência (ECL; Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, EUA), fotodocumentador e software de aquisição das imagens (iBright Imaging Systems, iBright Analysis Software, Invitrogen/Thermo Fisher

Scientific, Waltham, MA, EUA). Para as análises estatísticas será utilizado o software GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA).

3.3 ANIMAIS

Os experimentos foram conduzidos usando camundongos *Swiss* fêmeas (40-50 g, \pm dois meses), obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) – os quais foram mantidos no biotério do Laboratório de Neurociência Experimental (LaNEx) da Universidade do Sul de Santa Catarina – UNISUL, em caixas de polipropileno (49 x 34 x 16 cm), com grades de aço inox. Foram mantidos 10 animais por caixa distribuídos aleatoriamente, os quais permaneceram em ambientes climatizados a 22 ± 2 °C, no ciclo 12h-claro/12h-escuro (claro a partir das 06h), com livre acesso a ração e água. Os animais foram randomizados aleatoriamente e distribuídos entre os grupos e foram aclimatizados no laboratório por pelo menos 1h antes dos testes comportamentais. Os experimentos foram realizados de acordo com o guia de cuidados de animais de laboratório e guia ético para investigações experimentais da dor em animais conscientes⁸⁸. O número de animais utilizados e a intensidade dos estímulos nocivos foram o mínimo necessário para demonstrar o efeito dos tratamentos.

Foram utilizados os seguintes grupos experimentais: (1) Salina/Sham, animais suplementados apenas com salina (NaCl 0,9 %) durante 30 dias e posteriormente, submetidos à anestesia por 3 horas, sem realização do modelo de DPIC. (2) Salina/DPIC, animais suplementados com salina (NaCl 0,9 %) e posteriormente, submetidos ao modelo de DPIC. (3) Óleo de Milho/DPIC, animais suplementados apenas com óleo de milho (1.500 mg/Kg), utilizado como controle da suplementação. (4) Ômega-3/DPIC, animais que foram suplementados com 1.500 mg/Kg de ômega-3 e posteriormente, submetidos ao modelo de DPIC.

3.3.1 Critérios de Exclusão

Para refinamento do modelo experimental, redução do sofrimento dos animais, como também manutenção do bem-estar animal, foi aplicada uma escala para verificação de sinais de estresse e dor, seguindo as diretrizes de Hawkins et al. (2011)⁸⁹. Desta forma, se o animal apresentou sinais de dor severa, trauma por automutilação, vocalização sem

ser estimulado ou vocalização ao ser estimulado (associado aos demais sinais clínicos), eles foram excluídos do estudo, aplicando-se a eutanásia de forma apropriada e eficaz.

Ainda, utilizamos os seguintes parâmetros ou sinais de exclusão para a determinação de continuidade do uso do animal: apatia, sinais de infecção sistêmica (letargia, postura encurvada, aumento da frequência respiratória), aparecimento de crises convulsivas, inconformidades motoras, incapacidade de se mover dentro da caixa moradia, imobilidade mesmo ao ser estimulado, incapacidade de ingerir água e alimento, mesmo tendo acesso a esses recursos, 20% de perda de peso comparado ao início do experimento ou desidratação (perda de turgor da pele após pinçamento) por mais de 48h⁸⁹.

3.3.2 Cálculo amostral

O número de animais por grupo foi definido de acordo com a equação para a determinação de uma amostra sem reposição. Para tal, foi utilizada a fórmula. Sendo que, o valor de alfa foi fixado em 0,05 e o valor de z alfa baseado na tabela de valores de z para distribuição bicaudal de 1,96. O valor de beta foi determinado em 0,10 e o valor de z beta baseado na tabela de valor de z para distribuição unicaudal de 1,28⁹⁰.

Foi estabelecido o mínimo de 40% como valor de diferença entre as médias dos grupos, baseado em dados experimentais do LaNEx. Levou-se em consideração ainda que experimentos biológicos possuem margem de erro entre 10 a 15% procedentes de variações individuais, erros no procedimento anestésico e/ou cirúrgico, dentre outras variáveis. Além disso, diferenças menores que 20% entre médias de dois grupos podem aumentar a ocorrência de erros tipo I ou II⁹⁰. Dessa forma, estabelecido o valor do desvio padrão em 35% do valor das médias, aplicando na fórmula citada, obtém-se: $n = (((1,96 + 1,28) * 35) / 40)^2 = 8,0$. Conclui-se que serão necessários, no mínimo, 8 animais em cada grupo experimental⁹⁰.

Em decorrência dos critérios de exclusão estabelecidos fixou-se uma perda total de 30%. Sendo assim, para cada grupo de 8 animais necessários para os experimentos, foram submetidos ao modelo experimental de isquemia e reperfusão 11 animais.

3.4 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Como ilustrado na figura 8, na condução deste estudo foi realizada uma avaliação basal para avaliar a espessura da pata através do micrômetro. A partir disso foi realizada a suplementação diária dos animais por via intragástrica (i.g) com ômega-3 (dose 1.500 mg/Kg), óleo de milho (1.500 mg/Kg) ou salina (NaCl 0,9%) por 30 dias. A avaliação da espessura da pata para mensurar o edema foi realizada diariamente, até o 4º dia após a indução do modelo. Esses animais foram submetidos à eutanásia no 15º dia após a indução da lesão para o ELISA. Num outro grupo experimental que passou pelo mesmo protocolo de suplementação com ômega-3, 48 horas após a indução do modelo de DPIC os camundongos foram anestesiados e eutanasiados para a retirada das amostras para as análises bioquímicas de ELISA e Western Blotting (WB).

