

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA**

Juliana Fabris Lima Garcia

**ATIVIDADE ANTI-HIPERALGÉSICA DAS RESOLVINAS NO
MODELO DE DOR INFLAMATÓRIA ARTICULAR EM RATOS**

Florianópolis

2011

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA**

Juliana Fabris Lima Garcia

**ATIVIDADE ANTI-HIPERALGÉSICA DAS RESOLVINAS NO
MODELO DE DOR INFLAMATÓRIA ARTICULAR EM RATOS**

Tese submetida ao Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de
Doutor em Farmacologia
Orientador: Prof. Dr. João Batista
Calixto

Florianópolis

2011

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

G216a Garcia, Juliana Fabris Lima
Atividade anti-hiperalgésica das resolvinas no modelo
de dor inflamatória articular em ratos [tese] / Juliana
Fabris Lima Garcia ; orientador, João Batista Calixto.
- Florianópolis, SC, 2011.
146 p.: il., grafs., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina,
Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação
em Farmacologia.

Inclui referências.

1. Farmacologia. 2. Artrite. 3. Hiperalgesia. 4. Agentes
antiinflamatórios. I. Calixto, João Batista. II. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação
em Farmacologia. III. Título.

CDU 615

AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente ao meu orientador, o Professor João Batista Calixto, pela confiança depositada em mim e pela orientação e ensinamentos adquiridos durante os anos de doutorado.

A minha família pelo apoio e incentivo incondicionais durante todos os anos de estudo e persistência.

A Maria Martha Campos por inicialmente ter concedido o precursor de resolvinas para a realização dos experimentos iniciais, além das considerações feitas para a versão final deste trabalho.

Ao Emerson M. Motta pela orientação inicial deste trabalho e pelo incentivo durante a execução de experimentos e discussão dos resultados.

Aos colegas Rafael Dutra e Kathryn Bortolini que também contribuíram para a execução e finalização deste trabalho.

Ao Allisson F. Bento pelas correções e sugestões consideráveis feitas para a finalização desta tese.

A Aline Venâncio, Juliana Gonçalves e Pedro pelo apoio técnico.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

A Mariza Boscacci Marques, pela amizade e pelos ensinamentos adquiridos durante a iniciação científica e por despertar em mim o gosto pela investigação científica e pela área do ensino.

As amigas, Stefânia Forner e Alessandra Martini, pela grande amizade e apoio durante os momentos bons e ruins.

Aos meus amigos especiais, Robson e Marianne, que também tiveram uma participação importante nesta conquista.

Aos demais colegas de laboratório, Ana Flávia, Edinéia, Eliziane, Fabiana, Gecioni, Israel, Juliana Chaves, Rodrigo, Maira, Rafaela e Raquel e aos ex-colegas de laboratório Maira Cola, Daniela Leite e Jarbas pelo carinho e amizade que sempre dedicaram a mim.

Ao Samuel Vandresen, pelo carinho, atenção e apoio dedicados a mim durante estes últimos dois anos e pelos momentos de discussão científica que foram fundamentais para a conclusão desta etapa.

As amigas, Fabiana Ourique e Caroline Gonzatto, que me acompanham desde a época anterior ao doutorado e que sempre me apoiaram em todos os momentos que precisei.

E por fim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

"É necessário abrir os olhos e perceber que as coisas boas estão dentro de nós, onde os sentimentos não precisam de motivos nem os desejos de razão. O importante é aproveitar o momento e aprender sua duração, pois a vida está nos olhos de quem sabe ver"

Gabriel García Marquez

RESUMO

A descoberta de que a resolução da inflamação é um processo ativo, no qual vários mediadores lipídicos são produzidos e que apresentam propriedades anti-inflamatórias e pró-resolução, abriu novas possibilidades para o tratamento de diversas doenças de origem inflamatória. No entanto, poucos estudos, até o momento, investigaram as propriedades anti-hiperalgésicas destes mediadores lipídicos em modelos animais de inflamação. Desta forma, o presente estudo investigou o possível efeito anti-hiperalgésico do precursor de resolvinas da série D, 17(R)HDoHE, e da resolvina AT-RvD1, sobre a dor inflamatória avaliada no modelo de artrite induzida por adjuvante (AIA) em ratos, bem como os seus efeitos sobre os sinais clínicos da artrite e os mecanismos pelos quais estes mediadores podem modular a dor de origem inflamatória. Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que o precursor 17(R)HDoHE, quando administrado sistemicamente em uma baixa dose (300 ng/i.p.), inibiu tanto a gênese (quando administrado 30 min antes) quanto a manutenção (quando administrado 3 dias após a indução da artrite) da hiperalgesia mecânica aguda. Este efeito parece estar associado à modulação do fator de transcrição NF- κ B (proteína) e da enzima COX-2 (proteína e RNAm), visto que a expressão de ambos os mediadores foi inibida tanto no gânglio da raiz dorsal como na medula espinhal de ratos com artrite. O tratamento terapêutico com o precursor 17(R)HDoHE (600 e 900 ng/i.p.) também inibiu a dor inflamatória em um período sub-crônico, isto é, 14 dias após a indução da artrite, mas não quando tratado no período crônico, 30 dias após a indução. Além disso, o tratamento repetido com 17(R)HDoHE, na fase sub-crônica da artrite, preveniu significativamente o aumento da rigidez articular, mas não do edema de pata e do edema articular. Considerando o tratamento sistêmico com a resolvina AT-RvD1 (100 ou 300 ng/i.p.), esta também apresentou efeito anti-hiperalgésico pronunciado quando administrada durante o processo inflamatório articular agudo, isto é, 3 dias após a indução da artrite. A redução nos níveis das citocinas TNF- α e IL-1 β no tecido da pata de ratos com artrite pode ter contribuído para a atividade anti-hiperalgésica observada após o tratamento repetido, tanto com o precursor 17(R)HDoHE quanto com a resolvina AT-RvD1. Em conjunto, estes resultados mostram relevantes propriedades anti-hiperalgésicas do precursor 17(R)HDoHE e da resolvina AT-RvD1, sendo que estes mediadores lipídicos são potenciais agentes terapêuticos para o

tratamento de estados dolorosos associados a doenças inflamatórias agudas e/ou crônicas como a artrite.

Palavras-chave: precursor de resolvinas da série D ,17(R)HDoHE; resolvina formada na presença da aspirina 1, AT-RvD1; artrite induzida por adjuvante; hiperalgesia mecânica; hiperalgesia térmica; parâmetros clínicos da artrite.

ABSTRACT

The discovery that resolution of inflammation is an active process, in which several lipid mediators are produced and possess anti-inflammatory and pro-resolution properties, brought new possibilities for the management of several inflammatory diseases. Nevertheless, few studies have so far investigated the anti-hyperalgesic properties of those lipid mediators in animal models of pain. In this manner, the present study has evaluated the possible anti-hyperalgesic effects of the resolvins D series precursor, 17(R)HDoHE, and the effects of the resolvin AT-RvD1, on the inflammatory pain evaluated in the model of adjuvant-induced arthritis (AIA) in rats, as well as their effects on the clinical signs of arthritis and the mechanisms by which these mediators might regulate inflammatory pain. The results of the present study have demonstrated that the precursor 17(R)HDoHE when systemically treated in a low dose (300 ng/i.p.) inhibited both the genesis (when administered 30 min before) and the maintenance (when administered 3 days after arthritis induction) of acute mechanical pain. Such effect seems to be related to the modulation of the transcription factor NF- κ B (protein) and COX-2 enzyme (protein and mRNA), since the expression of both mediators were inhibited in dorsal root ganglia and spinal cord of arthritic rats. The therapeutic treatment with the precursor 17(R)HDoHE (600 and 900 ng/i.p.) have also inhibited the inflammatory pain in a sub-chronic period, i.e. 14 days after arthritis induction but not when treated in the chronic phase, i.e. 30 days after arthritis induction. Furthermore, the repeated treatment with 17(R)HDoHE in the sub-chronic phase of arthritis significantly prevented the increase in joint stiffness but not the increase in paw and joint edema. Considering the systemic treatment with the resolvin AT-RvD1 (100 or 300 ng/i.p.), it also presented a pronounced anti-hyperalgesic effect when treated during joint acute inflammatory process, i.e. 3 days after arthritis induction. The decrease of the cytokines TNF- α and IL-1 β levels in the plantar tissue of arthritic rats may have contributed to the anti-hyperalgesic activity observed after the repeated treatment with both the precursor 17(R)HDoHE and the resolvin AT-RvD1. Taken together, these results demonstrate relevant anti-hyperalgesic properties of the precursor 17(R)HDoHE and the resolvin AT-RvD1, highlighting that these lipid mediators are potential therapeutic agents for the treatment of painful states associated with acute and/or chronic inflammatory diseases such as arthritis.

Key-words: resolvin D series precursor, 17(R)HDoHE; aspirin-triggered resolvin D1, AT-RvD1; adjuvant-induced arthritis; mechanical hyperalgesia; thermal hyperalgesia; arthritis clinical parameters.

LISTA DE FIGURAS

Pág.

Figura 1 - Alterações na arquitetura articular ocorridas durante a artrite.....	3
Figura 2 - Via de biossíntese das resolvinas (17R) da série D formadas na presença da aspirina.....	16
Figura 3 - Protocolo de tratamento preventivo com o precursor 17(R)HDoHE	27
Figura 4 - Protocolo de tratamento terapêutico com o precursor 17(R)HDoHE.....	27
Figura 5 - Protocolo de tratamento terapêutico com a resolvina AT-RvD1.....	28
Figura 6 - Protocolo de tratamento repetido terapêutico com 17(R)HDoHE ou AT-RvD1	29
Figura 7 - Protocolo de tratamento terapêutico com 17(R)HDoHE no processo inflamatório articular sub-crônico e crônico.....	30
Figura 8 - Protocolo de tratamento terapêutico com o precursor 17(R)HDoHE e com drogas clássicas.....	31
Figura 9 - O pré-tratamento com o precursor 17(R)HDoHE preveniu a indução da hiperalgesia mecânica na pata traseira ipsilateral de ratos submetidos à artrite induzida por adjuvante (AIA).....	34
Figura 10 - O pré-tratamento com o precursor 17(R)HDoHE preveniu parcialmente a indução da hiperalgesia térmica na pata traseira ipsilateral de ratos submetidos à AIA.....	35
Figura 11 - O pós-tratamento com o precursor 17(R)HDoHE inibiu o desenvolvimento da hiperalgesia mecânica na pata traseira ipsilateral de ratos submetidos à AIA.....	37
Figura 12 - O pós-tratamento local com o precursor 17(R)HDoHE inibiu parcialmente o desenvolvimento da hiperalgesia mecânica na pata traseira ipsilateral de ratos submetidos à AIA.....	39
Figura 13 - O pós-tratamento com o precursor 17(R)HDoHE não inibiu o desenvolvimento da hiperalgesia térmica na pata traseira ipsilateral de ratos submetidos à AIA.....	40
Figura 14 - O pós-tratamento com a resolvina formada na presença da aspirina, AT-RvD1, reduziu o desenvolvimento da hiperalgesia mecânica na pata traseira ipsilateral de ratos com AIA.....	42
Figura 15 - O tratamento repetido com o precursor 17(R)HDoHE reduziu parcialmente a hiperalgesia mecânica na pata ipsilateral de ratos com AIA.....	44

Figura 16 - O tratamento repetido com a resolvina AT-RvD1 reduziu parcialmente a hiperalgesia mecânica na pata ipsilateral de ratos com AIA.....	45
Figura 17 - O pós-tratamento com o precursor 17(R)HDoHE na fase sub-crônica inibiu o desenvolvimento da hiperalgesia mecânica na pata traseira ipsilateral de ratos submetidos à AIA.....	47
Figura 18 - O pós-tratamento com o precursor 17(R)HDoHE na fase sub-crônica não inibiu o desenvolvimento da hiperalgesia térmica na pata traseira ipsilateral de ratos submetidos à AIA.....	48
Figura 19 - O pós-tratamento com o precursor 17(R)HDoHE na fase crônica não inibiu o desenvolvimento da hiperalgesia mecânica em ratos submetidos à AIA.....	50
Figura 20 - O pós-tratamento com o precursor 17(R)HDoHE na fase crônica não inibiu o desenvolvimento da hiperalgesia térmica em ratos submetidos à AIA.....	51
Figura 21 - O tratamento com o precursor 17(R)HDoHE não alterou o edema de pata, edema articular e a rigidez articular na pata ipsilateral de ratos submetidos à AIA.....	56
Figura 22 - O tratamento repetido com o precursor 17(R)HDoHE na fase sub-crônica preveniu o aumento do escore de rigidez articular, mas não do edema de pata e do edema articular na pata ipsilateral de ratos com AIA.....	57
Figura 23 - O tratamento repetido com o precursor 17(R)HDoHE na fase aguda reduziu os níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β no tecido plantar da pata traseira ipsilateral de ratos com AIA.....	59
Figura 24 - O tratamento repetido com o precursor 17(R)HDoHE na fase aguda não alterou os níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β na medula espinhal de ratos com AIA.....	59
Figura 25 - O tratamento repetido com a resolvina AT-RvD1 na fase aguda reduziu os níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β no tecido plantar da pata traseira ipsilateral de ratos com AIA.....	60
Figura 26 - O tratamento repetido com a resolvina AT-RvD1 na fase aguda não alterou os níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β na medula espinhal de ratos com AIA.....	60
Figura 27 - Tratamento único com o precursor 17(R)HDoHE na fase aguda preveniu o aumento da ativação da subunidade p65 do fator de transcrição NF- κ B na medula espinhal e no gânglio da raiz dorsal (GRD) de ratos com AIA.....	62

Figura 28 - Tratamento único com o precursor 17(R)HDoHE na fase aguda preveniu o aumento da expressão da enzima COX-2 na medula espinhal e no GRD de ratos com AIA.....	63
Figura 29 - Tratamento único com o precursor 17(R)HDoHE na fase aguda não alterou os níveis de RNAm do fator de transcrição NF-κB na medula espinhal e no GRD de ratos com AIA.....	65
Figura 30 - Tratamento único com o precursor 17(R)HDoHE na fase aguda modulou os níveis de RNAm da enzima COX-2 na medula espinhal, mas não no GRD, de ratos com AIA.....	65
Figura 31. Possíveis mecanismos de ação do precursor 17(R)HDoHE e da resolvina AT-RvD1 no início do processo inflamatório articular no modelo da artrite induzida por adjuvante (AIA).....	79
Figura 32. Possíveis mecanismos de ação do precursor 17(R)HDoHE no processo inflamatório articular estabelecido no modelo da artrite induzida por adjuvante (AIA).....	80

LISTA DE TABELAS

Pág.

Tabela 1 - Comparação do efeito anti-hiperalgésico do precursor de resolvinas da série D, 17(R)HDoHE, com diferentes classes de drogas utilizadas na clínica no modelo de artrite induzida por adjuvante em ratos.....	53
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA - ácido araquidônico
AIA - artrite induzida por adjuvante
AINEs - anti-inflamatórios não-esteroidais
ALX/FRP2 - receptor de lipoxina/receptor de peptídeo formil
ANOVA - análise de variância
Anti-CCP - peptídeo citrulinado anticíclico
AR - artrite reumatóide
AT-Rvs - resolvinas formadas na presença da aspirina
B - valor basal
BLT1 - receptor de leucotrieno B₄ do tipo 1
CFA - adjuvante completo de Freund
CGRP - peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
COX - ciclooxigenase
DARMDs - drogas antirreumáticas modificadoras da doença
DHA - ácido docosahexanóico
EPA - ácido eicosapentaenóico
EMSA - ensaio de alteração da mobilidade eletroforética
E.P.M. - erro padrão da média
EROs - espécies reativas de oxigênio
FR - fator reumatóide
GPR32 - receptor de resolvina D1
GRD - gânglio da raiz dorsal
h - hora
HLA-DR4 - antígeno leucocitário humano do tipo DR4
IASP - associação Internacional para o Estudo da Dor
IL-1β - interleucina-1 beta
IL-6 - interleucina-6
i.p. - intraperitoneal
i.pl. - intraplantar
i.t. - intratecal
LOXs - lipoxigenases
LTs - leucotrienos
LTB₄ - leucotrieno B₄
mg - miligrama
min - minuto
MHC - complexo principal de histocompatibilidade
MMP - metaloproteinase
NF-κB - fator de transcrição nuclear kapa B

ng - nanograna
PAF - fator de agregação plaquetária
PBS - salina tamponada com fosfato
PDs - protectinas
PGs - prostaglandinas
PGE₂ - prostaglandina E₂
PLA₂ - fosfolipase A₂
PMNs - polimorfonucleares
PUFA - ácido graxo poliinsaturado
Rvs - resolvinas
SNC - sistema nervoso central
SNP - sistema nervoso periférico
TXs - tromboxanos
TNF- α - fator de necrose tumoral alfa
17(R)HD₆HE - precursor de resolvinas da série D

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Artrite reumatóide	1
1.2. Dor inflamatória	5
1.3. Terapias atuais para o tratamento da artrite	7
1.4. Inflamação e resolução do processo inflamatório	9
2. OBJETIVOS	18
2.1. Objetivo geral	18
2.2. Objetivos específicos	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1. Animais	19
3.2. Indução da dor inflamatória e artrite induzida pelo Adjuvante Completo de Freund (CFA)	19
3.3. Avaliação do comportamento nociceptivo	20
3.3.1. <i>Resposta de retirada da pata traseira induzida por filamentos de von Frey</i>	20
3.3.2. <i>Avaliação do limiar nociceptivo térmico</i>	20
3.4. Avaliação dos parâmetros da doença: edema de pata, edema articular e rigidez articular	21
3.4.1. <i>Edema de pata e edema articular</i>	21
3.4.2. <i>Rigidez articular</i>	21
3.5. Quantificação dos níveis de citocinas	21
3.6. Ensaio de imunistoquímica	22
3.6.1. <i>Preparo das amostras</i>	22
3.6.2. <i>Reação de imunistoquímica</i>	23
3.7. PCR em tempo real	24
3.7.1. <i>Extração do RNA</i>	24
3.7.2. <i>Preparo do DNA complementar (Reação da Transcriptase Reversa)</i>	25
3.7.3. <i>Reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR)</i>	26
3.8. Protocolo geral de tratamento com os mediadores pró-resolução	26
3.9. Drogas e Reagentes	31
3.10. Análise estatística	32
4. RESULTADOS	33