3.5 ENSAIOS/TESTES/TÉCNICAS

3.5.1 Indução do modelo animal de DPIC

A indução do modelo animal de DPIC, que mimetiza em animais a SDRC do tipo I, foi feita por meio da geração de isquemia e posterior reperfusão da pata dos animais. Este procedimento leva ao quadro de hiperalgesia mecânica, conforme descrito anteriormente para ratos⁵⁰ e adaptado para camundongos⁵¹. Para isso, os camundongos foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal (i.p) de tiopental (80 mg/Kg). Após a verificação do estado de inconsciência do animal foi iniciado o procedimento. Este consistiu no posicionamento de um anel de elástico de 1,2 mm de diâmetro proximal à articulação do tornozelo direito, da pata traseira do animal, de modo a fazer um torniquete.

O animal foi mantido anestesiado com o torniquete durante três horas, em seguida, o anel elástico foi cortado permitindo a reperfusão da pata. Naqueles animais que retornaram da anestesia antes das três horas foram administrados reforços anestésicos com tiopental (20% do volume inicial, na mesma dose).

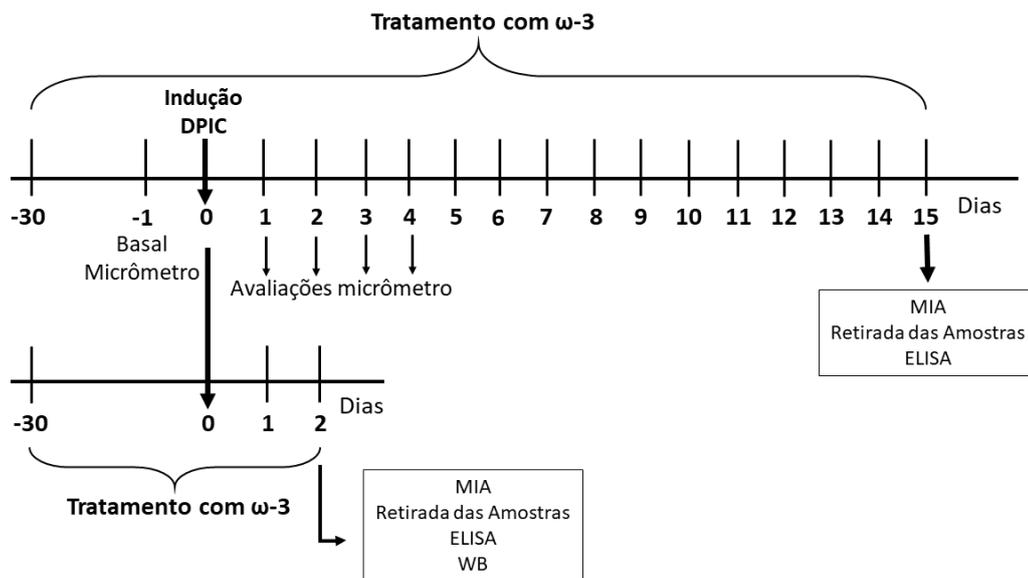


Figura 8 – Desenho experimental.

Legenda: A figura mostra o desenho experimental com realização da suplementação crônica de ômega-3 por 30 dias e em seguida uma avaliação basal da espessura da pata através do micrômetro antes do procedimento de isquemia e reperfusão, posteriormente foi realizada a indução do modelo animal de DPIC e, os tratamentos com ômega-3 continuaram diariamente até o 4º dia após a indução do modelo, onde foram realizadas avaliações diárias da espessura da pata, e após 15 dias foi realizada a retirada de estruturas para o ensaio bioquímico de ELISA. Ainda, num segundo experimento, os animais receberam o mesmo protocolo de suplementação previamente a indução do modelo animal de DPIC e suplementados até 2 dias (48 horas) após a indução do modelo, onde foram realizadas retiradas de estruturas para os ensaios bioquímicos de ELISA e Western Blotting. A linha do tempo está expressa em dias; DPIC, Dor Pós Isquemia Crônica; ω 3, ômega-3; MIA, Morte Indolor Assistida; WB, Western Blotting e ELISA, Ensaio de Imunoabsorção Ligado à Enzima.

3.5.2 Tratamento com ômega-3 e óleo de milho

O tratamento com óleo de peixe ômega-3 e óleo de milho (dose de 1.500 mg/Kg por via i.g) foi realizado durante 30 dias antes da indução da DPIC, e após a indução da DPIC, foi administrado por mais 4 dias para a avaliação da espessura da pata, e até o 15º dia, onde foi realizado a morte indolor assistida (MIA) e a coleta das amostras para o ELISA. Num outro experimento com o mesmo protocolo de suplementação pré-indução da DPIC, os animais foram tratados até 48 horas após a indução do modelo, quando foi realizada a MIA para a retirada das estruturas para o ELISA e WB. O ômega-3 foi retirado da cápsula original (1.000 mg, contendo 400 mg de EPA e 300 mg de DHA) com o auxílio de seringa e foi imediatamente administrado. Assim como o óleo de milho foi retirado de sua embalagem original e foi imediatamente administrado.

3.5.3 Avaliação da espessura da pata

O edema de pata foi avaliado por meio da medida da espessura da porção média da pata posterior direita dos animais, utilizando-se um micrômetro digital. Para a mensuração o aparelho foi posicionado entre o dorso e a porção plantar da pata⁹¹. As avaliações foram realizadas antes do início da suplementação, um dia antes da indução do modelo de DPIC e diariamente até o 4º dia após a IR, detalhadas na figura 5. Os resultados foram expressos em micrômetros (μm), com o valor da espessura total da pata.

3.5.4 Ensaios bioquímicos

Decorridos os 30 dias de suplementação com ômega-3 ou veículo, 48 horas e 15 dias após a indução do modelo de DPIC, os camundongos foram anestesiados (1-2 % de isoflurano a 100% de oxigênio) e a MIA foi realizada por decapitação para a dissecação da pele e músculo, separadamente, da pata posterior direita, para a realização dos ensaios bioquímicos descritos a seguir. Após a dissecação as amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e estocadas em freezer -80 °C até a realização das análises.