4.1. Influência do tratamento preventivo com o precursor de resolvinas da série D, 17(R)HDoHE, sobre a hiperalgesia inflamatória no modelo de artrite induzida por adjuvante (AIA) em ratos.....	33
4.2. Avaliação do efeito do tratamento terapêutico com o precursor de resolvinas da série D, 17(R)HDoHE, na manutenção da hiperalgesia mecânica e térmica no modelo de artrite induzida por adjuvante (AIA) em ratos.....	36
4.3. Determinação do efeito do tratamento terapêutico com a resolvina formada na presença da aspirina, AT-RvD1, no desenvolvimento da hiperalgesia mecânica avaliada no modelo de artrite induzida por adjuvante (AIA) em ratos.....	41
4.4. Avaliação do efeito do tratamento terapêutico repetido com o precursor 17(R)HDoHE e com a resolvina AT-RvD1 na hiperalgesia mecânica no modelo de artrite induzida por adjuvante (AIA) em ratos.....	43
4.5. Efeito do pós-tratamento com o precursor de resolvinas da série D, 17(R)HDoHE, na manutenção da hiperalgesia mecânica e térmica em um período sub-crônico do modelo de artrite induzida por adjuvante (AIA) em ratos.....	46
4.6. Verificação do efeito do pós-tratamento com o precursor de resolvinas da série D, 17(R)HDoHE, na manutenção da hiperalgesia mecânica e térmica em um período crônico no modelo de artrite induzida por adjuvante (AIA) em ratos	49
4.7. Comparação do potencial anti-hiperalgésico do precursor 17(R)HDoHE com drogas clássicas utilizadas na clínica sobre a hiperalgesia mecânica no modelo de artrite induzida por adjuvante (AIA) em ratos	52
4.8. Efeito do pós-tratamento com o precursor de resolvinas da série D, 17(R)HDoHE, no desenvolvimento dos sinais clínicos da artrite induzida por adjuvante (AIA) em ratos	54
4.9. Efeito do tratamento terapêutico repetido com o precursor 17(R)HDoHE ou com a resolvina AT-RvD1 sobre os níveis de citocinas pró-inflamatórias na medula espinhal e no tecido da pata de ratos com artrite induzida por adjuvante (AIA)	58
4.10. Efeito do pós-tratamento com o precursor 17(R)HDoHE sobre a expressão do fator de transcrição NF- κ B e da enzima COX-2 na medula espinhal e no gânglio da raiz dorsal de ratos com artrite induzida por adjuvante (AIA)	61
4.11. Avaliação do efeito do pós-tratamento com o precursor 17(R)HDoHE sobre os níveis de RNAm do fator de transcrição NF- κ B e	

da enzima COX-2 na medula espinhal e no gânglio da raiz dorsal de ratos com artrite induzida por adjuvante (AIA).....	64
5. DISCUSSÃO	66
6. CONCLUSÃO	81
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
8. ANEXO.....	101

1. INTRODUÇÃO

1.1. Artrite reumatóide

A artrite reumatóide (AR) é uma doença inflamatória de origem autoimune, progressiva e sistêmica que acomete as articulações, principalmente a membrana sinovial, resultando em destruição articular da cartilagem e erosão do osso subjacente, causando artrite incapacitante (LEE e WEINBLATT, 2001). A AR é o tipo mais comum de artrite articular e estima-se que entre 0,5 a 1,0 % da população mundial seja afetada pela AR, não tendo, contudo, prevalência sobre um grupo étnico específico (ALARCÓN, 1995). Além disso, existe uma maior incidência no sexo feminino, cerca de três vezes maior que no sexo masculino (SILMAN e PEARSON, 2002). O pico de incidência da doença está na faixa dos 40 aos 60 anos, mas pode afetar pacientes de qualquer faixa etária (KUMAR et al., 2008).

No Brasil, um estudo multicêntrico realizado em diferentes regiões (Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sul) mostrou uma prevalência de AR em até 1% da população adulta (MARQUES-NETO et al., 1993). Apesar deste estudo não apresentar dados recentes, se considerarmos a mesma incidência de AR observada em 1993 e extrapolarmos para o ano de 2010, sugere-se que existam no Brasil cerca de 1.900.000 brasileiros acometidos por esta doença.

Outro aspecto extremamente importante da AR é que esta doença limita as mais diversas atividades do indivíduo, desde as relacionadas ao lazer até as relacionadas ao trabalho, resultando em grande incapacidade do paciente (QUAN et al., 2008). Considerando a etiologia, sabe-se que diversos fatores aumentam as chances de desenvolvimento de AR, incluindo fatores genéticos (presença de genes do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) do tipo II, p.ex.: HLA-DR4), ambientais (p.ex.: fumo e infecções diversas) e a produção de autoanticorpos, como o fator reumatóide (FR) e o peptídeo citrulinado anticíclico (anti-CCP) (GREGERSEN et al., 1987; FIRESTEIN, 2003; WEGNER et al., 2010). O FR circulante foi considerado um marcador clássico para AR, o qual era utilizado para o diagnóstico precoce da doença (DA MOTA et al., 2011). Porém, além do FR não ser detectado em aproximadamente 50% dos pacientes com AR inicial, foi descoberto que este fator também é produzido em outras doenças autoimunes, deixando de ser um marcador específico para o diagnóstico da AR (WEISSMANN, 2004). Além disso, o anticorpo anti-CCP parece ser mais específico e sensível para o diagnóstico da doença

(podendo ser detectado vários anos antes da doença se manifestar) e parece ser preditivo de um pobre prognóstico, como a destruição articular progressiva (VAN DER LINDEN et al., 2009).

Os principais sintomas observados em pacientes portadores de AR são dor, rigidez e crepitação articular e edema das articulações na maioria das vezes de modo simétrico, ou seja, de ambos os lados do corpo (LEE e WEINBLATT, 2001). Estes sintomas são decorrentes basicamente das alterações fisiológicas e estruturais que ocorrem nas articulações e tecidos periarticulares (Figura 1). A rigidez articular geralmente se apresenta pronunciada pelo período da manhã, sendo que qualquer articulação pode ser acometida, mas geralmente ocorre nas articulações interfalangeanas, punho, tornozelo, joelho e coluna cervical. Como a AR é uma doença sistêmica, o acometimento de outros órgãos também pode ocorrer, como olhos, coração e pulmão (KELLEY e HARRIS, 2005).

A membrana sinovial inflamada é a característica central na patofisiologia da AR. Um dos mecanismos para a indução da resposta inflamatória articular é a formação de imunocomplexos que se agregam no tecido sinovial. Um exemplo da formação destes imunocomplexos é quando os resíduos protéicos citrulinados (determinantes antigênicos em pacientes com AR) são reconhecidos pelos anticorpos anti-CCP. Estes resíduos citrulinados resultam da conversão de um resíduo do aminoácido arginina em um resíduo de citrulina, reação esta catalisada pela enzima peptidil arginina desaminase, a qual está presente em uma variedade de células, principalmente em macrófagos e neutrófilos (WEGNER et al., 2010). A formação de imunocomplexos leva a uma série de alterações, incluindo a ativação do sistema complemento (BROWN et al., 1982) e de fagócitos (WEISSMANN, 2004). Ademais, outras células como neutrófilos, que compreendem cerca de 90 % da população de células do fluido sinovial, reconhecem os imunocomplexos através dos receptores Fc resultando na liberação de enzimas hidrolíticas, produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e produtos do metabolismo do ácido araquidônico (AA). Todos estes eventos promovem destruição tecidual diretamente ou indiretamente através da estimulação de uma resposta inflamatória (WEISSMANN, 2004).

Como mencionado acima, os imunocomplexos também estimulam macrófagos, os quais liberam citocinas e outros agentes pró-inflamatórios, como as prostaglandinas (p.ex.: prostaglandina E₂ (PGE₂)) e proteinases (p.ex.: metaloproteinases 9 (MMP-9)), estas últimas levando à destruição da cartilagem presente nas articulações

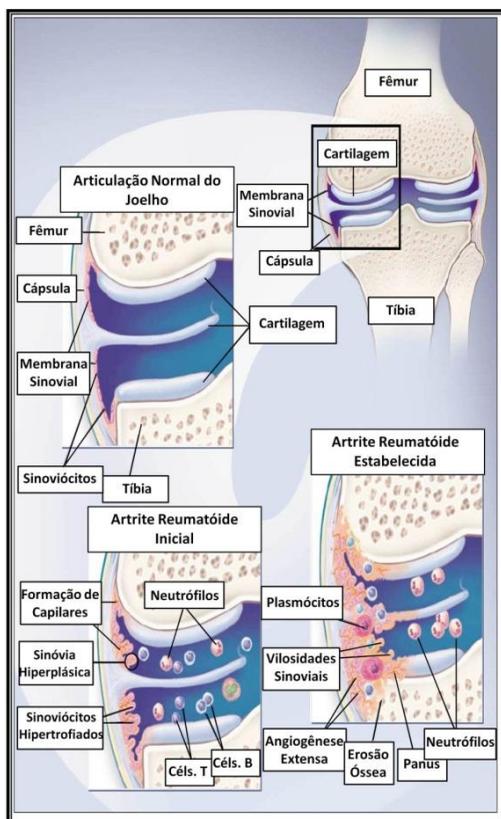


Figura 1. Alterações da arquitetura articular na artrite. Na articulação do joelho normal, a sinóvia é formada pela membrana sinovial (geralmente com uma ou duas camadas de células) e pelo tecido conectivo subjacente. As células da membrana sinovial são do tipo A, chamados sinoviócitos do tipo macrófago, e do tipo B, chamados sinoviócitos do tipo fibroblasto. Na AR inicial, a membrana sinovial se torna espessa devido à hiperplasia e hipertrofia das células que compõem a sinóvia. Uma grande quantidade de vasos sanguíneos se forma na sinóvia (angiogênese). Células T (predominantemente $CD4^+$) e células B (algumas das quais se tornam plasmócitos) infiltram na membrana sinovial. Estas células também estão presentes no fluido sinovial juntamente com outros tipos celulares, como os neutrófilos. Nos estágios iniciais da AR, a membrana sinovial começa a invadir a cartilagem. Na AR estabelecida, a membrana sinovial se transforma em um tecido invasivo chamado panus. Este tecido, composto tanto de sinoviócitos do tipo A quanto do tipo B e plasmócitos, invade e destrói os tecidos adjacentes, como a cartilagem e o osso subcondral. Adaptado de CHOY e PANAYI, 2001. *New Engl. J. Med.*, v. 344, p. 907-916, 2001.

(WEISSMANN, 2004; SCHAIBLE et al., 2006).

Dentre as alterações que ocorrem na membrana sinovial durante o processo inflamatório articular pode-se destacar um intenso processo de angiogênese, hiperplasia de células da membrana sinovial - sinoviócitos do tipo A (ou tipo-macrófago) e do tipo B (ou tipo-fibroblasto), influxo de células inflamatórias, como leucócitos, células dendríticas, mastócitos, entre outros eventos (ver Figura 1). Todavia, estas alterações na membrana sinovial observadas em pacientes portadores de AR variam de acordo com o progresso da doença. Nos estágios iniciais, os principais eventos são a formação de edema tecidual e a deposição de fibrina, sendo que estes sinais se manifestam como edema e dor articular. Em seguida, a membrana sinovial se torna hiperplásica passando a ser formada por dez ou mais camadas de sinoviócitos do tipo A e B. O tecido subjacente à membrana sinovial também passa por alterações, no qual se observa infiltração predominante de células mononucleares, incluindo linfócitos T e B, macrófagos e plasmócitos. A membrana sinovial quando se torna hiperplásica passa a ser chamada de panus, sendo que este tecido está envolvido diretamente no processo de destruição da cartilagem e na erosão óssea frequentemente observado nos estágios mais avançados da AR (para revisão ver CHOY e PANAYI, 2001; LEE e WEINBLATT, 2001; WEISSMANN, 2004; MCINNES e SCHETT, 2007).

Dentre os modelos experimentais para indução de artrite em ratos, o modelo de artrite induzida por adjuvante (AIA) é um dos modelos mais utilizados para se avaliar o efeito potencial de algumas substâncias no tratamento da dor e do processo inflamatório articular característico da artrite. O modelo de AIA caracteriza-se inicialmente por infiltração de linfócitos e neutrófilos, formação de edema, deposição de fibrina, acompanhado de proliferação de sinoviócitos e fibroblastos bem como ativação de osteoblastos e osteoclastos. Além disso, em um estágio mais avançado observa-se sinovite e a formação de panus com destruição da cartilagem e do osso e, por fim, anquilose (rigidez da articular) (VAN EDEN e BYRON, 2003; HEGEN et al., 2007). Desta forma, o modelo de AIA foi escolhido para o desenvolvimento deste trabalho, pois permite a avaliação tanto do processo inflamatório agudo quanto do processo inflamatório crônico das articulações além de resultar em uma elevada incidência de indução da artrite nos animais avaliados.

1.2. Dor inflamatória

O processo inflamatório e a dor exercem um importante papel fisiológico, o primeiro representando a necessidade de um reparo tecidual ou trauma, e o segundo atuando como um sistema de alerta, o qual salienta a existência de um perigo iminente no ambiente que nos cerca (WOOLF e SALTER, 2000). Entretanto, em situações patológicas, como no caso da AR, neuropatias, câncer, entre outras, a dor deixa de ter um caráter protetor e passa a ser uma característica decorrente da patologia (COSTIGAN e WOOLF, 2000; JULIUS e BASBAUM, 2001; KUNER, 2010).

A Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) apresenta uma definição de dor, como sendo “uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a um dano presente ou potencial, ou descrita em termos de tal dano”. Ainda, a dor é uma experiência subjetiva, onde cada indivíduo sente de formas diferentes, sendo intensamente influenciada pelo estado emocional. Assim, a dor pode ser interpretada como a somação de um componente sensorial e de um componente emocional (GIESECKE et al., 2005; LOESER e TREEDE, 2008).

A detecção de estímulos nocivos (p. ex.: calor excessivo, substâncias químicas e estímulos mecânicos), oriundos da periferia ocorre pela ativação de terminações nervosas livres de fibras aferentes sensoriais pouco mielinizadas e não-mielinizadas (fibras A δ e C, respectivamente) chamadas nociceptores. Estas fibras são compostas por neurônios cujos corpos celulares encontram-se nos gânglios da raiz dorsal (GRD) e trigeminal, que conduzem as informações nociceptivas até o corno dorsal da medula espinhal e o núcleo trigeminal pars caudalis na ponte, respectivamente (BESSON, 1999). Os nociceptores, ao levarem informações da periferia para o sistema nervoso central, fazem conexões com neurônios de segunda ordem localizados nas lâminas superficiais do corno dorsal da medula espinhal (lâminas I, II e V), resultando na liberação de vários neurotransmissores (para revisão ver BASBAUM et al., 2009). Os neurônios de segunda ordem, por sua vez, integram as vias supra-espinhais, distribuindo, desta maneira, informações para circuitos cerebrais responsáveis pelos diferentes componentes da dor (sensorial e emocional) (para revisão ver HUNT e MANTYH, 2001; PRICE, 2002). A via chamada espino-talâmica chega à região do tálamo ventroposterior e ventrobasal, apresentando diversas projeções para o córtex, enquanto que a via chamada espino-parabraquial chega à região do núcleo parabraquial, apresentando

projeções para o hipotálamo, amígdala e substância cinzenta periaquedutal (HUNT e MANTYH, 2001). Desta forma, o estímulo nocivo passa por diversas vias até finalmente chegar ao sistema nervoso central (SNC) e, como resposta, este estímulo é interpretado como uma sensação dolorosa que alerta sobre um potencial dano tecidual, resultando na retirada da região estimulada para longe da fonte do estímulo nocivo (WATKINS e MAIER, 2002).

Existe uma variedade de situações onde a dor deixa de ter o papel protetor fisiológico, refletindo, porém, que um dano tecidual ocorreu. Esse tipo de dor, que deixa de ser aguda e passa a ser uma dor persistente ou crônica, é observada em algumas doenças, como, por exemplo, na AR, resultando de alterações permanentes ocorridas nas fibras aferentes primárias, como o mecanismo de sensibilização periférica (BASBAUM et al., 2009). Além da duração, a dor crônica difere da dor aguda no que diz respeito à neuroplasticidade que ocorre em diferentes regiões do sistema nervoso, tornando este tipo de dor mais difícil de ser tratada (BESSON, 1999; KUNER, 2010).

A sensibilização periférica é comumente resultante de alterações associadas ao processo inflamatório, como alteração no padrão de mediadores químicos que podem atuar na fibra nervosa (WOOLF e SALTER, 2000). Conseqüentemente, a lesão tecidual geralmente ocorre associada ao acúmulo de mediadores endógenos liberados de nociceptores ativados ou de células não-neuronais que residem ou, principalmente, que infiltram na área lesionada, como macrófagos e neutrófilos, entre outros. Tanto células residentes no sítio da lesão, como os sinoviócitos, quanto leucócitos recrutados, como neutrófilos, macrófagos e linfócitos, podem ser ativados e liberar vários mediadores responsáveis pela sensibilização dos nociceptores que chegam à articulação (SCHAIBLE et al., 2006, 2009, 2010). Coletivamente, estes fatores, referidos como “sopa inflamatória”, representam uma grande variedade de moléculas sinalizadoras, que incluem os neurotransmissores, peptídeos (substância P, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), bradicinina), eicosanóides (prostaglandinas (PGs), leucotrienos (LTs), tromboxanos (TXs), endocanabinóides), neurotrofinas, citocinas, e quimiocinas, proteases e prótons, dentre outros (CALIXTO et al., 2004; BASBAUM et al., 2009). Além destes mediadores descritos acima exercerem papel fundamental no processo inflamatório, o fator de transcrição NF- κ B apresenta um importante papel não somente na resposta imune e na inflamação, mas também no processamento e desenvolvimento da dor patológica (NIEDERBERGER e GEISSLINGER, 2008). Isto se deve ao fato de

que após a sua ativação no citoplasma, o fator NF- κ B migra para o núcleo onde se liga à região promotora de diversos genes, incluindo citocinas (p.ex.: TNF- α , IL-1 β), ciclooxigenase-2 (COX-2), enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS), e proteases (p.ex.: MMPs), promovendo, assim, a transcrição destes genes.