3.5.4.1 Ensaio de Imunoabsorção Enzimática

O ELISA foi realizado para a análise de citocinas do processo inflamatório. As amostras foram homogeneizadas em tampão fosfato (PBS) contendo: Tween® 20 (0,05%), PMSF (0,1 mM), EDTA (10 mM), aprotinina (2 ng/ml) e cloreto de benzetônio (0,1 mM). Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 6000 $\times g$ por 15 minutos (4 °C) e o sobrenadante foram coletado e estocado a -80 °C, para as futuras análises. O conteúdo proteico total do sobrenadante foi mensurado pelo método de Bradford, utilizando uma curva padrão de calibração com BSA (0,05 a 0,5 mg/mL). Alíquotas de 100 μl foram utilizadas para mensurar as concentrações das citocinas: IL-4, IL-10, TGF- β 1, MCP-1 e TNF por meio de kits de ELISA para camundongos de acordo com instruções do fabricante. As concentrações das citocinas foram mensurados pela interpolação de uma curva padrão de 7 pontos, por mensuração colorimétrica a 450 nm

(corrigidas pela subtração da leitura a 550 nm) em um espectrofotômetro de placas e, os valores foram expressos em pg de citocina/mg de proteína, como descrito resumidamente no trabalho de Belmonte e Colaboradores (2018)⁹².

3.5.4.2 Western Blotting

O ensaio de Western Blotting foi utilizado para a quantificação do imunocontéudo das proteínas: NOS2 e CD86, para marcação de macrófagos M1 e Arginase-1, para marcação de macrófagos M2. As amostras foram pulverizadas e incubadas em tampão de lise RIPA [composto por Nonidet P-40 1%, deoxicolato de sódio 0,5%, SDS 0,1% e PBS], acrescido de ortovanadato de sódio 100 mM, PMSF 100 mM e coquetel de inibidores de proteases 1% e, em seguida, incubados em gelo por 30 minutos. Após centrifugação a 6000 $\times g$ por 20 minutos (4°C) o sobrenadante foi recolhido, separado e armazenado em freezer -80 °C. O conteúdo proteico foi mensurado pelo método de Bradford, utilizando uma curva padrão de calibração com BSA (0,05 a 0,5 mg/mL). Aliquotas de proteína total (50 μg) foram fervidas a 95°C por 5 minutos em 25% do volume em tampão Laemmli (fosfato de sódio 1M pH 7,0, 10% Docecil Sulfato de Sódio (SDS), 10% β -mercaptoetanol, 50% glicerol, 0,1% azul de bromofenol).

As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 8%. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose em voltagem constante de 90 V por 2 h. Depois de uma hora de bloqueio com 5% de leite desnatado (Molico) as membranas foram lavadas e incubadas com solução *Ponceau S* para a detecção das proteínas transferidas. Essa marcação foi capturada por leitura colorimétrica em um fotodocumentador e utilizada como controle de carga de proteína. Após a lavagem para remover a coloração com *Ponceau S* as membranas foram incubadas *overnight* (4°C) com os anticorpos primários: *Rabbit* anti-iNOS; *Mouse* anti-CD86 ou *Rabbit* anti-Arginase-1. Depois de lavadas em tampão salina tris com Tween[®] 20 (TBS-T) (137 mM NaCl e 20 mM Tris HCl + 0,1% Tween[®] 20, pH 7,6) as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário apropriado, conjugado à peroxidase em temperatura ambiente por uma hora. Após esse período, uma nova lavagem de 30 minutos com TBS-T foi realizada seguida pela exposição das membranas, durante 1 minuto, ao *kit* de quimiluminescência (ECL) e revelação através de um fotodocumentador. As análises quantitativas das bandas foram realizadas por densitometria pelo programa Image Studio Lite. Os valores foram expressos graficamente como unidades arbitrárias

em relação ao controle (Salina/Sham), conforme descrito resumidamente no trabalho de Mazzardo-Martins (2018)⁹³.

3.6 VARIÁVEIS DE ESTUDO

As variáveis de estudo, dependentes e independentes, estão especificadas no quadro 1.

Quadro 1- Variáveis de estudo.

Variáveis	Tipo	Natureza	Proposta de utilização
Modelo animal de DPIC	Independente	Qualitativa nominal	Induzido o modelo (DPIC) ou não induzido (Sham)
Tratamentos com ômega-3, óleo de milho ou salina	Independente	Qualitativa nominal	Tratado ou não tratado
Níveis de citocinas (TGF- β ; IL-4; IL-10; TNF; MCP-1).	Dependente	Quantitativo contínuo	Média e desvio padrão (pg de citocina/mg de proteína)
Imunoconteúdo de NOS2, CD86 (M1), Arginase-1 (M2)	Dependente	Quantitativo contínuo	Média e desvio padrão/ (unidades arbitrarias)
Espessura da pata	Dependente	Quantitativa contínua	Média e desvio padrão (espessura da pata em μm)

3.7 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS

Os resultados foram analisados no programa *Graph Pad Prism* na versão 6.0 (*La Jolla*, Califórnia, EUA). Foi avaliado a distribuição dos dados por meio do teste de *Shapiro – Wilk* e considerados paramétricos. Desta forma, os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão (DP). Os dados da medida da espessura da pata foram comparados usando análise de variância (ANOVA) duas vias, seguido pelo teste de *Bonferroni*. Para os resultados bioquímicos utilizamos o teste *t* de Student não pareado. Em todas as análises, valores de P menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

3.8 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

Todos os procedimentos com animais foram realizados após a aprovação do projeto pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNISUL (protocolo nº 18.050.4.01.IV). Os experimentos foram realizados conforme o guia de cuidados de animais de laboratório e guia ético para investigações experimentais da dor em animais conscientes⁸⁸, e estavam de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) descritos na Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins científicos e didáticos (DBCA)⁹⁴. A MIA foi realizada sob anestesia com isoflurano (2-3% a 100% de oxigênio) e com a supervisão de médico veterinário responsável de acordo com a resolução 1000, 12/05/2012 – Conselho Federal de Medicina Veterinária.

4 ARTIGO CIENTÍFICO

A seguir está inserido o artigo científico fruto dessa dissertação de Mestrado, que foi submetido para a revista científica *Inflammation* (Springer Nature) com fator de impacto de 2.939 (B1 Med II).

IMMUNOMODULATORY EFFECT OF OMEGA-3 FATTY ACID SUPPLEMENTATION IN A MODEL OF COMPLEX REGIONAL PAIN SYNDROME TYPE I IN MICE

Paula Franson Fernandes^a, Taynah de Oliveira Galassi^a, Afonso Shiguemi Inoue Salgado^{a, b}, Vêronica Vargas Horewicz^a, Josiel Mileno Mack^c, Daniel Fernandes Martins^{a, #}, Franciane Bobinski^{a, *, #}

^a Postgraduate Program in Health Sciences, Laboratory of Experimental Neuroscience (LaNEx), University of Southern Santa Catarina (UNISUL), 88.137-270, Palhoça - SC, Brazil.

^b Integrative Physical Therapy Residency – Philadelphia University Center, Londrina, PR, Brazil.

^c Department of Medical Clinic, Graduate Program in Medical Sciences, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis 88.040-900, SC, Brazil.

[#] Co-Senior authors

^{*} *Corresponding author*: Franciane Bobinski, PhD, Experimental Neuroscience Laboratory, Post-Graduate Program of Health Science, Southern University of Santa Catarina, Campus Grande Florianópolis, Palhoça, Santa Catarina, Brazil. Phone: +55 48 3279- 1057, E-mail: franciane.bobinski@unisul.br

The authors also contributed to this work.

RESUMO

A Síndrome da Dor Regional Complexa (SDRC) apresenta como sintomas principais dor crônica e edema, é normalmente desencadeada por um trauma ou processo cirúrgico e se estabelece após um intenso processo inflamatório gerado pela lesão. O Ômega-3, um óleo de peixe rico em ácido eicosapentaenoico (EPA) e ácido docosaexaenoico (DHA), é conhecido pelas suas propriedades imunomodulatórias, anti-inflamatórias

e pró-resolutivas. Assim, o objetivo do estudo foi verificar o efeito da suplementação com ômega 3 no edema das patas e o seu efeito imunomodulatório na interleucina (IL)-4, IL-10, fator de crescimento do transformador- β 1 (TGF- β 1), proteína quimiotática de monócito-1 (MCP-1) e fator de necrose tumoral (TNF) na pele e no músculo da pata, e nos fenótipos de macrófagos (M1 e M2) no músculo da pata de camundongos submetidos ao modelo Dor Pós Isquemia Crônica (DPIC), que mimetiza a SDRC em humanos. Sugere-se que o ômega-3 tem função imunomodulatória pois foi capaz de reduzir o edema das patas, assim como foi capaz de regular as concentrações de citocinas anti-inflamatórias e pró-resolutivas, tais como IL-4 e IL-10.

Palavras-chave: Ômega-3; PUFAs; Síndrome da Dor Regional Complexa; Edema; Citocinas.

ABSTRACT

The Complex Regional Pain Syndrome (CRPS) presents as main symptoms chronic pain and edema, it is usually triggered by a trauma or surgical process and establishes itself after an intense inflammatory process generated by the injury. Omega-3, a fish oil rich in eicosapentaenoic acid (EPA) and docosaenoic acid (DHA), is known for its immunomodulatory, anti-inflammatory and pro-resolutive properties. Thus, the objective of the study was to verify the effect of omega-3 supplementation on paw edema and its immunomodulatory effect on interleukin (IL)-4, IL-10, transformer growth factor- β 1 (TGF- β 1), monocyte-1 chemotactic protein (MCP-1) and tumor necrosis factor (TNF) in the skin and paw muscle, and on macrophage phenotypes (M1 and M2) in the paw muscle of mice subjected to the Chronic Post-Ischemia Pain (CPIP) model, which mimics CRPS in humans. It is suggested that omega-3 has immunomodulatory function because it was able to reduce paw edema, as well as it was able to regulate concentrations of anti-inflammatory and pro-resolutive cytokines such as IL-4 and IL-10.

Key-words: Omega-3; PUFAs; Complex Regional Pain Syndrome; Edema; Cytokines.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho demonstrou que a suplementação com ômega-3 tem efeito anti-edematogênico, pois foi promovida uma diminuição do edema da pata dos animais submetidos à DPIC. Também demonstrou um possível efeito pró-resolutivo e anti-inflamatório por aumentar IL-4 no músculo da pata nas 48 horas após DPIC. A IL-10 se apresentou diminuída na pele nas 48 horas após a indução do modelo, porém aumentou no músculo nos 15 dias após DPIC nos animais suplementados com ômega-3. Por outro lado, a suplementação com ômega-3 não alterou os níveis de TGF- β 1.

Em relação às citocinas pró-inflamatórias a suplementação com ômega-3 promoveu uma tendência em diminuir o TNF no músculo, porém não foi estatisticamente significativo. A MCP-1 estava aumentada em todos os grupos submetidos ao modelo e a suplementação com ômega-3 não alterou esses níveis, que permaneceram elevados.

No segundo dia após a DPIC a suplementação preventiva com ômega-3 não foi capaz de alterar os marcadores de macrófagos M1 e M2, apesar de a lesão induzir uma redução de macrófagos do fenótipo M2. Por outro lado, 15 dias após DPIC ocorreu aumento dos níveis de IL-10 no músculo.

Em conjunto, nossos resultados demonstram um consistente efeito imunomodulatório da suplementação preventiva do ômega-3 em um modelo animal de SDRC-I. Os achados do presente estudo ampliam e corroboram os dados da literatura demonstrando a ação anti-edematogênica e a regulação positiva de citocinas anti-inflamatórias importantes como a IL-4 precocemente, e a IL-10 tardiamente após a suplementação com ômega-3.