Visto que os nociceptores podem expressar um ou mais receptores para estes mediadores pró-inflamatórios e pró-nociceptivos, eles são capazes de reconhecer e responder a cada um deles. É justamente a ativação destes receptores presentes na superfície dos nociceptores que aumenta a excitabilidade da fibra nervosa, conseqüentemente, aumentando a sua sensibilidade, como, por exemplo, à temperatura ou ao toque (BASBAUM et al., 2009). Este aumento na sensibilidade resulta em uma hipersensibilidade da percepção dolorosa frente a estímulos que normalmente não causariam dor em situações não patológicas, como leve toque, a qual é referida como alodinia (WOOLF e SALTER, 2000). Além disso, esta hipersensibilidade também resulta em uma percepção exacerbada frente a estímulos normalmente dolorosos, os quais passam a induzir dor com uma intensidade maior ainda, fenômeno esse referido como hiperalgesia (WOOLF e SALTER, 2000).

A dor crônica observada na AR está associada ao processo inflamatório articular propriamente dito, como descrito anteriormente, durante o qual ocorrem alterações tanto no sistema nervoso periférico (SNP) quanto no sistema nervoso central (SNC). Um dos mecanismos pelos quais a dor se manifesta durante a artrite é através da estimulação de nociceptores chamados “nociceptores silenciosos”, os quais se apresentam “inativos” em articulações normais. Entretanto, após o estabelecimento de um quadro inflamatório, estes nociceptores se tornam ativos e passam a enviar informações ao SNC (SCHAIBLE e GRUBB, 1993; SCHAIBLE et al., 2006, 2009). Desta forma, estas alterações que ocorrem no processamento e nas vias responsáveis pela condução das informações nociceptivas, além dos inúmeros mediadores envolvidos, é que torna a dor crônica observada em pacientes com artrite de difícil tratamento.

1.3. Terapias atuais para o tratamento da artrite

O tratamento da AR passou por várias mudanças nas duas últimas décadas (O'DELL, 2004; QUAN et al., 2008; VAN VOLLENHOVEN, 2009; BUCH e EMERY, 2011). Na década de 1980, o tratamento da AR era feito baseando-se em uma “pirâmide”, a qual era

gradual e lentamente construída, sendo a base da pirâmide, ou seja, o início do tratamento, feito com fisioterapia, seguido do uso de anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs – inibidores das enzimas ciclooxigenases - COX), e somente após se iniciava o tratamento com uma única droga antirreumática modificadora da doença (DARMDs), como metotrexato, sulfasalazina ou hidroxicloroquina (para revisão ver VAN VOLLENHOVEN, 2009). Com o passar dos anos, essa “pirâmide” foi “invertida”, onde o tratamento inicial da AR passou a ser feito com o uso das DARMDs, ou até mesmo a combinação de várias DARMDs, objetivando-se a busca de melhores resultados (VAN VOLLENHOVEN, 2009).

Atualmente, diversos tratamentos são utilizados para inibir o progresso da doença. As DARMDs ainda são utilizadas, mas os glicocorticóides passaram a ser amplamente prescritos (VAN EVERDINGEN et al., 2002; BUTTGEREIT et al., 2004). Adicionalmente, destacam-se as terapias biológicas, como o anticorpo monoclonal anti-TNF- α (infiximabe, etanercept) (BUCH e EMERY, 2011). No entanto, alguns pacientes não respondem à terapia anti-TNF- α , sendo necessária a busca por outros agentes biológicos (COHEN et al., 2006). Desta forma, outros agentes foram e vem sendo desenvolvidos para o tratamento da AR (para revisão ver BUCH e EMERY, 2011), como o rituximabe (anticorpo monoclonal quimérico contra células B CD20⁺) (COHEN et al., 2006), abatacept (forma recombinante do antígeno associado ao linfócito T citotóxico – CTLA₄, inibidor natural da ativação de linfócitos T) (KREMER, et al., 2008), o tocilizumabe (anticorpo monoclonal contra o receptor de interleucina-6 (IL-6)) (EMERY et al., 2008) e o certolizumabe pegol (fragmento Fab peguilado do anticorpo anti-TNF- α humanizado, com alta afinidade pelo TNF- α) (SMOLEN et al., 2009). Estes agentes biológicos por inibirem o progresso da doença, consequentemente podem diminuir a dor, sendo estas estratégias voltadas mais para um controle do processo inflamatório propriamente dito. Apesar de estas terapias biológicas serem mais eficazes no tratamento da AR, alguns pacientes são refratários ao tratamento e, somado a isso, existe um elevado custo para o seu uso prolongado (COHEN et al, 2006; MONTEIRO e ZANINI, 2008).

Para o tratamento da dor em si, a estratégia utilizada não difere daquelas empregadas para o tratamento de qualquer tipo de dor crônica. Desta maneira, inicia-se o tratamento com analgésicos simples (paracetamol ou dipirona), podendo-se fazer uma associação com AINEs, como a aspirina, e em alguns casos, fazer uso de opióides

(morfina) (SCHAIBLE et al., 2006). Além do uso dos AINEs no tratamento da dor articular, são utilizados inibidores seletivos da COX-2 (CHEN et al., 2008). Entretanto, estas drogas apresentam eficácia limitada em alguns pacientes e induzem alguns efeitos colaterais, como sangramento gastrointestinal, efeitos cardiovasculares, dentre outros (QUAN et al., 2008; GONZÁLEZ et al., 2010).

Assim, novas terapias com maior eficácia ou ainda que apresentem menos efeitos colaterais são necessárias para o tratamento da dor de origem inflamatória, como a dor articular presente em pacientes com artrite.

1.4. Inflamação e resolução do processo inflamatório

Em termos evolutivos, o sistema imunológico se aperfeiçoou, protegendo o hospedeiro e combatendo de maneira mais efetiva um processo infeccioso (bacteriano, viral), ou um trauma, ou ainda reparando um tecido lesionado (JANEWAY et al., 2001). Deste modo, a inflamação é uma resposta benéfica do hospedeiro, a qual ocorre em decorrência das possíveis alterações da integridade do organismo, permitindo a eliminação do agente que causou a infecção, ou o trauma, e consequentemente restabelecendo a homeostasia tecidual (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004).

O processo inflamatório agudo induz uma série de alterações, sendo que as primeiras a ocorrerem são as alterações vasculares, como o aumento do fluxo sanguíneo (vasodilatação) e da permeabilidade vascular. Adicionalmente, estas alterações descritas culminam com o extravasamento plasmático de fluido e proteínas (exsudato) e de células do sangue (p.ex.: leucócitos) com o objetivo de facilitar a migração destes para o local da lesão ou da infecção (VIVIER e MALISSEN, 2005). Além das células provenientes do sangue, células residentes, como, por exemplo, os macrófagos, também apresentam um papel importante no recrutamento adicional de mais células para o sítio inflamatório, onde os leucócitos (p.ex.: neutrófilos) e os macrófagos residentes atuam de maneira integrada no processo de fagocitose e na remoção dos agentes que desencadearam a resposta inflamatória (DELVES e ROITT, 2000; VIVIER e MALISSEN, 2005).

Após a neutralização do agente que desencadeou o processo inflamatório, outra etapa estritamente importante é o *clearance* (remoção) deste agente, bem como o reparo tecidual, permitindo, desta forma, que o processo inflamatório se resolva e volte ao estado não-inflamado (SERHAN et al., 2007, 2008). Consequentemente, se o

processo de resolução se concretizar, o objetivo do processo inflamatório foi alcançado, mas nem sempre é o que acontece. Atualmente, acredita-se que falhas no mecanismo de *clearance* e consequentemente da resolução do processo inflamatório parecem estar associadas à inflamação tecidual persistente, ou seja, à inflamação crônica, e à produção de anticorpos contra componentes celulares próprios (autoimunidade) (SERHAN e SAVILL, 2005; SUN et al., 2007). Várias doenças estão associadas à inflamação persistente, incluindo a AR, asma, doenças inflamatórias intestinais, aterosclerose, doenças cardiovasculares, doença de Alzheimer e câncer, entre outras (SERHAN, 2007; SERHAN et al., 2008).

A resolução do processo inflamatório era considerada um processo passivo, possivelmente em decorrência do catabolismo de mediadores pró-inflamatórios (MAJNO e JORIS, 2004). Contrariando esta ideia, hoje se sabe que a resolução da inflamação aguda é um processo ativo e altamente coordenado, controlado por diferentes vias bioquímicas que são ativadas e que produzem diversos mediadores lipídicos, os quais apresentam características pró-resolução (GILROY et al., 2004). Estes mediadores lipídicos possuem, dentre outras propriedades, a capacidade de inibir a migração de leucócitos para o local inflamado, são capazes de reverter a permeabilidade vascular e a vasodilatação, e promover a remoção de neutrófilos apoptóticos sem que ocorra a produção e liberação adicional de mediadores pró-inflamatórios (WILLOUGHBY et al., 2000; SERHAN et al., 2007; BANNENBERG e SERHAN, 2010).

Todos os eventos descritos anteriormente, os quais contribuem para o desenvolvimento da reação inflamatória, são coordenados por vários mediadores químicos que são produzidos e liberados em resposta ao estímulo nocivo. Como exemplo, a vasodilatação é causada por mediadores como a histamina, produzida principalmente por mastócitos, e óxido nítrico (NO), produzido por células do endotélio vascular, bem como bradicinina e o fator de ativação de plaquetas (PAF). Ainda, o aumento na permeabilidade vascular é promovido por uma diversidade de mediadores, onde podem ser citadas as aminas vasoativas (histamina e serotonina), as proteínas do sistema complemento (C3a e C5a), a substância P, entre outros. A quimiotaxia, o recrutamento e a ativação de leucócitos podem ser promovidos por mediadores como citocinas (p.ex.: TNF- α e IL-1 β), e quimiocinas, entre outros.

A lista de mediadores envolvidos na resposta inflamatória é muito extensa e não cabe aqui uma revisão detalhada a respeito. Porém, não mais importante que os outros mediadores, mas que serão abordados

com maior atenção, são alguns mediadores lipídicos derivados do ácido araquidônico.

O ácido araquidônico (AA) é um ácido graxo poliinsaturado (PUFA) formado por 20 átomos de carbono e 4 insaturações (20:4n-6) pertencente à família dos ácidos graxos ômega-6 (ω -6), o qual é metabolizado a partir de outro PUFA, o ácido linoléico (28:2n-6). Apesar do ácido linoléico não ser produzido por células de mamíferos, ele pode ser obtido prontamente a partir da dieta, sendo produzido em altas concentrações por células vegetais. Ainda, o ácido linoléico também pode dar origem ao ácido α -linoléico (18:3n-3), o qual é um PUFA pertencente à família dos ácidos graxos ômega-3 (ω -3). De modo interessante, as mesmas enzimas responsáveis pela metabolização do ácido linoléico (ácido graxo ω -6) são as mesmas enzimas necessárias para a conversão do ácido α -linoléico no ácido eicosapentenoico (EPA; 20:5n-3) e no ácido docosahexaenóico (DHA; 22:6n-3), os quais são os principais ácidos graxos ω -3 (CALDER, 2005).

De uma maneira geral, as células inflamatórias apresentam em sua membrana plasmática uma maior proporção do ácido graxo ω -6 ácido araquidônico (AA) e baixas proporções de ácidos graxos ω -3 (CALDER, 2005). Desta forma, o ácido araquidônico se torna o substrato mais disponível na membrana plasmática para a síntese de moléculas conhecidas como eicosanóides, dentre os quais se destacam as prostaglandinas (PGs), tromboxanos (TXs) e leucotrienos (LTs). O AA esterificado à membrana plasmática pode ser mobilizado por enzimas, como a fosfolipase A₂ (PLA₂), e assim o AA pode servir como substrato de várias enzimas para a síntese dos eicosanóides.

Assim, existem duas principais classes de enzimas responsáveis pela metabolização do AA: as ciclooxigenases (COXs) e as lipoxigenases (LOXs). As COXs dão origem às PGs e TXs e se apresentam sob duas isoformas: a COX-1, a qual é a isoforma constitutiva e apresenta um papel preponderante na manutenção da integridade do epitélio da mucosa estomacal e intestinal; e a COX-2, a qual é predominantemente induzida, sendo sua expressão aumentada principalmente por estímulos inflamatórios (VANE et al., 1998). Dentre as diferentes PGs produzidas, a PGE₂ apresenta vários papéis na inflamação, como indução de febre, aumento da permeabilidade vascular e vasodilatação e a indução de dor (FERREIRA e LORENZETTI, 1996).

As enzimas LOXs apresentam diversas funções, atuando em processos de sinalização celular, alterações estruturais e patológicas e no metabolismo de ácidos graxos (BRASH, 1999). Em humanos, já foram

identificadas 3 isoformas: a 5-LOX, a 12-LOX e a 15-LOX, sendo que o nome se refere à oxigenação do AA no carbono 5, 12 e 15, respectivamente. Dentre os produtos formados pela ação das enzimas LOXs, especificamente da 5-LOX, os LTs apresentam papel importante no processo inflamatório, sendo que o LTB_4 apresenta várias funções, como o aumento na permeabilidade vascular, a quimiotaxia de leucócitos, a liberação de enzimas lisossomais, o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio e a produção de citocinas pró-inflamatórias, como $TNF-\alpha$, $IL-1\beta$ e $IL-6$ (SAMUELSSON et al., 1987; PIOMELLI e GREENGARD, 1990; HEISE et al., 2000; CORTES-BURGOS et al., 2009).

A ideia de que a suplementação na dieta com ácidos graxos $\omega-3$ apresenta efeitos benéficos ao organismo já é conhecida há muito tempo, tendo em vista que há mais de 30 anos foi observado, pela primeira vez, que dieta enriquecida com óleo de peixe, o qual é composto principalmente por ácidos graxos $\omega-3$, estava associada ao baixo risco de desenvolver doenças cardiovasculares (BANG et al., 1976 *apud* SUN et al., 2007). Além disso, há mais de 100 anos, várias pessoas atribuíam diversos benefícios a partir do uso da conhecida “Emulsão Scott”, a qual apresenta em sua formulação principalmente o óleo de fígado de bacalhau, demonstrando que a sabedoria popular naquela época já reconhecia os benefícios do consumo de óleos derivados de peixe. Os PUFAs são essenciais tanto para o crescimento quanto para o desenvolvimento adequados (SALEM et al., 1996). Além disso, vários estudos foram e vem sendo desenvolvidos a respeito do papel dos PUFAs, principalmente dos ácidos graxos $\omega-3$, na prevenção e no tratamento de várias doenças, como câncer (LARSSON et al., 2004), Alzheimer (LUKIW e BAZAN, 2008), doenças cardiovasculares (ALBERT et al., 1998; 2002; HARRIS e VON SCHACKY, 2004), hipertensão, diabetes, AR e outras doenças autoimunes e inflamatórias (SIMOPOULOS et al., 1999).

Diversos ensaios clínicos foram conduzidos onde se avaliou a influência da suplementação com ácidos graxos $\omega-3$ na dieta de pacientes com diferentes patologias (CALDER, 2006). Dentre as diversas doenças que foram avaliadas, a AR (CALDER, 2008b), doenças inflamatórias intestinais (BELLUZZI et al., 1996; CALDER, 2008a) e asma (DRY e VINCENT, 1991; SURETTE et al., 2008) são as que apresentam maior número de ensaios clínicos desenvolvidos, provavelmente pelo maior efeito benéfico dos ácidos graxos $\omega-3$ observado nestas doenças. Embora os achados clínicos sugiram benefícios em função da suplementação com ácidos graxos $\omega-3$, os

mecanismos moleculares pelos quais estes compostos exercem seus efeitos começaram a ser descobertos somente nos últimos anos.

Alguns pesquisadores começaram a levantar a hipótese de que os efeitos benéficos observados com a suplementação de ácidos graxos ω -3 poderiam ser decorrentes da metabolização destes compostos, originando substâncias com potencial anti-inflamatório (HONG et al., 2003; SERHAN, 2007). Estudos recentes analisaram e identificaram as diferentes classes de mediadores lipídicos que eram produzidos no exsudato utilizando modelos experimentais de inflamação que se autorresolvem (ARITA et al., 2005a; SUN et al., 2007). Dentre estes mediadores podemos destacar as lipoxinas (LXs), as resolvinas (Rvs), as protectinas (PDs) e as maresinas. As lipoxinas são derivadas do PUFA ω -6 AA e as resolvinas e protectinas são derivadas dos PUFAs ω -3 (para revisão ver SERHAN et al., 2007; SERHAN et al., 2008; KOHLI e LEVY, 2009).

Especificamente na família das resolvinas, encontramos as resolvinas da série E (RvE) e as resolvinas da série D (RvD), as quais são produzidas a partir dos ácidos eicosapentenoico (EPA) e docosaheptaenoico (DHA), respectivamente. O grupo das resolvinas, termo que foi atribuído a partir do inglês *resolution phase interaction products* (produtos de interação da fase de resolução) foi primeiramente introduzido para demonstrar que estes novos compostos são mediadores endógenos, biosintetizados no exsudato da fase de resolução do processo inflamatório e que apresentam potentes ações anti-inflamatórias e ações imunorregulatórias (SERHAN et al., 2000; SERHAN et al., 2002; ARIEL et al., 2006; CAMPBELL et al., 2007; SERHAN et al., 2008).

A classe das resolvinas da série E foi a primeira a ser identificada, sendo que atualmente se conhece dois tipos: a RvE1 e a RvE2. Diversos estudos, tanto *in vitro* como *in vivo* demonstraram um importante papel da RvE1 em inibir a atividade de diversas células em concentrações na faixa de nanogramas, como a transmigração e a quimiotaxia de neutrófilos, inibição da produção e síntese de diversas citocinas pró-inflamatórias em células dendríticas e ativação da fagocitose de leucócitos polimorfonucleares (PMNs) apoptóticos por macrófagos, entre outras (CAMPBELL et al., 2007; SEKI et al., 2009). Em adição a estes resultados obtidos *in vitro*, observou-se um efeito protetor da RvE1 *in vivo* quando avaliada em diversos modelos inflamatórios, como na doença inflamatória intestinal (ARITA et al., 2005b), periodontite (HASTURK et al., 2006) e asma (HAWORTH et al., 2008). Recentemente, foi descoberto que as ações da RvE1 ocorre devido à ativação de receptores específicos com sete domínios

transmembrana acoplados à proteína G, como o receptor ChemR23 (ARITA et al., 2005a), e que também atua como agonista do receptor de LTB₄, o BLT1. Desta forma, a RvE1 compete com o LTB₄ pela ligação ao receptor BLT1 para produzir os seus efeitos anti-inflamatórios e pró-resolução (ARITA et al., 2007).

Com relação à RvE2, sua identificação e isolamento foram realizados bem recentemente, o que justifica a menor quantidade de estudos com esta molécula quando comparado à RvE1. Estes estudos, no entanto, demonstraram que a RvE2 também apresenta inibição potente da migração de PMNs, bem como efeitos anti-inflamatórios marcantes em modelo animal de peritonite induzida por zimozan (TJONAHEN et al., 2006; OGAWA et al., 2009). Assim, estes e outros estudos adicionais vêm demonstrando que as duas resolvinas da série E podem ser as responsáveis pelos efeitos benéficos observados em várias doenças humanas a partir da suplementação na dieta com ácido graxos ω -3, como o EPA.

Com relação ao grupo das resolvinas da série D, já foram identificados 4 membros: RvD1 a RvD4. Apesar de se saber que estes mediadores são formados a partir do ácido DHA na presença das enzimas LOXs, apenas a via de síntese da RvD1 foi estabelecida (SUN et al., 2007). Assim, a biossíntese da RvD1 envolve uma série de reações de oxigenação pela 15-LOX e 5-LOX (KOHLI e LEVY, 2009). Inicialmente, foi demonstrado que a RvD1 é um potente inibidor do tráfego de leucócitos induzido por TNF- α no modelo de peritonite induzida por zimozan (HONG et al., 2003). Ainda, neste mesmo trabalho foi observado que a RvD1 também inibe a produção de IL-1 β em células gliais humanas quando estimuladas com TNF- α . No modelo de isquemia cerebral seguida de reperfusão, a RvD1 mostrou ser um potente neuroprotetor por inibir tanto a infiltração de leucócitos quanto a indução do fator de transcrição NF- κ B e da enzima COX-2 (MARCHESELLI et al., 2003). Quando avaliada em outros modelos animais, como na isquemia/reperfusão renal e peritonite, a RvD1 apresentou vários efeitos anti-inflamatórios como, por exemplo, a inibição do infiltrado de PMNs (DUFFIELD et al., 2006; SUN et al., 2007). Ainda, Spite e colaboradores (2009) demonstraram que a RvD1 foi capaz de diminuir o número de leucócitos e a produção de prostanoídes em um modelo de estresse oxidativo em camundongo. Todos estes trabalhos em conjunto enfatizam os efeitos anti-inflamatórios e pró-resolução da RvD1, assim como evidenciado para a RvE1.

Quanto ao segundo membro da família das resolvinas, a RvD2, apenas recentemente a sua estereoquímica e seus efeitos *in vitro* e *in vivo* foram avaliados. Desta forma, a RvD2 demonstrou ações potentes no modelo de peritonite induzida por zimosan, no qual reduziu significativamente o infiltrado de PMN quando empregada na ordem de picogramas. Ainda, em um modelo animal de sepse microbiana, a RvD2 diminuiu a produção excessiva de citocinas, bem como o recrutamento de neutrófilos, ao mesmo tempo que aumentou as células mononucleares na cavidade peritoneal e a fagocitose por macrófagos, prevenindo a letalidade induzida por sepse (SPITE et al., 2009). Recentemente, foi identificado que a RvD1 pode se ligar a dois tipos de receptores com sete domínios transmembrana acoplados à proteína G: o receptor ALX/FRP2 (receptor de LXA₄) e o receptor órfão GPR32 (KRISHNAMOORTHY et al., 2010), promovendo, desta forma, os efeitos pró-resolução atribuídos a estes mediadores lipídicos.

Dentre os estudos que avaliaram a suplementação de dieta com PUFAs ω -3, um estudo em particular conduzido pelo Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto miocardico (GISSI) mostrou uma diferença clinicamente significativa na taxa de morte, incidência de infarto do miocárdio e de derrame nos pacientes avaliados (GISSI INVESTIGATORS, 1999). Uma análise mais detalhada deste estudo mostrou que um dos grupos estava sendo tratado com PUFAs ω -3 conjuntamente com aspirina. Porém, não houve uma explicação do mecanismo observado para o efeito benéfico da aspirina na presença destes PUFAs ω -3 neste estudo.

Além da descoberta dos mediadores lipídicos pró-resolução mencionados anteriormente (p.ex.: Rvs da série D), a análise lipidômica do exsudato obtido durante a fase de resolução da inflamação de animais submetidos à inflamação aguda e que foram tratados adicionalmente com aspirina e DHA, mostrou a presença de compostos não descritos previamente, os quais apresentaram potentes atividades anti-inflamatórias (SERHAN et al., 2002). Estes compostos foram descritos como resolvinas desencadeadas pela aspirina, do inglês *aspirin-triggered resolvins* (AT-Rvs), sendo que também foram identificados 4 membros desta família: AT-RvD1 a AT-RvD4 (SERHAN et al., 2004; SERHAN, 2007) (Figura 2).

O mecanismo de ação da aspirina envolve uma acetilação irreversível no sítio ativo da COX-2, inibindo somente a atividade de oxidase, sendo que a atividade de peroxidase da mesma permanece inalterada (VANE et al., 1998). Assim, mesmo na presença da aspirina, a enzima COX-2 permanece funcional, onde a produção de eicosanóides

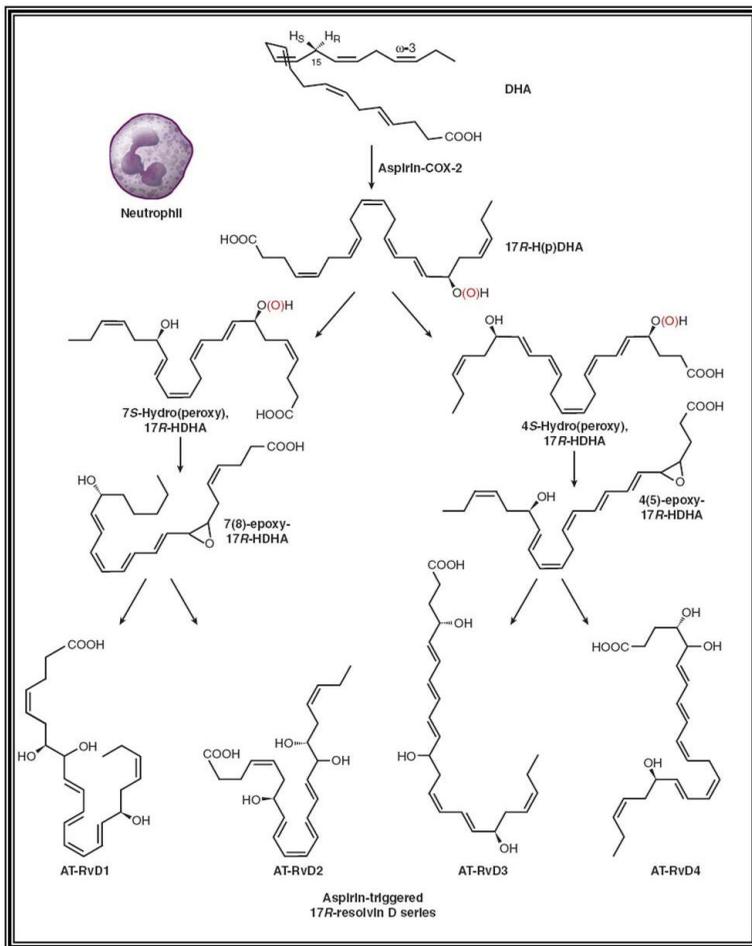


Figura 2. Via de biossíntese das resolvinas (17R) da série D formadas na presença da aspirina. A série de resolvinas 17R é produzida a partir do DHA na presença da aspirina. Células endoteliais humanas que expressam COX-2 tratadas com aspirina transforma o DHA em 17R-HDHA (17(R)HDoHE). PMN humanos podem, por sua vez, através da interação transcelular, converter 17R-HDHA em dois intermediários via 5-LOX, sendo que cada um destes intermediários é rapidamente transformado em dois intermediários epóxidos, 7(8)-epóxido (à esquerda) e 4(5)-epóxido (à direita). Estes intermediários epóxidos sofrem epoxidação e hidrólise enzimáticas, originando AT-RvD1 a AT-RvD4. (Adaptado de Serhan, 2007).

está inibida (atividade de oxidase da COX-2), mas a ativação de uma via alternativa (atividade de peroxidase da COX-2) promove a conversão do ácido DHA em um intermediário, o 17R-HDHA ou 17(R)HDoHE (SERHAN et al., 2002). Este, por sua vez, pode sofrer oxigenação sequencial pela 5-LOX, reações de epoxidação e hidrólise enzimática, resultando na produção da resolvína AT-RvD1 (SERHAN et al., 2002; SERHAN et al., 2008).

Assim como a RvD1, a AT-RvD1 também apresenta ações anti-inflamatórias *in vivo*. Quando avaliada no modelo animal de peritonite, a AT-RvD1 diminui a infiltração de PMN no local inflamado, efeito este dependente da dose, sendo que esta inibição foi observada na ordem de nanogramas (SUN et al., 2007). Além disso, tanto a RvD1 quanto a AT-RvD1 são igualmente eficazes em diminuir o infiltrado de leucócitos, porém a AT-RvD1 parece ser mais resistente à atividade de enzimas inativadoras, como a 15-prostaglandina desidrogenase/eicosanóide oxidoreductase (EOR) (SUN et al., 2007). Estes resultados avaliados em conjunto com os dados obtidos pelo grupo GISSI sugerem que a suplementação com ácidos graxos ω -3 na presença de aspirina direciona para a formação das resolvinas desencadeadas pela aspirina (AT-Rvs), concomitantemente com a inibição da via das PGs e TXs. Ainda, as novas descobertas a respeito da produção ativa destes mediadores durante a resolução do processo inflamatório revelam um novo mecanismo de ação pelo qual a aspirina apresenta o seu efeito anti-inflamatório: ela não somente inibe a produção de mediadores pró-inflamatórios, como também ativa uma via de biossíntese de mediadores responsáveis por estimular a resolução do processo inflamatório e restaurar a homeostasia tecidual.

Com base nos estudos citados anteriormente, pode ser evidenciado que a grande maioria destes avaliaram o potencial anti-inflamatório dos mediadores lipídicos pró-resolução em vários modelos animais. No entanto, somente alguns investigaram se estes medidores apresentam, além do potencial anti-inflamatório, um potencial de inibir a dor (SVENSSON et al., 2007; XU et al., 2010; BANG et al., 2010). Além disso, nenhum estudo até então investigou o potencial do precursor de resolvinas da série D 17(R)HDoHE e da resolvína AT-RvD1 em inibir a dor e o processo inflamatório articular. Desta forma, novas terapias com maior eficácia ou ainda que apresentem menos efeitos colaterais são necessárias para o tratamento da dor de origem inflamatória, como a dor articular presente em pacientes com artrite, e as resolvinas vem demonstrando ser moléculas bastante promissoras na terapia na dor articular.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar através de estudos farmacológicos, de biologia molecular e de imunistoquímica, o potencial efeito anti-hiperalgésico e anti-inflamatório de mediadores lipídicos pró-resolução em um modelo de artrite induzida por adjuvante (AIA) em ratos.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do tratamento preventivo e terapêutico com o precursor de resolvinas da série D, 17(R)HDoHE, administrado por via sistêmica e local, sobre a gênese e a manutenção da hiperalgesia mecânica e térmica, bem como o efeito do tratamento terapêutico sistêmico com a resolvina AT-RvD1 sobre o desenvolvimento da hiperalgesia mecânica induzida por AIA em ratos.
- Investigar o efeito do tratamento terapêutico repetido com o precursor 17(R)HDoHE ou com a resolvina AT-RvD1 sobre a manutenção da hiperalgesia mecânica induzida por AIA em ratos.
- Comparar o potencial anti-hiperalgésico do precursor 17(R)HDoHE com drogas clássicas utilizadas na clínica sobre a hiperalgesia mecânica induzida por AIA em ratos.
- Avaliar o efeito do tratamento terapêutico único e repetido com o precursor 17(R)HDoHE sobre o desenvolvimento dos sinais clínicos no modelo de AIA em ratos.
- Determinar o efeito do tratamento terapêutico repetido com o precursor 17(R)HDoHE sobre os níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β na medula espinhal e no tecido da pata traseira, bem como a expressão (proteína e RNAm) do fator de transcrição NF- κ B e da enzima COX-2 na medula espinhal e no gânglio da raiz dorsal (GRD) de ratos submetidos a AIA.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Ratos machos Wistar Hannover, pesando entre 180 e 250 g, foram criados no Biotério Setorial do Laboratório de Farmacologia Experimental, sob coordenação do Prof^o. João Batista Calixto, na Universidade Federal de Santa Catarina. Os animais foram mantidos sob temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e umidade (60–80%) controladas e sob um ciclo claro-escuro de 12:12 h. Ração e água foram fornecidos *ad libitum*, exceto durante os experimentos. Os animais foram ambientados ao laboratório por pelo menos 1 h antes dos procedimentos experimentais, os quais foram realizados entre as 8 e 18 h. Todos os experimentos foram realizados de acordo com as diretrizes atuais de cuidados com os animais de laboratório e com as diretrizes éticas para investigação de dor experimental em animais conscientes (ZIMMERMANN, 1983). O número de animais e a intensidade do estímulo nocivo utilizado foram os mínimos necessários para demonstrar os efeitos dos tratamentos com as drogas. Todos os protocolos foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA) (Protocolo 043/CEUA/PRPe/2008).

3.2. Indução da dor inflamatória e artrite induzida pelo Adjuvante Completo de Freund (CFA)

O protocolo para a indução da dor inflamatória e artrite experimental foi realizado de acordo com a metodologia proposta por Stein e colaboradores (1988). Inicialmente, os animais foram anestesiados com uma mistura de isoflurano e oxigênio (2,5%-2,5%) e após os animais foram tratados com o Adjuvante Completo de Freund (CFA) emulsificado em solução salina tamponada (PBS). A emulsão CFA:PBS foi feita em uma razão 1:1 pelo método da extrusão pela seringa, sendo que duas seringas foram conectadas por uma torneira de 3 vias até a obtenção de uma emulsão estável (~ 5 min). Vale ressaltar que cada ml de CFA é composto por 0,85 ml de óleo de parafina e 0,15 ml de monooleato de manida e 1 mg de *Mycobacterium tuberculosis* desidratada e inativada por calor. Cada animal recebeu um total de 200 μl da emulsão na superfície plantar da pata traseira direita (pata ipsilateral). Este modelo de artrite induzida por adjuvante (AIA) permite avaliar tanto a dor inflamatória aguda como a reação inflamatória

crônica característica da artrite (BENDELE, 2001; NAGAKURA et al., 2003; KANNAN et al., 2005).

3.3. Avaliação do comportamento nociceptivo

3.3.1. *Resposta de retirada da pata traseira induzida por filamentos de von Frey*

A hiperalgesia mecânica induzida por AIA foi avaliada de acordo com a metodologia descrita previamente por Nagakura et al. (2003), com algumas modificações. Os animais foram colocados individualmente em caixas de acrílico transparente (13,8 cm x 18,0 cm x 68,2 cm) dispostas sobre plataformas de malha de arame (23,0 cm x 39,8 cm x 72,7 cm) para permitir o acesso à superfície plantar de ambas as patas traseiras. Os animais foram ambientados por pelo menos 1 h antes do teste comportamental. A frequência da resposta de retirada da pata [estimada em porcentagem (%)], foi quantificada frente a 10 aplicações do filamento de Von Frey de 8,0 g (filamentos de von Frey, Stoelting, E.U.A.) com duração de aproximadamente 3 s cada. O estímulo foi aplicado na superfície plantar de cada pata traseira separadamente. A resposta nociceptiva foi avaliada na fase aguda (1h-24h e 72h), sub-crônica (14 dias) e crônica (30 dias) após a indução da AIA. Todos os grupos foram avaliados antes da injeção de CFA para se determinar o limiar mecânico basal.

3.3.2. *Avaliação do limiar nociceptivo térmico*

A hiperalgesia térmica da pata traseira foi avaliada utilizando o teste Plantar[®] (Ugo Basile, Itália) de acordo com a metodologia descrita inicialmente por Hargreaves et al. (1988). Resumidamente, os ratos foram ambientados ao equipamento, o qual consiste de caixas individuais Perpex[®] dispostas sobre uma mesa de vidro. Uma fonte radiante de calor infravermelho (40 W) foi direcionada à superfície plantar da pata traseira e o tempo gasto para o animal retirar a pata traseira foi definido como a latência de retirada da pata (s). Um valor limite máximo de 20 s foi estabelecido para evitar o dano tecidual. O equipamento foi calibrado para resultar em uma latência de retirada da pata de aproximadamente 15 s em ratos naïve.

3.4. Avaliação dos parâmetros da doença: edema de pata, edema articular e rigidez articular

3.4.1. *Edema de pata e edema articular*

O edema, ou seja, o aumento no volume das patas, tanto direita (ípsilateral) quanto esquerda (contralateral) foi avaliado utilizando um Pletismômetro[®] (Ugo Basile, Itália). A quantificação do edema foi realizada antes e após a injeção i.pl. de CFA, bem como em vários intervalos de tempo em resposta ao tratamento único com 17(R)HDoHE (0 a 30 dias, a cada 3 dias) ou após o tratamento repetido (0 a 20 dias, a cada 2 dias). Além disso, o edema da articulação tíbio-tarsal (tornozelo) foi medido utilizando-se um paquímetro manual orientado no plano médio-lateral na altura da linha da articulação (MCDOUGALL et al., 2009), realizando mínima compressão da articulação. Este parâmetro foi avaliado em triplicata e o valor médio foi utilizado como o índice de edema articular.

3.4.2. *Rigidez articular*

A rigidez articular foi avaliada de acordo com a metodologia descrita previamente por Nagakura et al. (2003). Deste modo, o movimento de flexão e extensão da articulação tíbio-trasal (tornozelo) foi realizado uma vez em cada direção e um escore de rigidez articular foi atribuído como segue: escore 0, sem restrição de movimento; escore 1, restrição do movimento de flexão ou extensão; ou escore 2, restrição do movimento de flexão e extensão.

3.5. Quantificação dos níveis de citocinas

Para avaliar se os mediadores pró-resolução 17(R)HDoHE e AT-RvD1 poderiam modular os níveis de citocinas pró-inflamatórias, os animais foram sacrificados por decapitação e tiveram o tecido da superfície plantar da pata traseira e a medula espinhal lombar (L4-L5) coletados 4 h após o término do tratamento terapêutico repetido com o precursor 17(R)HDoHE (300 ng/i.p., por 5 dias, 1 vez ao dia), com a resolvina AT-RvD1 (100 ng/i.p., por 4 dias, 2 vezes ao dia) ou com veículo (PBS). Os tecidos foram congelados em nitrogênio líquido e estocados a -70 °C para posterior análise.