O presente trabalho trouxe resultados inéditos para a literatura e demonstrou que a suplementação preventiva com ômega-3 pode ser utilizada para a prevenção do curso patológico de inúmeras doenças inflamatórias, como a SDRC. O ômega-3 é encontrado no mercado por um valor relativamente barato e pode ser facilmente prescrito por profissionais da saúde.

REFERÊNCIAS

1. Hauser J, Hsu B, Nader ND. Inflammatory processes in complex regional pain syndromes. *Immunol Invest*. 2013;42(4):263–72.
2. Field J. Complex regional pain syndrome: a review. *J Hand Surg (European Vol)*. 2013;38(6):616–26.
3. Gaspar AT, Antunes F. Type I complex regional pain syndrome. *Acta Med Port*. 2011;24(6):1031–40.
4. Beerthuizen A, Stronks DL, van't Spijker A, Yaksh A, Hanraets BM, Klein J, et al. Demographic and medical parameters in the development of complex regional pain syndrome type 1 (CRPS1): prospective study on 596 patients with a fracture. *Pain*. 2012;153(6):1187–92.
5. Russo M, Georgius P, Santarelli DM. A new hypothesis for the pathophysiology of complex regional pain syndrome. *Med Hypotheses*. 2018;119:41–53.
6. Birklein F, Dimova V. Complex regional pain syndrome—up-to-date. *Pain reports*. 2017;2(6).
7. de Mos M, De Bruijn AGJ, Huygen F, Dieleman JP, Stricker BHC, Sturkenboom M. The incidence of complex regional pain syndrome: a population-based study. *Pain*. 2007;129(1–2):12–20.
8. Sandroni P, Benrud-Larson LM, McClelland RL, Low PA. Complex regional pain syndrome type I: incidence and prevalence in Olmsted county, a population-based study. *Pain*. 2003;103(1–2):199–207.
9. Bussa M, Guttilla D, Lucia M, Mascaro A, Rinaldi S. Complex regional pain syndrome type I: a comprehensive review. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2015;59(6):685–97.
10. Bean DJ, Johnson MH, Heiss-Dunlop W, Kydd RR. Extent of recovery in the first 12 months of complex regional pain syndrome type-1: A prospective study. *Eur J Pain*. 2016;20(6):884–94.
11. Bean DJ, Johnson MH, Heiss-Dunlop W, Lee AC, Kydd RR. Do psychological factors influence recovery from complex regional pain syndrome type 1? A prospective study. *Pain*. 2015;156(11):2310–8.
12. Marinus J, Moseley GL, Birklein F, Baron R, Maihöfner C, Kingery WS, et al. Clinical features and pathophysiology of complex regional pain syndrome. *Lancet Neurol*. 2011;10(7):637–48.
13. Birklein F, Drummond PD, Li W, Schlereth T, Albrecht N, Finch PM, et al. Activation of cutaneous immune responses in complex regional pain syndrome. *J Pain*. 2014;15(5):485–95.

14. Schinkel C, Gaertner A, Zaspel J, Zedler S, Faist E, Schuermann M. Inflammatory mediators are altered in the acute phase of posttraumatic complex regional pain syndrome. *Clin J Pain*. 2006;22(3):235–9.
15. Üçeyler N, Eberle T, Rolke R, Birklein F, Sommer C. Differential expression patterns of cytokines in complex regional pain syndrome. *Pain*. 2007;132(1–2):195–205.
16. Bruehl S. Complex regional pain syndrome. *Bmj*. 2015;351:h2730.
17. Smart KM, Wand BM, O’Connell NE. Physiotherapy for pain and disability in adults with complex regional pain syndrome (CRPS) types I and II. *Cochrane Database Syst Rev*. 2016;(2).
18. Calder PC. Polyunsaturated fatty acids, inflammatory processes and inflammatory bowel diseases. *Mol Nutr Food Res*. 2008;52(8):885–97.
19. Serhan CN, Chiang N, Van Dyke TE. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(5):349–61.
20. Bannenberg G, Serhan CN. Specialized pro-resolving lipid mediators in the inflammatory response: an update. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Molecular Cell Biol Lipids*. 2010;1801(12):1260–73.
21. Tan A, Sullenbarger B, Prakash R, McDaniel JC. Supplementation with eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid reduces high levels of circulating proinflammatory cytokines in aging adults: A randomized, controlled study. *Prostaglandins, Leukot Essent Fat Acids*. 2018;132:23–9.
22. Calder PC. Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: effects, mechanisms and clinical relevance. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Molecular Cell Biol Lipids*. 2015;1851(4):469–84.
23. De Caterina R, Kristensen SD, Schmidt EB. *Fish oil and vascular disease*. Springer; 1992.
24. Serhan CN, Clish CB, Brannon J, Colgan SP, Chiang N, Gronert K. Novel functional sets of lipid-derived mediators with antiinflammatory actions generated from omega-3 fatty acids via cyclooxygenase 2–nonsteroidal antiinflammatory drugs and transcellular processing. *J Exp Med*. 2000;192(8):1197–204.
25. Zhang E, Kim J-J, Shin N, Yin Y, Nan Y, Xu Y, et al. High omega-3 polyunsaturated fatty acids in fat-1 mice reduce inflammatory pain. *J Med Food*. 2017;20(6):535–41.
26. Calder PC. Omega-3 fatty acids and inflammatory processes: from molecules to man. *Biochem Soc Trans*. 2017;45(5):1105–15.