Desta maneira, os níveis das citocinas pró-inflamatórias fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 1 beta (IL-1 β) foram

determinados como descrito previamente (MANJAVACHI et al., 2010). Para o preparo das amostras, os tecidos foram homogeneizados em tampão fosfato contendo Tween 20 0,05 %, fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) 0,1 mM, cloreto de benzetônio 0,1 mM, ácido etilenodiamino tetracético (EDTA) 10 mM e aprotinina A 20 UI. Em seguida, o homogenato foi centrifugado a 7.000 x g por 10 min e o sobrenadante obtido foi armazenado a - 70 °C até o momento da análise. Os níveis das citocinas foram determinados utilizando-se kits próprios de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) de acordo com as recomendações do fabricante (R&D Systems, E.U.A.). A dosagem de proteínas das amostras foi realizada segundo o método descrito por Bradford (1976). Os resultados foram expressos em concentração de citocinas por miligrama de proteína.

3.6. Ensaio de imunoistoquímica

3.6.1. *Preparo das amostras*

A fim de avaliar os possíveis mecanismos envolvidos nas ações anti-hiperalgésicas do precursor 17(R)HDoHE, investigou-se se o mesmo poderia modular a ativação do fator de transcrição nuclear kapa B (NF- κ B) e a expressão da enzima ciclooxigenase-2 (COX-2) no gânglio da raiz dorsal (GRD) e na medula espinhal de animais submetidos à AIA. Desta forma, diferentes grupos de animais foram tratados de forma sistêmica (i.p.) com 17(R)HDoHE (300 ng/sítio) ou com veículo (PBS) 3 dias após a indução de AIA. Em seguida, 4 h após o tratamento, o GRD e a medula espinhal foram coletados, processados e avaliados através da técnica de imunoistoquímica quanto à imunoreatividade para os anticorpos contra NF- κ B e COX-2.

Para isso, os animais foram anestesiados com hidrato de cloral 7% (8 ml/kg, i.p.) e após anestesia profunda foram submetidos à perfusão com paraformaldeído (PFA) 4% em PBS. Em seguida, tanto a medula espinhal quanto os GRD da região lombar (L4-L5) foram coletados e fixados em PFA 4% por 24 h, sendo mantidos em etanol 70% até o processamento para inclusão da amostra. Antes da inclusão em parafina, os tecidos foram desidratados com concentrações crescentes de etanol (EtOH 70%, 80%, 90% e EtOH absoluto) e, em seguida, mantidos em xilol por 30 min, em 2 etapas de 3° min cada (etapa de clareamento ou diafanização). Logo após, os tecidos foram mantidos em parafina líquida (56-60°C), por 3 h, e então incluídos em

parafina (montagem do bloco de parafina para a realização dos cortes histológicos).

Os cortes histológicos, com espessura de 5 μm , foram feitos em um micrótomo (Leica Co., E.U.A.) e dispostos sobre lâminas silanizadas para posterior realização da reação de imunistoquímica. Para tanto, as lâminas contendo os cortes histológicos foram colocadas em estufa (~ 70 °C) até a completa fusão da parafina. Em seguida, os cortes histológicos foram desparafinizados em xilol e hidratados com concentrações decrescentes de etanol (etanol absoluto, EtOH 90%, 80% e 70%). Após, realizou-se o bloqueio da atividade da peroxidase endógena para evitar a ocorrência de reações inespecíficas e descartar a geração de resultados falso-positivos. Assim, as lâminas foram colocadas em uma solução de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 1,5% em metanol absoluto (v/v) por 20 minutos, sendo o excesso de H_2O_2 retirado em um banho com água destilada. A seguir, os cortes foram submetidos à reativação antigênica com a finalidade de se recuperar os sítios antigênicos mascarados pela fixação em PFA 4% e inclusão do tecido em parafina. Desta forma, preparou-se uma solução tampão contendo 180 ml de ácido cítrico 0,1 M e 820 ml de citrato de sódio 0,1 M, pH 6,0, a qual foi diluída na proporção de 1:10 em água destilada. As lâminas foram imersas nesta solução e mantidas em banho-maria (95-98 °C), por 45 minutos. Após o período de reativação antigênica pelo calor, as lâminas foram retiradas do banho-maria, mantidas durante 20 minutos em temperatura ambiente, lavadas em água destilada e submersas em solução de PBS.

3.6.2. *Reação de imunistoquímica*

Após o preparo das amostras como descrito no subitem anterior, a reação de imunodeteção foi realizada utilizando anticorpos primários específicos para os marcadores de interesse: o anticorpo policlonal de coelho anti-COX-2 (diluição 1:500) (#4842; Cell Signaling Technology, E.U.A.) e o anticorpo monoclonal de camundongo anti-p-p65 do fator de transcrição NF- κB (diluição 1:50) (sc-372, Santa Cruz, E.U.A.). Os cortes histológicos foram incubados com os anticorpos diluídos como descrito acima e mantidos em câmara úmida em temperatura de 2-8 °C por 12-16 h. Após o período de incubação, as lâminas foram lavadas com tampão PBS em temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram incubadas com anticorpo secundário anti-IgG/IgM conjugado com um polímero de peroxidase (EnVision Plus; Dako Cytomation) em

câmara úmida por 1h em temperatura ambiente. Posteriormente, o excesso do anticorpo secundário foi retirado dispendo as lâminas duas vezes em PBS em temperatura ambiente, por 5 min cada. A reação colorimétrica foi realizada utilizando-se o kit comercial Dako Cytomation, o qual consiste de uma solução de cromógeno 0,05 % de 3,3'-diaminobenzidina (DAB: 3,3',4,4'-tetraaminobifeniltetrahydrocloro) e 0,3 % de H₂O₂ em PBS. O tempo de incubação dos cortes com a solução de cromógeno foi padronizado em 60 s, sendo que após este período as lâminas foram imersas em água destilada. Em seguida, foi realizada a contra-coloração das lâminas em solução de hematoxilina de Harris por 30 s e após desidratação em concentrações crescentes de etanol (EtOH 70%, 80%, 90% e EtOH absoluto), diafanização em xilol e fixação das lamínulas com Entellan® (Merck, Brasil). Em cada ensaio realizou-se um controle negativo na ausência do anticorpo primário.

As imagens foram obtidas utilizando-se uma câmera digital (Sight DS-5M-L1, Nikon, E.U.A.) conectada a um microscópio ótico (Eclipse 50i, Nikon, E.U.A.). Os ajustes para a aquisição das imagens foram iguais para todos os grupos considerando o mesmo marcador. Cinco campos por corte (5 ratos por grupo) em um aumento de 400x foram capturados do gânglio da raiz dorsal (GRD) e das regiões superficiais (lâminas I e II) e das lâminas V e VI do corno da raiz dorsal da medula espinhal, regiões associadas primariamente com a terminação de fibras nociceptivas aferentes primárias. As imagens obtidas foram analisadas utilizando-se o software NIH ImageJ 1.36b (National Institute of Health, E.U.A.). A reação positiva foi evidenciada pelo surgimento da coloração castanha no local da marcação dos anticorpos. Para todas as análises, a intensidade total de pixels foi determinada e os dados foram expressos como densidade ótica (D.O.) utilizando o aumento de 400x. O nucleus propius (lâminas III e IV) e o corno ventral da medula espinhal não foram avaliados.

3.7. PCR em tempo real

3.7.1. *Extração do RNA*

Os animais dos diferentes grupos, ou seja, animais que receberam veículo, animais controle não tratados e animais tratados foram sacrificados por decapitação. Os animais foram tratados com o precursor de resolvinas da série D, 17(R)HDoHE (300 ng/i.p.), 3 dias após a indução de AIA, sendo que 4 h após o tratamento a medula

espinhal (L4-L5) e os gânglios da raiz dorsal (L1-L5) foram removidos, congelados em nitrogênio líquido e estocados a -70 °C. Para a extração do RNA total, os tecidos foram homogeneizados em 500 µL de TRIzol® (Invitrogen, Brasil), conforme as instruções do fabricante. Após a homogeneização dos tecidos, foi feita a adição de 200 µL de clorofórmio seguido de agitação e centrifugação (10.000 rpm, 15 min., 4 °C). O sobrenadante obtido da centrifugação corresponde à fração rica em RNA, a qual foi transferida para um tubo, seguido da adição de 500 µL de álcool isopropílico. Após, a mistura foi mantida em repouso em temperatura ambiente por 10 min e então submetida à centrifugação a 10.000 rpm, 10min, a 4 °C. Nesta etapa, o sobrenadante foi descartado, sendo que o precipitado obtido foi ressuspensão em 1 mL de etanol 4 °C. Em seguida, a amostra foi submetida à nova centrifugação a 5.000 rpm, 5 min., 4 °C, o sobrenadante desprezado e o precipitado resultante contendo RNA foi ressuspensão em água ultra pura. A concentração e a pureza do RNA foram determinadas no aparelho NanoDrop 1100 (NanoDrop Technologies, E.U.A.). As amostras de RNA foram armazenadas a -70 °C até o momento do uso.

3.7.2. *Preparo do DNA complementar (Reação da Transcriptase Reversa)*

Para se avaliar a expressão do RNAm para o fator de transcrição NF-κB e para a enzima COX-2, tanto na medula espinhal quanto do GRD de ratos, foi realizada a preparação do DNA complementar (DNAc) a partir da atividade da enzima transcriptase reversa seguida da reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR). Desta forma, para a confecção do DNAc 2 µg de RNA total foram incubados com 1 µL de Oligo dT 15, 1 µL do mix de dNTP (10 mM), e 10 µL com água ultra pura. Este meio de reação foi aquecido a 65 °C, por 5 min, resfriado a 4 °C, por 5 min e, em seguida, adicionou-se 4 µL de tampão de primeira fita (Tris-HCl 250 mM, pH 8,3; KCl 375 mM e MgCl₂ 15 mM), 2 µL de DTT (0,1 mM) e 1µL de inibidor de RNase (2500 U) incubando-se a 37 °C, por 2 min. Posteriormente, a reação foi iniciada pela adição de 1µL da enzima M-MLV (200 U) a 37 °C, por 50 min. A reação foi interrompida aumentando-se a temperatura para 75 °C, por 15 minutos. O DNAc obtido foi armazenado a 4°C até a realização da reação de PCR em tempo real.

3.7.3. *Reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR)*

Para a realização da reação em cadeia da polimerase em tempo real, o DNAC (300 ng) foi amplificado em duplicata utilizando o kit Master Mix TaqMan® Universal PCR com sondas específicas para ratos, com marcação 3'quencher MGB e FAM para COX-2 (Rn00568225_m1), NF-κB (Rn01399583_m1) e β-actina (Rn00667869_m1) de rato, sendo que a β-actina foi utilizada como controle endógeno para normalização. A reação de PCR foi realizada em multiplex em uma placa de reação óptica de 96 poços (Applied Biosystems, E.U.A.). O meio de reação consistia em: 1 μL de DNAC, 5 μL de Master mix, 0,5 μL da sonda específica juntamente com o controle endógeno e 3,5 μL de água ultra pura, resultando em um volume final de 10 μL. As reações de amplificação foram realizadas em um termociclador (StepOne Plus, Applied Biosystems, E.U.A.) para 50 ciclos. Os parâmetros do termociclador foram os seguintes: 50 °C por 2 min, 95 °C por 10 min, 50 ciclos a 95 °C por 15 s e 60 °C por 1 min. A fluorescência foi registrada a cada ciclo de amplificação e os dados foram analisados utilizando o método para $2^{-\Delta\Delta CT}$ para a quantificação relativa.

3.8. Protocolo geral de tratamento com os mediadores pró-resolução

De acordo com cada protocolo experimental, diferentes grupos de animais foram tratados com os mediadores pró-resolução (17(R)HDoHE ou AT-RvD1), antes ou após a indução da artrite, e foram avaliados quanto ao potencial em modular a dor inflamatória no modelo de artrite induzida por adjuvante (AIA). Adicionalmente, diferentes períodos de tempo foram escolhidos com o intuito de avaliar o efeito dos mediadores pró-resolução na instalação da hiperalgisia mecânica e térmica associada à AIA, assim como na manutenção do quadro hiperalgésico, ou seja, quando a hiperalgisia já estava presente.

Para avaliar o potencial efeito preventivo do precursor 17(R)HDoHE sobre a dor inflamatória, foi estabelecido o pré-tratamento sistêmico intraperitoneal (i.p.) 30 min (300 ng/i.p.) antes da indução de AIA, sendo que a hiperalgisia mecânica e térmica foram avaliadas entre 0,5 e 24 h após o tratamento (Figura 3).



Figura 3. Protocolo de tratamento preventivo com o precursor 17(R)HDoHE. Trinta minutos antes da indução da artrite induzida por adjuvante (AIA), os animais receberam uma injeção intraperitoneal (i.p.) do precursor de resolvinas da série D, 17(R)HDoHE (300 ng/i.p.), e a hiperalgesia mecânica e térmica foram avaliadas entre 0,5 e 24 h após a indução.

Em seguida, a fim de avaliar o possível efeito terapêutico do precursor 17(R)HDoHE no período inflamatório agudo, os animais receberam um único tratamento intraplantar (i.pl.) ou i.p. com o precursor 17(R)HDoHE (3, 30 ou 100 ng/i.pl. ou 300 ng/i.p., respectivamente) três dias após a indução de AIA, onde um quadro inflamatório e nociceptivo agudo já se encontra estabelecido (Figura 4).

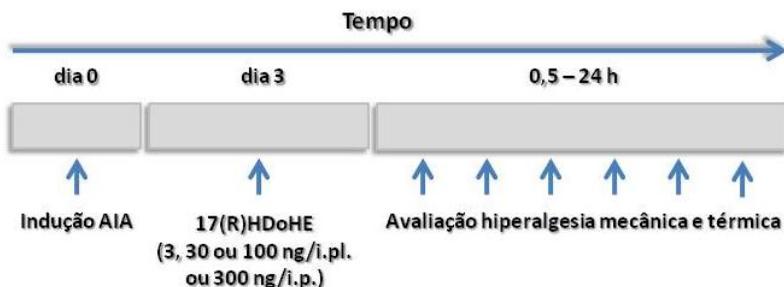


Figura 4. Protocolo de tratamento terapêutico com o precursor 17(R)HDoHE. Três dias após a indução da artrite induzida por adjuvante (AIA), os animais receberam uma injeção intraplantar (i.pl.) ou intraperitoneal (i.p.) do precursor de resolvinas da série D, 17(R)HDoHE (3, 30 ou 100 ng/i.pl. ou 300 ng/i.p., respectivamente), e a hiperalgesia mecânica e térmica foram avaliadas entre 0,5 e 24 h após o tratamento i.p. e a hiperalgesia mecânica foi avaliada entre 0,5 e 6 h após o tratamento i.pl..

Em outro protocolo experimental, também foi avaliado o efeito terapêutico da resolvina formada na presença da aspirina, AT-RvD1 (100 ou 300 ng/i.p.), sobre a hiperalgesia mecânica, sendo administrada 3 dias após a indução de AIA (Figura 5).

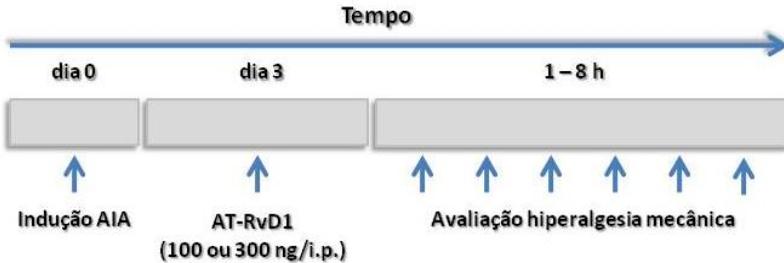


Figura 5. Protocolo de tratamento terapêutico com a resolvina AT-RvD1. Três dias após a indução da artrite induzida por adjuvante (AIA), os animais receberam uma injeção intraperitoneal (i.p.) da resolvina formada na presença da aspirina, AT-RvD1 (100 ou 300 ng/i.p.), e a hiperalgesia mecânica foi avaliada entre 1 e 8 h após o tratamento.

O efeito do tratamento repetido com os mediadores lipídicos 17(R)HDoHE ou AT-RvD1 também foi avaliado sobre a hiperalgesia mecânica no processo inflamatório agudo. Assim, os animais foram tratados com o precursor 17(R)HDoHE (300 ng/i.p.; 5 dias, 1 vez ao dia) ou com a resolvina AT-RvD1 (100 ng/i.p.; 4 dias, 2 vezes ao dia) e a hiperalgesia mecânica foi avaliada até o término do tratamento (Figura 6).

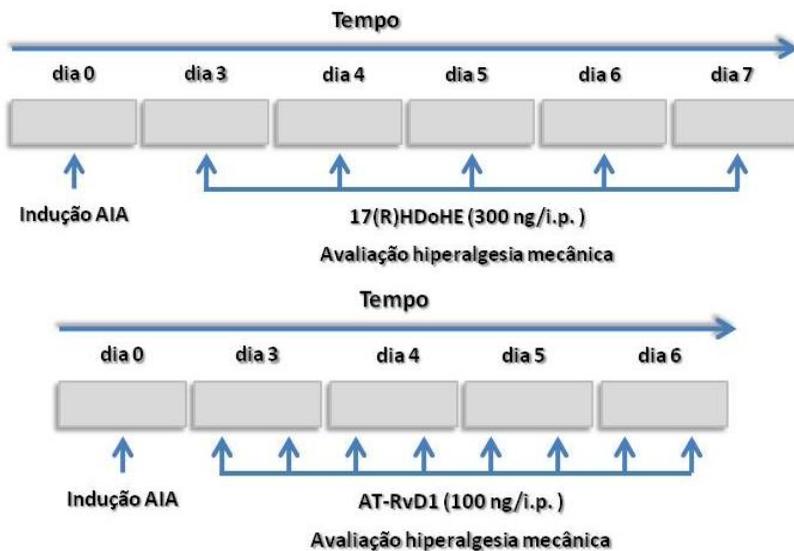


Figura 6. Protocolo de tratamento repetido terapêutico com 17(R)HDoHE ou AT-RvD1. Três dias após a indução da artrite induzida por adjuvante (AIA), os animais receberam uma injeção intraperitoneal (i.p.) do precursor de resolvinas da série D 17(R)HDoHE (300 ng/i.p.), 1 vez ao dia, por 5 dias (figura superior) ou da resolvina formada na presença da aspirina AT-RvD1 (100 ng/i.p.), 2 vezes ao dia, por 6 dias (figura inferior), e a hiperalgesia mecânica foi avaliada até o término dos tratamentos.

Além de se avaliar o efeito do precursor 17(R)HDoHE e da resolvina AT-RvD1 durante o período inflamatório agudo da artrite, o potencial terapêutico do precursor 17(R)HDoHE (300, 600 ou 900 ng/i.p.) foi avaliado nas fases sub-crônica (14 dias) e crônica (30 dias) após a indução de AIA. Nestes períodos, a dor inflamatória induzida por AIA se caracteriza em decorrência do quadro inflamatório articular já estabelecido (Figura 7).

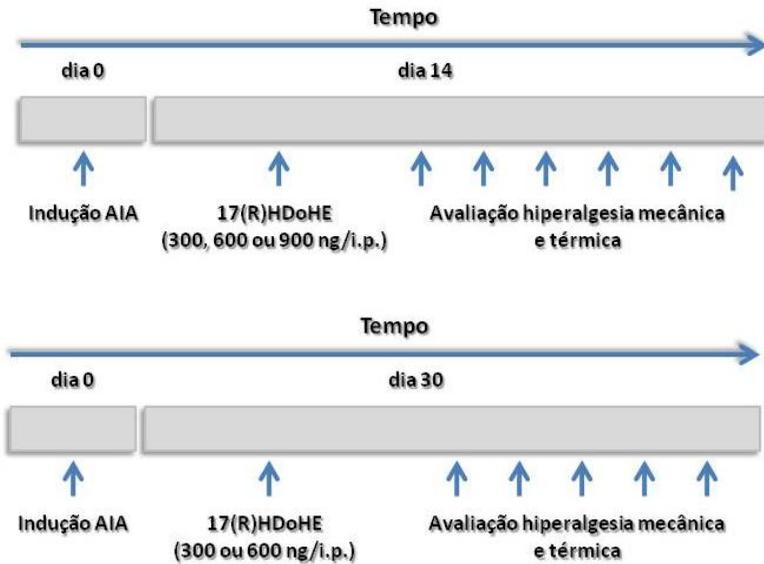


Figura 7. Protocolo de tratamento terapêutico com 17(R)HDoHE no processo inflamatório articular sub-crônico e crônico. 14 dias (figura superior) ou 30 dias (figura inferior) após a indução da artrite induzida por adjuvante (AIA), os animais receberam uma injeção intraperitoneal (i.p.) do precursor de resolvinas da série D 17(R)HDoHE (300 ng/i.p.) e a hiperalgesia mecânica foi avaliada entre 0,5 e 24 h após o tratamento.

Ademais, o potencial anti-hiperalgésico do precursor 17(R)HDoHE foi comparado com o efeito do tratamento com drogas clássicas utilizadas na clínica, como a indometacina, um inibidor não seletivo das enzimas ciclooxigenases (COXs); a morfina, uma droga analgésica opióide; a gabapentina, uma droga anti-epilética; e a dexametasona, um glicocorticóide (Figura 8).

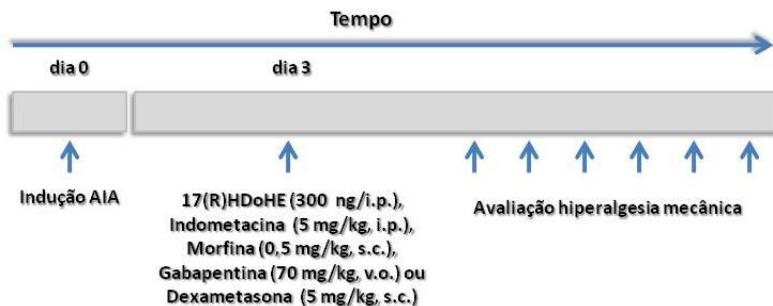


Figura 8. Protocolo de tratamento terapêutico com o precursor 17(R)HDoHE e com drogas clássicas. Diferentes grupos de animais foram tratados com o precursor 17(R)HDoHE (300 ng/i.p.), indometacina (5 mg/kg, i.p.), morfina (0,5 mg/kg, s.c.), gabapentina (70 mg/kg, v.o.), dexametasona (5 mg/kg, s.c.) ou veículo e a hiperalgesia mecânica foi avaliada frente ao estímulo mecânico. Todas as drogas foram administradas 3 dias após a indução de AIA, 1h antes da avaliação do comportamento nociceptivo, com exceção da dexametasona, a qual foi administrada 4 h antes da avaliação comportamental.

Em todos os protocolos experimentais, o grupo controle foi considerado o grupo de animais com AIA sem nenhum tipo de tratamento adicional.

3.9. Drogas e Reagentes

O precursor de resolvinas da série D 17(R)HDoHE [ácido 17(R)-hidróxi-4Z,7Z,10Z,13Z,15E,17R,19Z-docosahexaenóico] e a resolvina D1 formada na presença da aspirina AT-RvD1 (ácido 7S,8R,17R-trihidróxi-4Z,9E,11E,13Z,15E,19Z-docosahexaenóico) foram obtidos da Cayman Chemicals (Ann Arbor, E.U.A.). O Adjuvante Completo de Freund (CFA), dexametasona, indometacina, gabapentina, peróxido de hidrogênio, tetrametilbenzidina (TMB), Tween-20, Tween-80, parafina, salina tamponada com fosfato (PBS), citrato de sódio, fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), paraformaldeído, leupeptina, aprotinina, ácido etilendiamino tetracético (EDTA) e cloreto de benzetônio foram adquiridos da Sigma Chemical Company (St. Louis, E.U.A.). Anticorpo policlonal anti-COX-2 foi obtido da Cell Signaling Technology (Beverly, E.U.A.). Anticorpo policlonal anti-p-p65 NF-κB foi obtido da Santa Cruz Biotech. Inc. (Santa Cruz, E.U.A.). Kits Duoset para quantificação dos níveis de TNF-α e IL-1β foram adquiridos da R&D Systems (Minneapolis, E.U.A.). Morfina foi obtida da Merck AG

(Darmstadt, Alemanha). Cloreto de sódio (NaCl), fosfato de sódio (NaPO₄) e solução de hematoxilina de Harris foram adquiridos da Merck & Co. (Whitehouse Station, E.U.A). Acetona, xilol, álcool etílico e álcool metílico foram adquiridos da LabSynth (Diadema, Brasil). Ácido cítrico e citrato de sódio foram adquiridos da Merck Brasil (São Paulo, Brasil). Hidrato de cloral foi adquirido da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). 3,3'-diaminobenzidina (DAB) e peroxidase streptavidina-biotina foram obtidos da Dako Cytomation (Glostrup, Dinamarca). Primers e sondas para COX-2, NF-κB e β-actina de ratos foram adquiridos da Applied Biosystems (Warrington, Reino Unido).

A maioria das drogas, exceto indometacina, foi diluída em solução de NaCl 0,9% (p/v) (salina) antes do uso. A indometacina foi diluída em solução contendo 5% de carbonato de sódio. Os animais do grupo controle receberam o veículo correspondente ao protocolo experimental empregado.

3.10. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M.) de 5-6 animais. Os dados comportamentais foram analisados através da análise de variância de 2 vias (ANOVA de 2 vias) com medida repetida, seguido pelo teste post hoc de Bonferroni. O teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis foi empregado para análise dos parâmetros numéricos (escore de rigidez articular). Para os dados obtidos no teste de ELISA, reação de imunoistoquímica e PCR em tempo real, foi utilizada a análise de variância de 1 via (ANOVA de 1 via), seguido pelo teste post hoc de Bonferroni para se determinar diferenças entre os grupos. O nível de significância aceito para os testes foi de $P < 0,05$. Todas as análises foram realizadas com o auxílio o software GraphPad® 4 (E.U.A.).

4. RESULTADOS

4.1. Influência do tratamento preventivo com o precursor de resolvinas da série D, 17(R)HDoHE, sobre a hiperalgesia inflamatória no modelo de artrite induzida por adjuvante (AIA) em ratos

O modelo de artrite induzida por adjuvante (AIA) é um dos modelos animais mais utilizados para se avaliar a eficácia pré-clínica de novos agentes em potencial para o tratamento da artrite (JOE e WILDER, 1999; HEGEN et al., 2008). Com o objetivo de se avaliar o potencial do precursor de resolvinas da série D, 17(R)HDoHE, em prevenir o desenvolvimento da hiperalgesia mecânica e térmica induzida por AIA, os ratos foram pré-tratados intraperitonealmente (i.p.) com 17(R)HDoHE (300 ng/sítio) 30 min antes da indução de AIA. Devido ao fato de nenhum trabalho ter avaliado, até o presente momento, o efeito sistêmico do precursor de resolvinas da série D, a escolha da dose foi feita baseando-se em dados anteriores da literatura que trabalhou com doses sistêmicas de outras resolvinas em rato (DORNELLES et al., 2009). No presente estudo, a administração intraplantar da emulsão CFA:PBS na pata direita traseira resultou no aumento evidente da hiperalgesia mecânica na pata ipsilateral (Figura 9A), podendo ser observada 1 h após a indução de AIA. De modo interessante, o pré-tratamento sistêmico com o precursor 17(R)HDoHE resultou em diminuição da hiperalgesia mecânica na pata ipsilateral 1 h após o tratamento quando comparado ao grupo controle. Além disso, o efeito máximo observado para o precursor foi demonstrado 4 h após o tratamento, sendo que o efeito anti-hiperalgésico durou até a 6ª h (Figuras 9A e C). Com relação à pata contralateral, não foi observado aumento significativo na frequência de resposta de retirada da pata frente ao estímulo mecânico quando avaliado nas primeiras 24 h após a indução de AIA (Figuras 9B e D).

A indução de AIA também resultou em redução significativa da latência de retirada da pata frente ao estímulo térmico (Figura 10). A redução na latência de retirada da pata ipsilateral foi evidente logo 1 h após a indução de AIA e este efeito foi observado por, pelo menos, 24 h após a indução (Figura 10A e C). Diferentemente do resultado observado para a hiperalgesia mecânica, o tratamento com o precursor 17(R)HDoHE (300 ng/i.p., 30 min antes) resultou no aumento significativo na latência de retirada da pata somente 2 h após o tratamento, sendo que este efeito não foi mais observado até o

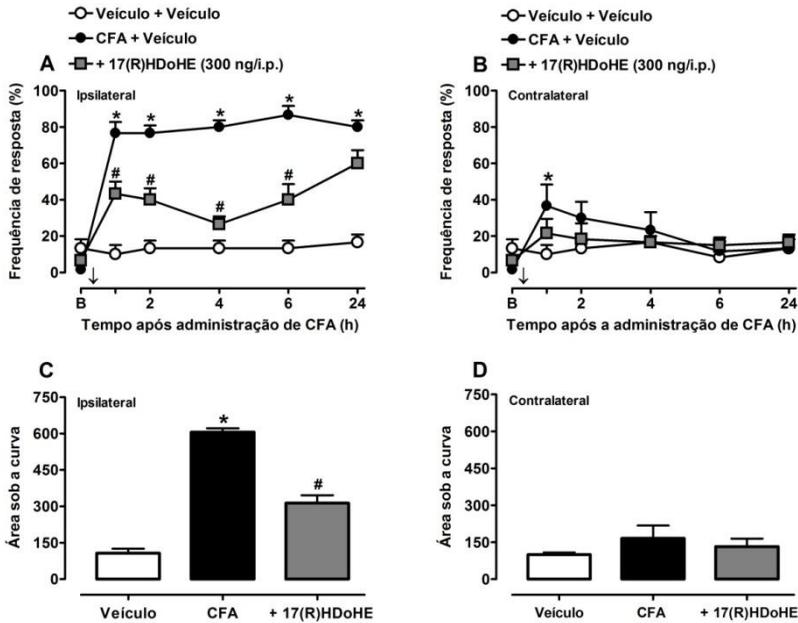


Figura 9. O pré-tratamento com o precursor de resolvinas da série D, 17(R)HDoHE (300 ng/i.p., 30 min antes), preveniu a indução da hiperalgesia mecânica na pata traseira ipsilateral de ratos submetidos à artrite induzida por adjuvante (AIA). (A) e (B) representam a frequência de resposta de retirada da pata frente ao estímulo mecânico como medida representativa da hiperalgesia mecânica nas patas traseiras ipsi- e contralateral, respectivamente, de ratos submetidos à AIA. (C) e (D) representam a área sob a curva obtida da avaliação temporal (1-24 h) da resposta hiperalérgica obtida em (A) e (B), respectivamente. Os resultados estão expressos com média \pm E.P.M. de 5 a 6 animais por grupo. * $P < 0,05$ e # $P < 0,05$ são significativamente diferentes quando comparados ao grupo tratado com veículo e CFA, respectivamente. B = resposta basal. A seta (\downarrow) acima do eixo X representa o tratamento com 17(R)HDoHE.

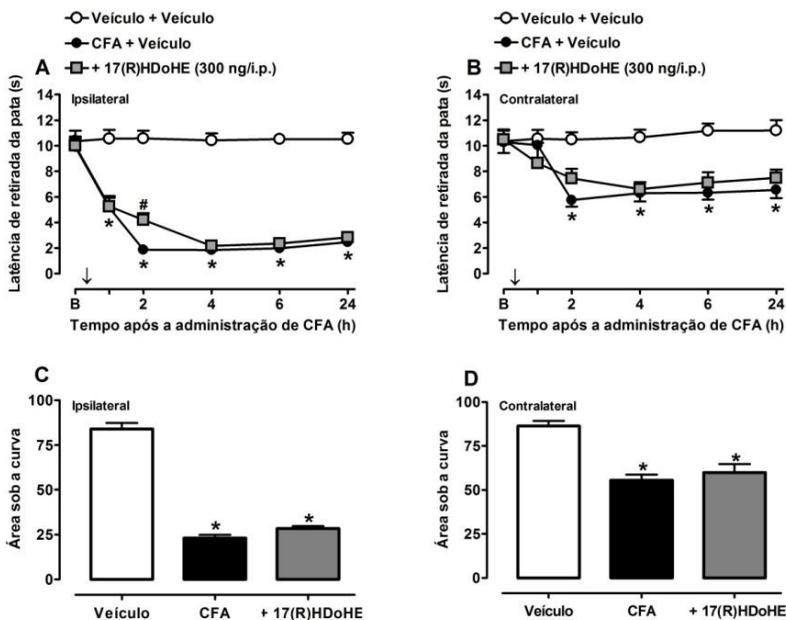


Figura 10. O pré-tratamento com o precursor de resolvinas da série D, 17(R)HD0HE (300 ng/i.p., 30 min antes), preveniu parcialmente a indução da hiperalgesia térmica na pata traseira ipsilateral de ratos submetidos à artrite induzida por adjuvante (AIA). (A) e (B) representam a latência de retirada da pata como medida representativa da hiperalgesia térmica nas patas traseiras ipsi- e contralateral, respectivamente, de ratos submetidos à AIA. (C) e (D) representam a área sob a curva obtida da avaliação temporal (1-24 h) da resposta hiperalgésica obtida em (A) e (B), respectivamente. Os resultados estão expressos com média \pm E.P.M. de 5 a 6 animais por grupo. * $P < 0,05$ e # $P < 0,05$ são significativamente diferentes quando comparados ao grupo tratado com veículo e CFA, respectivamente. B = resposta basal. A seta (\downarrow) acima do eixo X representa o tratamento com 17(R)HD0HE.

término do período da avaliação comportamental (Figura 10A). Ainda, pode ser observada redução significativa na latência de retirada da pata contralateral 2 h após a indução de AIA, efeito esse que foi perdurado por, pelo menos, 24 h (Figuras 10B e D). No entanto, o tratamento com o precursor não resultou no aumento significativo na latência de retirada da pata quando avaliado na pata contralateral (Figuras 10B e D).

4.2. Avaliação do efeito do tratamento terapêutico com o precursor de resolvinas da série D, 17(R)HDoHE, na manutenção da hiperalgesia mecânica e térmica no modelo de artrite induzida por adjuvante (AIA) em ratos

Devido ao fato do precursor de resolvinas da série D 17(R)HDoHE ter sido capaz de prevenir, de maneira significativa, a hiperalgesia mecânica e, ainda que praticamente não interferiu na hiperalgesia térmica induzida por AIA em ratos, em seguida foi avaliado se o precursor também seria capaz de inibir os mesmos parâmetros quando o processo inflamatório já estivesse instalado. Desta forma, 3 dias após a indução de AIA, os ratos foram tratados com uma única dose do precursor 17(R)HDoHE (300 ng/i.p.), e a hiperalgesia mecânica e térmica foram avaliadas como descrito anteriormente. Quando os animais foram avaliados no 3º dia após a indução de AIA, foi observado um aumento significativo da frequência de retirada da pata frente ao estímulo mecânico, comportamento este representativo de hiperalgesia mecânica em resposta ao processo inflamatório agudo (Figura 11A). De modo interessante, o tratamento terapêutico com o precursor 17(R)HDoHE (300 ng/i.p.) inibiu, de maneira significativa, a hiperalgesia mecânica, sendo este efeito observado logo 1 h após o tratamento (Figura 11A). Ainda, foi possível observar que 2 h após o tratamento, a resposta dos animais tratados com o precursor foi similar à resposta dos animais que receberam somente veículo, ou seja, o tratamento com o precursor aboliu a resposta hiperalgésica aguda, sendo que este efeito durou até 12 h após o tratamento (Figura 11A). A análise da área sob a curva obtida entre 1 h e 24 h (Figura 11A) demonstrou uma inibição de aproximadamente 60 % da hiperalgesia mecânica na pata ipsilateral dos animais tratados com 17(R)HDoHE quando comparado com o grupo AIA (Figura 11C). Por outro lado, não foi observada nenhuma resposta hiperalgésica mecânica significativa na pata contralateral quando avaliada 3 dias após a indução da AIA. Além

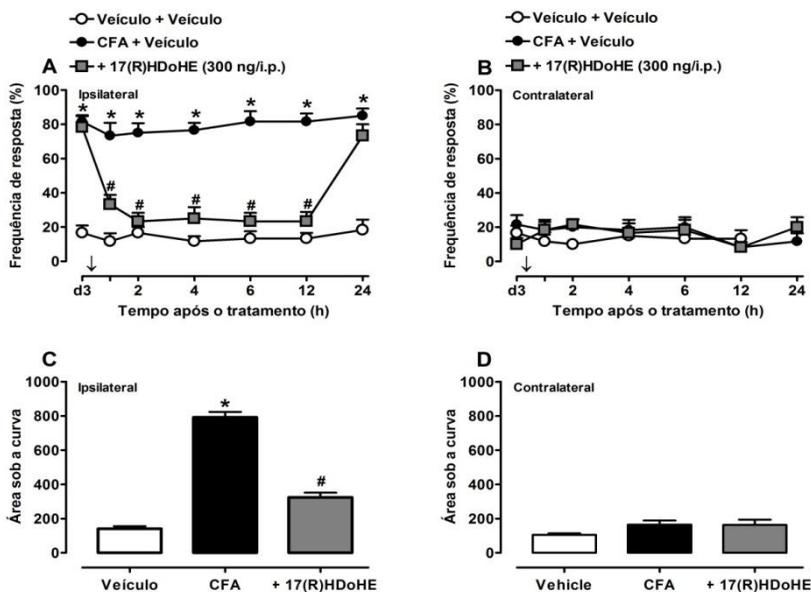


Figura 11. O pós-tratamento com o precursor de resolvinas da série D, 17(R)HD0HE (300 ng/i.p., 3 dias após), inibiu o desenvolvimento da hiperalgesia mecânica na pata traseira ipsilateral de ratos submetidos à artrite induzida por adjuvante (AIA). (A) e (B) representam a frequência de resposta de retirada da pata frente ao estímulo mecânico como medida representativa da hiperalgesia mecânica nas patas traseiras ipsi- e contralateral, respectivamente, de ratos submetidos à AIA. (C) e (D) representam a área sob a curva obtida da avaliação temporal (1-24 h) da resposta hiperalérgica obtida em (A) e (B), respectivamente. Os resultados estão expressos com média \pm E.P.M. de 5 a 6 animais por grupo. * $P < 0,05$ e # $P < 0,05$ indicam diferenças significativas quando comparados ao grupo tratado com veículo e CFA, respectivamente. d3 = 3º dia após a indução de AIA. A seta (\downarrow) acima do eixo X representa o tratamento com 17(R)HD0HE.

disso, o tratamento com 17(R)HDoHE não alterou, de maneira significativa, esta resposta (Figuras 11B e D).