27. Laye S, Nadjar A, Joffre C, Bazinet RP. Anti-inflammatory effects of omega-3 fatty acids in the brain: physiological mechanisms and relevance to pharmacology. *Pharmacol Rev.* 2018;70(1):12–38.
28. Dyall SC. Long-chain omega-3 fatty acids and the brain: a review of the independent and shared effects of EPA, DPA and DHA. *Front Aging Neurosci.* 2015;7:52.
29. Haast RAM, Kiliaan AJ. Impact of fatty acids on brain circulation, structure and function. *Prostaglandins, Leukot Essent Fat Acids.* 2015;92:3–14.
30. Kreling MCGD, Cruz D de ALM, Pimenta CA de M. Prevalencia de dolor crônico en adultos. *Rev Bras Enferm.* 2006;59(4):509–13.
31. Iolascon G, de Sire A, Moretti A, Gimigliano F. Complex regional pain syndrome (CRPS) type I: historical perspective and critical issues. *Clin cases Miner bone Metab.* 2015;12(Suppl 1):4.
32. Huygen FJPM, de Bruijn AGJ, Klein J, Zijlstra FJ. Neuroimmune alterations in the complex regional pain syndrome. *Eur J Pharmacol.* 2001;429(1–3):101–13.
33. Vural SP, Yuzer GFN, Ozcan DS, Ozbudak SD, Ozgirgin N. Effects of mirror therapy in stroke patients with complex regional pain syndrome type 1: a randomized controlled study. *Arch Phys Med Rehabil.* 2016;97(4):575–81.
34. Allen MJ, Shan X, Caruccio P, Froggett SJ, Moffat KG, Murphey RK. Targeted expression of truncated glued disrupts giant fiber synapse formation in *Drosophila*. *J Neurosci.* 1999;19(21):9374–84.
35. Heijmans-Antonissen C, Wesseldijk F, Munnikes RJM, Huygen FJPM, van der Meijden P, Hop WCJ, et al. Multiplex bead array assay for detection of 25 soluble cytokines in blister fluid of patients with complex regional pain syndrome type 1. *Mediators Inflamm.* 2006;2006.
36. Laferrière A, Millecamps M, Xanthos DN, Xiao WH, Siau C, de Mos M, et al. Cutaneous tactile allodynia associated with microvascular dysfunction in muscle. *Mol Pain.* 2008;4:1744–8069.
37. Kumar V. *Robbins patologia básica.* 9 ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2013. 928 p.
38. Lent R. *Cem bilhões de neurônios? Conceitos Fundamentais de neurociência.* 2.ed. Rio de Janeiro: Atheneu; 2010.
39. Krämer HH, Eberle T, Üçeyler N, Wagner I, Klonschinsky T, Müller LP, et al. TNF-alpha in CRPS and ‘normal’ trauma—significant differences between tissue and serum. *Pain.* 2011;152(2):285–90.
40. Alexander GM, Perreault MJ, Reichenberger ER, Schwartzman RJ. Changes in immune and glial markers in the CSF of patients with complex regional pain syndrome. *Brain Behav Immun.* 2007;21(5):668–76.

41. Alexander GM, Peterlin BL, Perreault MJ, Grothusen JR, Schwartzman RJ. Changes in plasma cytokines and their soluble receptors in complex regional pain syndrome. *J Pain*. 2012;13(1):10–20.
42. Alexander GM, Van Rijn MA, Van Hilten JJ, Perreault MJ, Schwartzman RJ. Changes in cerebrospinal fluid levels of pro-inflammatory cytokines in CRPS. *Pain*. 2005;116(3):213–9.
43. Holzer P. Neurogenic vasodilatation and plasma leakage in the skin. *Gen Pharmacol Vasc Syst*. 1998;30(1):5–11.
44. Maihöfner C, Handwerker HO, Neundörfer B, Birklein F. Mechanical hyperalgesia in complex regional pain syndrome: A role for TNF- α ? *Neurology*. 2005;65(2):311–3.
45. Sherwood ER, Toliver-Kinsky T. Mechanisms of the inflammatory response. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*. 2004;18(3):385–405.
46. Sommer C, Kress M. Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia. *Neurosci Lett*. 2004;361(1–3):184–7.
47. Wasner G, Heckmann K, Maier C, Baron R. Vascular abnormalities in acute reflex sympathetic dystrophy (CRPS I): complete inhibition of sympathetic nerve activity with recovery. *Arch Neurol*. 1999;56(5):613–20.
48. Bolwerk A, Seifert F, Maihöfner C. Altered resting-state functional connectivity in complex regional pain syndrome. *J Pain*. 2013;14(10):1107–15.
49. Birklein F, Ibrahim A, Schlereth T, Kingery WS. The rodent tibia fracture model: a critical review and comparison with the complex regional pain syndrome literature. *J Pain*. 2018;19(10):1102-e1.
50. Coderre TJ, Xanthos DN, Francis L, Bennett GJ. Chronic post-ischemia pain (CPIP): a novel animal model of complex regional pain syndrome-type I (CRPS-I; reflex sympathetic dystrophy) produced by prolonged hindpaw ischemia and reperfusion in the rat. *Pain*. 2004;112(1–2):94–105.
51. Millecamps M, Laferrière A, Ragavendran JV, Stone LS, Coderre TJ. Role of peripheral endothelin receptors in an animal model of complex regional pain syndrome type 1 (CRPS-I). *Pain*. 2010;151(1):174–83.
52. Bruehl S, Maihöfner C, Stanton-Hicks M, Perez RSGM, Vatine J-J, Brunner F, et al. Complex regional pain syndrome: evidence for warm and cold subtypes in a large prospective clinical sample. *Pain*. 2016;157(8):1674–81.
53. Klafke JZ, Da Silva MA, Rossato MF, de Prá SDT, Rigo FK, Bochi G V, et al. Acute and chronic nociceptive phases observed in a rat hind paw ischemia/reperfusion model depend on different mechanisms. *Pflügers Arch J Physiol*. 2016;468(2):229–41.