Ademais, o efeito do tratamento local com o precursor 17(R)HDoHE (3, 30 ou 100 ng/i.pl.) na superfície plantar dos animais também foi avaliado 3 dias após a indução de AIA. Ao contrário do tratamento sistêmico, o tratamento local com o precursor de resolvinas da série D resultou em redução parcial da hiperalgesia mecânica apenas nas doses de 30 e 100 ng/i.pl., somente 1 h após o tratamento com o precursor, retornando aos valores observados no grupo controle nos períodos avaliados subsequentemente (Figura 12).

Quando se avaliou a resposta hiperalgésica térmica após a instalação do processo inflamatório em ratos submetidos à AIA, foi observada redução significativa na latência de retirada da pata ipsilateral no 3º dia após a indução (Figura 13A). A análise da área sob a curva obtida a partir do período avaliado entre 1 h e 24 h da resposta comportamental apresentou redução de 42% na latência de retirada da pata ipsilateral de animais submetidos à AIA (Figura 13C). Porém, o tratamento com o precursor 17(R)HDoHE (300 ng/i.p.) não resultou em aumento significativo desta resposta quando comparado aos animais submetidos à AIA (Figura 13A). De modo semelhante, foi observado aumento significativo na hiperalgesia térmica da pata contralateral de animais submetidos à AIA, onde também não foi observada nenhuma diferença significativa no comportamento hiperalgésico dos animais tratados com 17(R)DoHE (300 ng/i.p.) (Figura 13B e D).

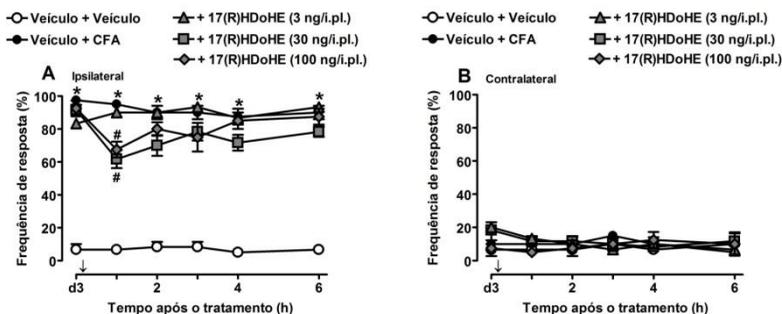


Figura 12. O pós-tratamento local com o precursor de resolvinas da série D, 17(R)HDoHE (3, 30 ou 100 ng/i.pl., 3 dias após), inibiu parcialmente o desenvolvimento da hiperalgesia mecânica na pata traseira ipsilateral de ratos submetidos à artrite induzida por adjuvante (AIA). (A) e (B) representam a frequência de resposta de retirada da pata frente ao estímulo mecânico como medida representativa da hiperalgesia mecânica nas patas traseiras ipsi- e contralateral, respectivamente, de ratos submetidos à AIA. Os resultados estão expressos com média \pm E.P.M. de 5 a 6 animais por grupo. * $P < 0,05$ e # $P < 0,05$ são significativamente diferentes quando comparados ao grupo tratado com veículo e CFA, respectivamente. d3 = 3º dia após a indução de AIA. A seta (\downarrow) acima do eixo X representa o tratamento com 17(R)HDoHE.

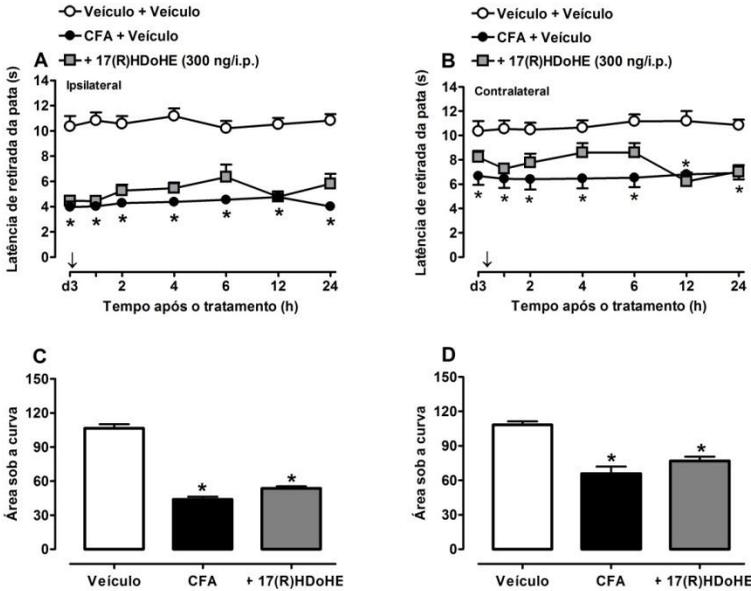


Figura 13. O pós-tratamento com o precursor de resolvinas da série D, 17(R)HDoHE (300 ng/i.p., 3 dias após), não inibiu o desenvolvimento da hiperalgesia térmica na pata traseira ipsilateral de ratos submetidos à artrite induzida por adjuvante (AIA). (A) e (B) representam a latência de retirada da pata como medida representativa da hiperalgesia térmica nas patas traseiras ipsi- e contralateral, respectivamente, de ratos submetidos à AIA. (C) e (D) representam a área sob a curva obtida da avaliação temporal (1-24 h) da resposta hiperalgésica obtida em (A) e (B), respectivamente. Os resultados estão expressos com média \pm E.P.M. de 5 a 6 animais por grupo. * $P < 0,05$ é significativamente diferente quando comparados ao grupo tratado com veículo. d3 = 3º dia após a indução de AIA. A seta (\downarrow) acima do eixo X representa o tratamento com 17(R)HDoHE.

4.3. Determinação do efeito do tratamento terapêutico com a resolvina formada na presença da aspirina, AT-RvD1, no desenvolvimento da hiperalgesia mecânica avaliada no modelo de artrite induzida por adjuvante (AIA) em ratos

A resolvina D1 formada na presença da aspirina, AT-RvD1, é um membro da classe das resolvinas da série D, sendo formada a partir do metabolismo do precursor 17(R)HDoHE (SERHAN et al., 2002). Assim, o próximo objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial da resolvina AT-RvD1 em inibir o desenvolvimento da hiperalgesia mecânica quando o processo inflamatório já estivesse instalado, isto é, no 3º dia após a indução da artrite. Os dados da figura 14A mostram que um único tratamento com a resolvina AT-RvD1 (100 ou 300 ng/i.p.) reduziu significativamente a hiperalgesia mecânica logo na 1ª h (dose de 300 ng/i.p.) e 2ª h (100 e 300 ng/i.p.) após o tratamento, sendo que o efeito observado para as duas doses usadas permaneceu até a 6ª h após os tratamentos (Figura 14A). No entanto, não foi observada diferença significativa no perfil de resposta obtido frente às diferentes doses de AT-RvD1 testadas. A análise da área sob a curva demonstrou que a AT-RvD1, nas doses de 100 e 300 ng/i.p., resultou em inibição de 26 e 33%, respectivamente, da hiperalgesia mecânica (Figura 14B).

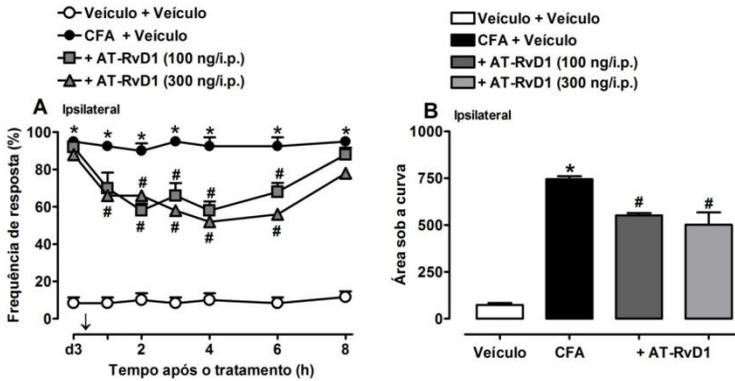


Figura 14. O pós-tratamento com a resolvina formada na presença da aspirina, AT-RvD1, (100 ou 300 ng/i.p., 3 dias após), reduziu o desenvolvimento da hiperalgisia mecânica na pata traseira ipsilateral de ratos com artrite induzida por adjuvante (AIA). **(A)** representa a frequência de resposta de retirada da pata frente ao estímulo mecânico como medida representativa da hiperalgisia mecânica na pata traseira ipsilateral de ratos submetidos à AIA. **(B)** representa a área sob a curva obtida da avaliação temporal (1-8 h) da resposta hiperalgésica obtida em **(A)**. Os resultados estão expressos com média \pm E.P.M. de 4 a 6 animais por grupo. * $P < 0,05$ e # $P < 0,05$ são indicam diferença significativa quando comparados ao grupo tratado com veículo e CFA, respectivamente. d3 = 3º dia após a indução de AIA. A seta (\downarrow) acima do eixo X representa o tratamento com AT-RvD1.

4.4. Avaliação do efeito do tratamento terapêutico repetido com o precursor 17(R)HDoHE e com a resolvina AT-RvD1 na hiperalgesia mecânica no modelo de artrite induzida por adjuvante (AIA) em ratos

A seguir, foi avaliado se o tratamento repetido sistêmico com o precursor 17(R)HDoHE ou com a AT-RvD1 resultaria em uma diminuição da hiperalgesia mecânica quando iniciado 3 dias após a indução da artrite. Na figura 15A pode-se observar que o tratamento sistêmico com o precursor 17(R)HDoHE (300 ng/i.p., por 5 dias, 1 vez ao dia, 3 dias após a indução) inibiu, de maneira significativa, a hiperalgesia mecânica induzida por AIA quando avaliada após a administração de uma única dose do precursor.

De forma interessante, após a segunda dose de 17(R)HDoHE, também foi observada inibição significativa da hiperalgesia mecânica, sendo que os valores observados para os animais tratados atingiram valores similares aos do grupo que recebeu apenas o veículo (Figura 15A). Além disso, a avaliação da reposta hiperalgéscica nociceptiva após cada administração do precursor mostrou sempre uma redução desta resposta. Adicionalmente, analisando-se a área sob a curva obtida a partir do gráfico da figura 15A, observa-se uma inibição de 49% da hiperalgesia mecânica quando os animais foram tratados com o precursor 17(R)HDoHE (300 ng/i.p.; por 5 dias, 1 vez ao dia) em comparação ao grupo tratado com CFA (Figura 15B).

No tratamento repetido com um dos produtos finais da metabolização do precursor, a AT-RvD1 (100 ng/i.p.; por 4 dias, 2 vezes ao dia, 3 dias após a indução), verificou-se que o tratamento com a resolvina AT-RvD1 houve redução significativa da hiperalgesia mecânica quando avaliada 3 dias após a indução da artrite (AIA), (Figura 16A). A análise da área sob a curva obtida a partir do gráfico representado na figura 16A permite observar inibição de 34% da resposta hiperalgéscica mecânica após o tratamento repetido com AT-RvD1 (Figura 16B).

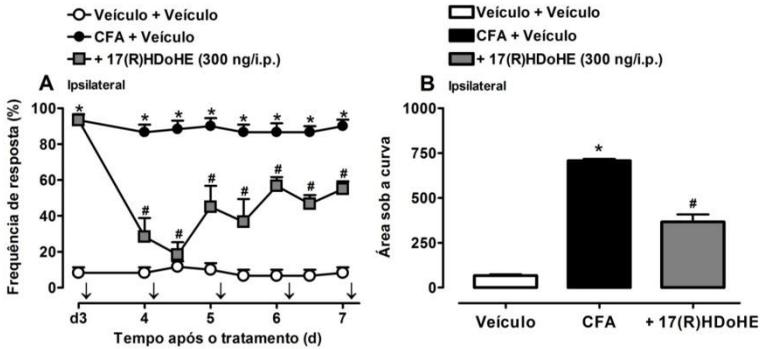


Figura 15. O tratamento repetido com o precursor de resolvinas da série D, 17(R)HDoHE (300 ng/i.p., por 5 dias, 1 vez ao dia, 3 dias após), reduziu parcialmente a hiperalgesia mecânica (A) na pata ipsilateral de ratos com artrite-induzida por adjuvante (AIA). (B) representa a área sob a curva obtida da avaliação temporal (3-7 d) da resposta hiperalgésica obtida em (A). Os resultados estão apresentados como média \pm E.P.M. de 4 a 6 animais por grupo. * $P < 0,05$ e # $P < 0,05$ indicam diferenças significativas quando comparado ao grupo veículo e CFA, respectivamente. d3 = 3º dia após a indução de AIA. A seta (\downarrow) acima do eixo X representa o tratamento com 17(R)HDoHE.

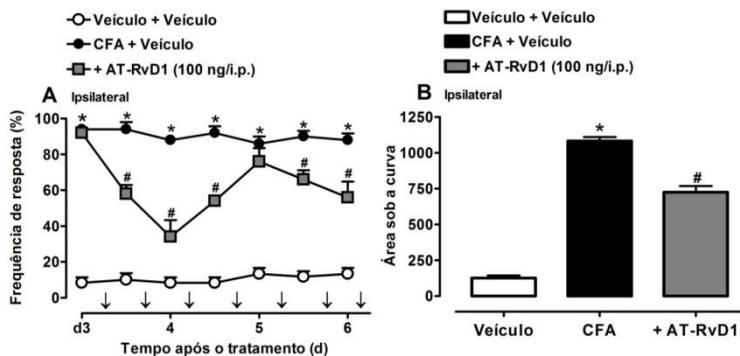


Figura 16. O tratamento repetido com a resolvin formada na presença da aspirina, AT-RvD1 (100 ng/i.p., por 4 dias, 2 vezes ao dia, 3 dias após a indução), reduziu parcialmente a hiperalgesia mecânica (**A**) na pata ipsilateral de ratos com artrite-induzida por adjuvante (AIA). (**B**) representa a área sob a curva obtida da avaliação temporal (3-6 d) da reposta hiperalgésica obtida em (**A**). Os resultados estão apresentados como média \pm E.P.M. de 4 a 6 animais por grupo. * $P < 0,05$ e # $P < 0,05$ são significativamente diferentes quando comparado ao grupo veículo e CFA, respectivamente. d3 = 3º dia após a indução de AIA. As setas (\downarrow) acima do eixo X representam o tratamento com AT-RvD1.

4.5. Efeito do pós-tratamento com o precursor de resolvinas da série D, 17(R)HDoHE, na manutenção da hiperalgesia mecânica e térmica em um período sub-crônico do modelo de artrite induzida por adjuvante (AIA) em ratos

Tendo em vista que pacientes com artrite que procuram atendimento médico já se encontram em estágio avançado da doença, a qual se caracteriza basicamente por rigidez articular e intensa dor, mesmo quando em repouso, foi avaliado se o tratamento sistêmico com o precursor 17(R)HDoHE também poderia inibir a hiperalgesia mecânica e térmica em um quadro sub-crônico de dor inflamatória induzida por AIA em ratos. Desta forma, os animais foram tratados com o precursor 17(R)HDoHE 14 dias após a indução de AIA, período o qual os animais já apresentam sinais de inflamação sistêmica das articulações tíbio-tarsal (articulação do tornozelo) (p.ex.: rigidez articular e edema de pata), em ambas as patas traseiras ipsi- e contralateral, sendo estes parâmetros relacionados ao desenvolvimento da artrite.

Nestas condições, 14 dias após a indução de AIA, os animais foram tratados uma única vez com o precursor 17(R)HDoHE, nas doses de 300, 600 ou 900 ng/i.p., e tanto a hiperalgesia mecânica quanto térmica foram avaliadas. Como mostrado na figura 17A, 14 dias após a indução de AIA, os animais ainda apresentam um quadro de hiperalgesia mecânica instalada. Porém, não foi observada qualquer alteração na resposta hiperalgésica mecânica quando os animais foram tratados com a dose de 300 ng/i.p. do precursor 17(R)HDoHE, dose que foi utilizada nos experimentos anteriores. No entanto, quando doses maiores do precursor 17(R)HDoHE foram testadas (600 ou 900 ng/i.p.), foi observado redução significativa da hiperalgesia mecânica 1 h após o tratamento, sendo que este efeito persistiu por até 6 h (Figura 17A).