54. Xanthos DN, Coderre TJ. Sympathetic vasoconstrictor antagonism and vasodilatation relieve mechanical allodynia in rats with chronic postischemia pain. *J Pain*. 2008;9(5):423–33.
55. Piovezan AP, Batisti AP, Benevides ML, Turnes BL, Martins DF, Kanis L, et al. Hydroalcoholic crude extract of *Casearia sylvestris* Sw. reduces chronic post-ischemic pain by activation of pro-resolving pathways. *J Ethnopharmacol*. 2017;204:179–88.
56. Bratti T. Caracterização comportamental, bioquímica e farmacológica e efeito da natação sobre o modelo experimental da síndrome da dor complexa regional tipo I em camundongos. [dissertação de mestrado]. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Neurociências; 2012.
57. Ekeland A, Engesæter LB, Langeland N. Mechanical properties of fractured and intact rat femora evaluated by bending, torsional and tensile tests. *Acta Orthop Scand*. 1981;52(6):605–13.
58. Siegel SM, Lee JW, Oaklander AL. Needlestick distal nerve injury in rats models symptoms of complex regional pain syndrome. *Anesth Analg*. 2007;105(6):1820–9.
59. Gradl G, Gaida S, Finke B, Gierer P, Mittlmeier T, Vollmar B. Exaggeration of tissue trauma induces signs and symptoms of acute CRPS I, however displays distinct differences to experimental CRPS II. *Neurosci Lett*. 2006;402(3):267–72.
60. Ota H, Arai T, Iwatsuki K, Urano H, Kurahashi T, Kato S, et al. Pathological mechanism of musculoskeletal manifestations associated with CRPS type II: an animal study. *Pain*. 2014;155(10):1976–85.
61. Van Der Laan L, Kapitein PJC, Oyen WJG, Verhofstad AAJ, Hendriks T, Goris RJA. A novel animal model to evaluate oxygen derived free radical damage in soft tissue. *Free Radic Res*. 1997;26(4):363–72.
62. Serhan CN. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature*. 2014;510(7503):92–101.
63. Gilroy DW, Lawrence T, Perretti M, Rossi AG. Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*. 2004;3(5):401–16.
64. Serhan CN, Brain SD, Buckley CD, Gilroy DW, Haslett C, O'Neill LAJ, et al. Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. *FASEB J*. 2007;21(2):325–32.
65. Kigerl KA, Gensel JC, Ankeny DP, Alexander JK, Donnelly DJ, Popovich PG. Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord. *J Neurosci*. 2009;29(43):13435–44.

66. MacMicking J, Xie Q, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol.* 1997;15(1):323–50.
67. Arnold CE, Whyte CS, Gordon P, Barker RN, Rees AJ, Wilson HM. A critical role for suppressor of cytokine signalling 3 in promoting M1 macrophage activation and function in vitro and in vivo. *Immunology.* 2014;141(1):96–110.
68. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 2004;25(12):677–86.
69. Röszer T. Understanding the mysterious M2 macrophage through activation markers and effector mechanisms. *Mediators Inflamm.* 2015;2015.
70. Duluc D, Delneste Y, Tan F, Moles M-P, Grimaud L, Lenoir J, et al. Tumor-associated leukemia inhibitory factor and IL-6 skew monocyte differentiation into tumor-associated macrophage-like cells. *Blood, J Am Soc Hematol.* 2007;110(13):4319–30.
71. Komori T, Morikawa Y, Inada T, Hisaoka T, Senba E. Site-specific subtypes of macrophages recruited after peripheral nerve injury. *Neuroreport.* 2011;22(17):911–7.
72. Kiguchi N, Sakaguchi H, Kadowaki Y, Saika F, Fukazawa Y, Matsuzaki S, et al. Peripheral administration of interleukin-13 reverses inflammatory macrophage and tactile allodynia in mice with partial sciatic nerve ligation. *J Pharmacol Sci.* 2017;133(1):53–6.
73. Kiguchi N, Kobayashi Y, Saika F, Sakaguchi H, Maeda T, Kishioka S. Peripheral interleukin-4 ameliorates inflammatory macrophage-dependent neuropathic pain. *Pain.* 2015;156(4):684–93.
74. Serhan CN, Hong S, Gronert K, Colgan SP, Devchand PR, Mirick G, et al. Resolvins: a family of bioactive products of omega-3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter proinflammation signals. *J Exp Med.* 2002;196(8):1025–37.
75. Serhan CN, Chiang N, Van Dyke TE. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(5):349–61.
76. Calder PC. Polyunsaturated fatty acids and inflammation. Portland Press Ltd.; 2005.
77. Samuelsson B, Dahlen S-E, Lindgren JA, Rouzer CA, Serhan CN. Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. *Science.* 1987;237(4819):1171–6.
78. Heise CE, O’Dowd BF, Figueroa DJ, Sawyer N, Nguyen T, Im D-S, et al. Characterization of the human cysteinyl leukotriene 2 receptor. *J Biol Chem.*

- 2000;275(39):30531–6.
79. Cortes-Burgos LA, Zweifel BS, Settle SL, Pufahl RA, Anderson GD, Hardy MM, et al. CJ-13610, an orally active inhibitor of 5-lipoxygenase is efficacious in preclinical models of pain. *Eur J Pharmacol.* 2009;617(1–3):59–67.
 80. Levy BD, Clish CB, Schmidt B, Gronert K, Serhan CN. Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. *Nat Immunol.* 2001;2(7):612–9.
 81. Vachier I, Chanez P, Bonnans C, Godard P, Bousquet J, Chavis C. Endogenous anti-inflammatory mediators from arachidonate in human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;290(1):219–24.
 82. Leuti A, Maccarrone M, Chiurchiù V. Proresolving lipid mediators: Endogenous modulators of oxidative stress. *Oxid Med Cell Longev.* 2019;2019.
 83. Serhan CN, Yacoubian S, Yang R. Anti-inflammatory and proresolving lipid mediators. *Annu Rev Pathol Mech Dis.* 2008;3:279–312.
 84. Xu Z-Z, Zhang L, Liu T, Park JY, Berta T, Yang R, et al. Resolvins RvE1 and RvD1 attenuate inflammatory pain via central and peripheral actions. *Nat Med.* 2010;16(5):592.
 85. Cox Jr R, Phillips O, Fukumoto J, Fukumoto I, Parthasarathy PT, Mandry M, et al. Resolvins decrease oxidative stress mediated macrophage and epithelial cell interaction through decreased cytokine secretion. *PLoS One.* 2015;10(8).
 86. Lee H-N, Surh Y-J. Resolvin D1-mediated NOX2 inactivation rescues macrophages undertaking efferocytosis from oxidative stress-induced apoptosis. *Biochem Pharmacol.* 2013;86(6):759–69.
 87. Spite M, Norling L V, Summers L, Yang R, Cooper D, Petasis NA, et al. Resolvin D2 is a potent regulator of leukocytes and controls microbial sepsis. *Nature.* 2009;461(7268):1287–91.
 88. Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain.* 1983;16(2):109–10.
 89. Hawkins P, Morton DB, Burman O, Dennison N, Honess P, Jennings M, et al. A guide to defining and implementing protocols for the welfare assessment of laboratory animals: eleventh report of the BVAAWF/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement. *Lab Anim.* 2011;45(1):1–13.
 90. Enderlein G. Daniel, Wayne W. *Biostatistics—A Foundations for Analysis in the Health Sciences.* New York—Chichester—Brisbane—Toronto—Singapore: Wiley & Sons; 1995. 744 p.
 91. Erthal V, Maria-Ferreira D, de Paula Werner MF, Baggio CH, Nohama P. Anti-inflammatory effect of laser acupuncture in ST36 (Zusanli) acupoint in mouse

- paw edema. *Lasers Med Sci.* 2016;31(2):315–22.
92. Belmonte LAO, Martins TC, Salm DC, Emer AA, de Oliveira BH, Mathias K, et al. Effects of Different Parameters of Continuous Training and High-Intensity Interval Training in the Chronic Phase of a Mouse Model of Complex Regional Pain Syndrome Type I. *J Pain.* 2018;19(12):1445–60.
 93. Mazzardo-Martins L, Salm DC, Winkelmann-Duarte EC, Ferreira JK, Lütke DD, Frech KP, et al. Electroacupuncture induces antihyperalgesic effect through endothelin-B receptor in the chronic phase of a mouse model of complex regional pain syndrome type I. *Pflügers Arch J Physiol.* 2018;470(12):1815–27.
 94. Ministério Da Ciência, Tecnologia e Inovação Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal– CONCEA. Diretriz brasileira para o cuidado ea utilização de animais em atividades de ensino ou de pesquisa científica-DBCA. Resolução Norm MCTI. 2013. [acesso em dezembro de 2019]. Disponível em: <https://pages.cnpem.br/ceua/wp-content/uploads/sites/56/2015/06/DBCA.pdf>

ANEXO A – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UNISUL



Pró Reitoria de Ensino, Pesquisa, Pós-Graduação, Extensão e Inovação
Comissão de Ética no Uso de Animais (Res. CONSUN 46/2009)

Palhoça, 4 de dezembro de 2018
Registro na CEUA (código): 18.050.4.01.IV

Ao Pesquisador/Professor(a): Daniel Fernandes Martins

Prezado(a),

Vimos por meio deste, certificar que a proposta de estudo e/ou projeto de pesquisa intitulada "Avaliação do potencial anti-inflamatório, pós-resolutivo e anti-hiperalgésico da suplementação de ômega-3 em um modelo animal da síndrome da dor regional complexa do tipo – I", registrada com o nº18.050.4.01.IV, sob a responsabilidade de Daniel Fernandes Martins - que envolve a manutenção ou utilização de modelos animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) desta Instituição, em reunião de 12 de dezembro de 2018.

A CEUA/UNISUL tem por finalidade cumprir e fazer cumprir, no âmbito da UNISUL e nos limites de suas atribuições, os dispostos na legislação Federal aplicável à criação, manutenção e a utilização de animais em atividades de ensino e de pesquisa, realizadas pelos corpos docente, discente e técnico-administrativo da UNISUL e pesquisadores de outras instituições, caracterizando-se a sua atuação como educativa, consultiva, de assessoria e fiscalização nas questões relativas à matéria, sob os aspectos: I - Ético; II - Legal: enquadramento na legislação vigente.

Gostaríamos de salientar que, embora aprovado, qualquer alteração dos procedimentos e metodologias que houver durante a realização do projeto em questão, deverá ser informada imediatamente à Comissão.

Atenciosamente,



Prof. Sândro Melim Sgrott
Coordenador da Comissão



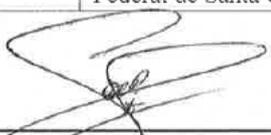
Pró Reitoria de Ensino, Pesquisa, Pós-Graduação, Extensão e Inovação
 Comissão de Ética no Uso de Animais (Res. CONSUN 46/2009)

Palhoça, 4 de dezembro de 2018

CERTIFICADO

Em consonância à Orientação Técnica nº 08, de 16 de março de 2016, do CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), certificamos que a proposta de estudo e/ou projeto de pesquisa intitulada "Avaliação do potencial anti-inflamatório, pós-resolutivo e anti-hiperalgésico da suplementação de ômega-3 em um modelo animal da síndrome da dor regional complexa do tipo – I", registrada com o nº 18.050.4.01.IV, sob a responsabilidade de Daniel Fernandes Martins - que envolve a manutenção ou utilização de modelos animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo CONCEA, e foi **aprovado** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), desta Instituição, em reunião de 12 de dezembro de 2018.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Janeiro de 2019 a Janeiro de 2021
Espécie/linhagem/raça	Camundongo heterogêneo Mus musculus
Nº de animais	110
Peso/Idade	35-45g / 45-60 dias
Sexo	fêmea
Origem	Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)


 Prof. Sandro Melim Sgroff
 Coordenador da Comissão