A maior dose testada do precursor (900 ng/i.p.), apesar de ter inibido significativamente a resposta hiperalgésica, apresentou perfil de resposta similar à dose de 600 ng, não havendo, portanto, diferença estatística entre as duas doses testadas (Figura 17A). A análise da área sob a curva obtida a partir do período avaliado entre 1 e 24 h da resposta comportamental (Figura 17A), permite observar inibição de 43 % e 41% com as doses de 600 e 900 ng/i.p., respectivamente (Figura 17C). Os animais do grupo controle apresentaram menor frequência de resposta frente ao estímulo mecânico aplicado na pata contralateral (Figuras 17B e D). Consequentemente, não foi observada nenhuma diferença

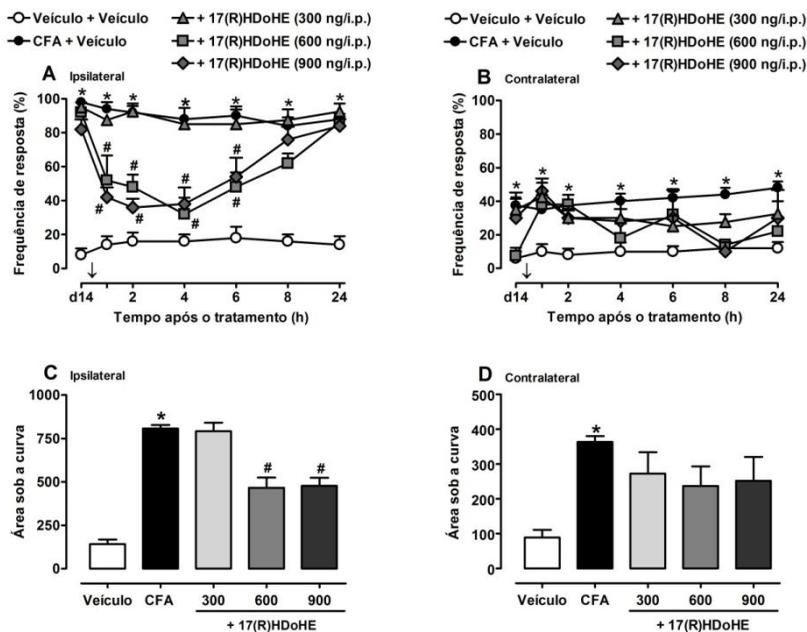


Figura 17. O pós-tratamento com o precursor de resolvinas da série D, 17(R)HD0HE (600 ou 900 ng/i.p., 14 dias após), inibiu o desenvolvimento da hiperalgesia mecânica na pata traseira ipsilateral de ratos submetidos à artrite induzida por adjuvante (AIA). (A) e (B) representam a frequência de resposta de retirada da pata frente ao estímulo mecânico como medida representativa da hiperalgesia mecânica nas patas traseiras ipsi- e contralateral, respectivamente, de ratos submetidos à AIA. (C) e (D) representam a área sob a curva obtida da avaliação temporal (1-24 h) da resposta hiperalgésica obtida em (A) e (B), respectivamente. Os resultados estão expressos com média \pm E.P.M. de 5 a 6 animais por grupo. * $P < 0,05$ e # $P < 0,05$ indicam diferenças significativas quando comparados ao grupo tratado com veículo e CFA, respectivamente. d14 = 14º dia após a indução de AIA. A seta (\downarrow) acima do eixo X representa o tratamento com 17(R)HD0HE.

significativa na resposta hiperalgésica mecânica quando os animais foram tratados com diferentes doses do precursor (Figuras 17B e D).

Embora o tratamento com diferentes doses do precursor 17(R)HDoHE (600 e 900 ng/i.p.) tenha inibido de maneira significativa a hiperalgesia mecânica em um período sub-crônico após a indução de AIA, a resposta hiperalgésica térmica tanto na pata ipsilateral (Figura 18A) quanto na pata contralateral (Figura 18B) não foi alterada de maneira significativa por nenhuma das doses testadas. Apesar da análise da resposta ao estímulo térmico ter sido feita 1, 2 e 4 h após o tratamento com o precursor, optou-se por demonstrar somente os resultados obtidos na quarta hora, visto que não houve diferença significativa entre os outros períodos avaliados e para melhor visualização e representação dos dados.

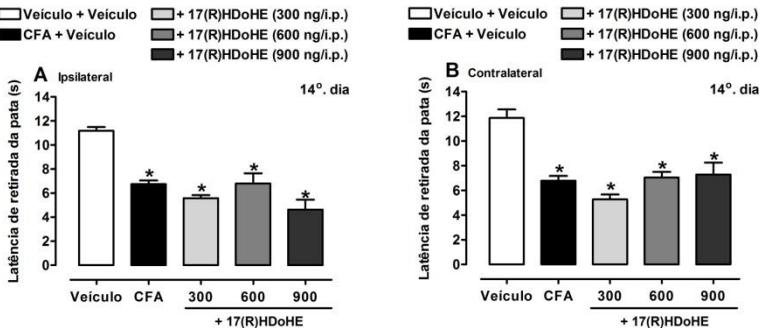


Figura 18. O pós-tratamento com o precursor de resolvinas da série D, 17(R)HDoHE (300, 600 ou 900 ng/i.p., 14 dias após), não inibiu o desenvolvimento da hiperalgesia térmica na pata traseira ipsilateral de ratos submetidos à artrite induzida por adjuvante (AIA). (A) e (B) representam a latência de retirada da pata ipsi- e contralateral, respectivamente, de ratos submetidos à AIA. Os valores representados no gráfico foram obtidos 4 h após o tratamento com 17(R)HDoHE. Os resultados estão expressos com média \pm E.P.M. de 5 a 6 animais por grupo. * $P < 0,05$ difere significativamente quando comparado ao grupo tratado com veículo.

4.6. Verificação do efeito do pós-tratamento com o precursor de resolvinas da série D, 17(R)HDoHE, na manutenção da hiperalgesia mecânica e térmica em um período crônico no modelo de artrite induzida por adjuvante (AIA) em ratos

Em seguida, foi avaliado se o tratamento com o precursor 17(R)HDoHE poderia inibir a resposta hiperalgésica mecânica e térmica em um período crônico após a indução de AIA. Desta forma, 30 dias após a indução de AIA, os animais foram avaliados quanto à resposta hiperalgésica mecânica e térmica. Como pode ser observado na figura 19, os animais ainda apresentavam resposta frente ao estímulo mecânico mesmo 30 dias após a indução de AIA. Porém, o tratamento com 17(R)HDoHE nas doses de 300 e 600 ng/i.p. não inibiu de maneira significativa esta resposta tanto na pata ipsilateral (Figura 19A) quanto na pata contralateral (Figura 19B).

Com relação à hiperalgesia térmica, 30 dias após a indução de AIA, os animais também apresentavam redução de 30% no tempo de latência de retirada da pata ipsilateral (Figura 20A) e de 44% da pata contralateral (Figura 20B). Porém, assim como observado na resposta hiperalgésica mecânica avaliada 30 dias após a indução de AIA, a hiperalgesia térmica não foi alterada de maneira significativa pelo tratamento com o precursor 17(R)HDoHE em nenhuma das doses testadas (300 ng e 600 ng/i.p.) (Figuras 20A e B). No entanto, especula-se que a utilização de doses maiores ou a adoção do protocolo de tratamento repetido poderia apresentar algum efeito no período crônico da artrite induzida por adjuvante.

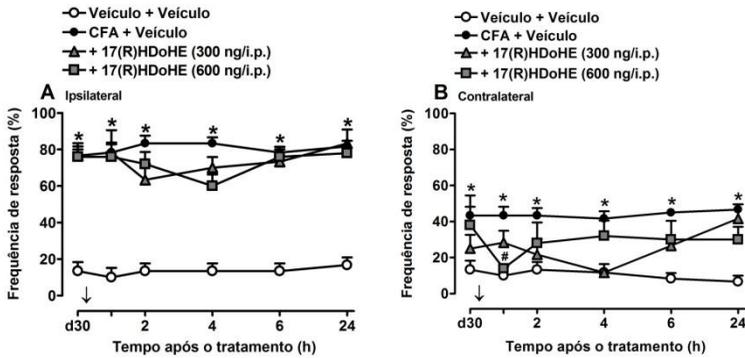


Figura 19. O pós-tratamento com o precursor de resolvinas da série D, 17(R)HDoHE (300 ou 600 ng/i.p., 30 dias após), não inibiu o desenvolvimento da hiperalgesia mecânica em ratos submetidos à artrite induzida por adjuvante (AIA). (A) e (B) representam a frequência de resposta de retirada da pata frente ao estímulo mecânico como medida representativa da hiperalgesia mecânica nas patas traseiras ipsi- e contralateral, respectivamente, de ratos submetidos à AIA. Os resultados estão expressos com média \pm E.P.M. de 5 a 6 animais por grupo. * $P < 0,05$ difere significativamente quando comparado ao grupo tratado com veículo. D30 = 30º dia após a indução de AIA. A seta (\downarrow) acima do eixo X representa o tratamento com 17(R)HDoHE.

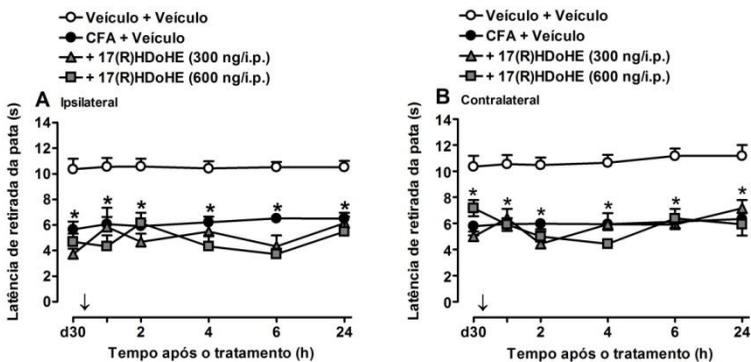


Figura 20. O pós-tratamento com o precursor de resolvinas da série D, 17(R)HDoHE (300 ou 600 ng/i.p., 30 dias após a indução de AIA), não inibiu o desenvolvimento da hiperalgesia térmica em ratos submetidos à artrite induzida por adjuvante (AIA). (A) e (B) representam a latência de retirada da pata ipsi- e contralateral, respectivamente, de ratos submetidos à AIA. Os resultados estão expressos com média \pm E.P.M. de 5 a 6 animais por grupo. * $P < 0,05$ é significativamente diferente quando comparado ao grupo tratado com veículo. D30 = 30º dia após a indução de AIA. A seta (\downarrow) acima do eixo X representa o tratamento com 17(R)HDoHE.

4.7. Comparação do potencial anti-hiperalgésico do precursor 17(R)HDoHE com drogas clássicas utilizadas na clínica sobre a hiperalgesia mecânica no modelo de artrite induzida por adjuvante (AIA) em ratos

A fim de comparar o efeito do pós-tratamento com o precursor de resolvinas da série D, 17(R)DoHE, com drogas clássicas utilizadas na clínica para o tratamento da dor, os animais foram tratados, 3 dias após a indução de AIA, com uma única dose do precursor 17(R)HDoHE (300 ng/i.p.), ou com indometacina (5 mg/kg, i.p.), um inibidor não seletivo das enzimas ciclooxigenases (COXs); morfina (0,5 mg/kg, s.c.), uma droga analgésica opióide; gabapentina (70 mg/kg, v.o.), uma droga anti-epilética; ou com dexametasona (5 mg/kg, s.c.), um glicocorticóide.

A indução de artrite induzida por adjuvante (AIA), como demonstrado anteriormente, promoveu redução significativa no limiar mecânico nociceptivo (Tabela 1), sendo este efeito revertido pelo pós-tratamento com o precursor 17(R)HDoHE, observando-se uma inibição da resposta hiperalgésica de 72% (Tabela 1).

Considerando o tratamento com as outras drogas, como a indometacina, a morfina e a gabapentina, observou-se uma redução parcial da hiperalgesia mecânica, sendo que as porcentagens de inibição obtidas foram de 35%, 34% e 42%, respectivamente (Tabela 1). Por outro lado, o tratamento com dexametasona (5 mg/kg, s.c.) resultou em uma redução moderada, mas não estatisticamente significativa (12%) da hiperalgesia mecânica induzida pelo modelo de artrite induzida por adjuvante (AIA) (Tabela 1).

Tabela 1

Comparação do efeito anti-hiperalgésico do precursor de resolvinas da série D, 17(R)HDoHE, com diferentes classes de drogas utilizadas na clínica no modelo de artrite induzida por adjuvante em ratos.

Droga	Mecanismo de ação	Dose	Inibição (%)^a
17(R)HDoHE	_____	300 ng/i.p	72 ± 3*
Indometacina	Inibidor de ciclooxigenases	5 mg/kg (i.p.)	35 ± 5*
Morfina	Analgésico opióide	0,5 mg/kg (s.c.)	34 ± 4*
Gabapentina	Anti-epiléptico	70 mg/kg (v.o.)	42 ± 4*
Dexametasona	Glicocorticóide	5 mg/kg (s.c.)	12 ± 3

* Representa diferenças significativas em comparação com o grupo tratado com CFA (*P < 0,05).

^a Média ± E.P.M. (n = 5-6 ratos/grupo). A porcentagem de inibição está representada como a diferença (em porcentagem) entre as médias da área sob a curva tempo-resposta (valores da área sob a curva de 1–6 h) das respostas obtidas no grupo tratado com as drogas e em relação ao grupo tratado com CFA. Todas as drogas foram administradas no 3º dia após a indução da artrite induzida por adjuvante. 17(R)HDoHE, indometacina, morfina e gabapentina foram administradas 1 h antes e a dexametasona 4 h antes da avaliação da resposta nociceptiva.

4.8. Efeito do pós-tratamento com o precursor de resolvinas da série D, 17(R)HDoHE, no desenvolvimento dos sinais clínicos da artrite induzida por adjuvante (AIA) em ratos

Além de ter sido avaliado o potencial do precursor de resolvinas 17(R)HDoHE em inibir a hiperalgesia mecânica e térmica em diferentes períodos antes e após a indução de AIA, os parâmetros relacionados à artrite, tais como edema de pata, edema articular (articulação tíbio-tarsal) e rigidez articular, também foram avaliados. Assim, os animais foram tratados com 17(R)HDoHE (300 ng/i.p.) 30 min antes, 3 dias e 30 dias após a indução de AIA. No entanto, apesar de ser evidente um aumento significativo nos 3 parâmetros avaliados, não foi possível observar diferença significativa nos valores obtidos para os animais tratados com o precursor 17(R)HDoHE quando comparados com o grupo AIA utilizando-se o protocolo de tratamento com 17(R)HDoHE proposto acima (Figura 21).

Desta forma, outro protocolo de tratamento foi realizado, onde os animais foram tratados com o precursor 17(R)HDoHE (300 ng/i.p.) por 6 dias consecutivos, sendo que o tratamento iniciou no 14º dia após a indução de AIA, tendo em vista que, como mencionado anteriormente, neste período os animais apresentam sinais de inflamação articular nas patas traseiras ipsi- e contralateral. Como demonstrado na figura 22, a indução deste modelo experimental de artrite resulta no aumento progressivo do escore de rigidez articular no decorrer dos dias, sendo que a partir do 7º dia houve diferença estatisticamente significativa nos valores obtidos para os animais com AIA quando comparado ao grupo que recebeu veículo (Figura 22A). Quanto à rigidez articular na pata contralateral, observa-se o aumento neste parâmetro a partir do 12º dia, porém sem diferença significativa entre os grupos avaliados (Figura 22B).

Ainda, foi observado aumento significativo do edema na pata ipsilateral já no 1º dia após a indução de AIA, permanecendo elevado até o último dia do estudo (20º dia) (Figura 22C). No entanto, com relação à pata contralateral, observa-se pequeno aumento do edema a partir do 12º dia, porém não significativo (Figura 22D). Adicionalmente, observou-se aumento significativo no edema articular da pata ipsilateral no 2º dia após a indução de AIA, sendo que este parâmetro também permaneceu elevado até o término da avaliação (Figura 22E). Valores transitórios deste parâmetro foram observados na pata contralateral de animais com AIA, não havendo, contudo, diferença estatística entre os grupos testados (Figura 22F). De modo interessante, o tratamento

consecutivo por 6 dias com 17(R)HDoHE (300 ng/i.p.) foi efetivo em reduzir significativamente o aumento da rigidez articular a partir do 18º dia (Figura 22A). Entretanto, com esse mesmo tratamento, não foi observada nenhuma alteração significativa do edema de pata e o edema articular em ambas as patas (Figuras 22C a F).

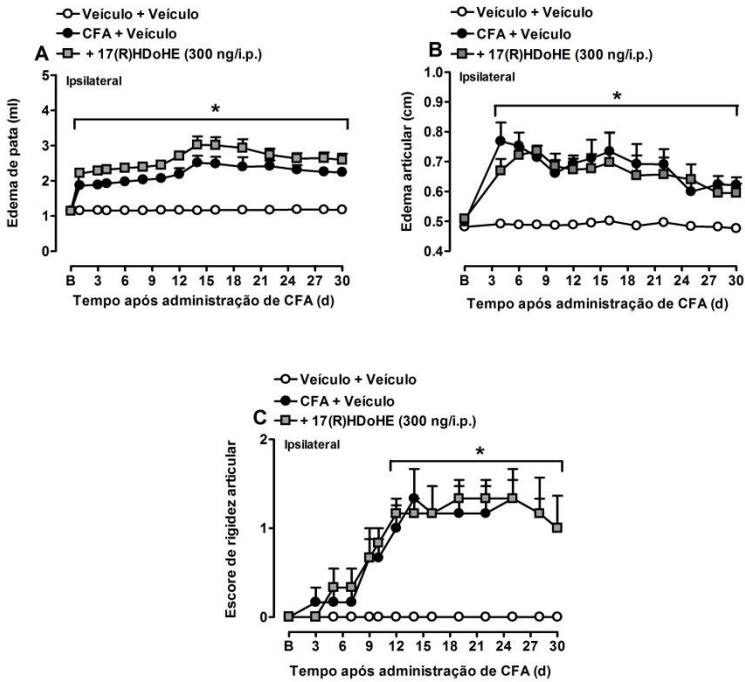


Figura 21. O tratamento com o precursor de resolvinas da série D, 17(R)HDoHE (300 ng/i.p., 30 min antes, 3 e 30 dias após), não alterou o edema de pata (A), edema articular (B) e a rigidez articular (C) na pata ipsilateral de ratos submetidos à artrite induzida por adjuvante (AIA). Os resultados estão expressos com média \pm E.P.M. de 5 a 6 animais por grupo. * $P < 0,05$ difere significativamente quando comparado ao grupo tratado com veículo. B = valor basal.

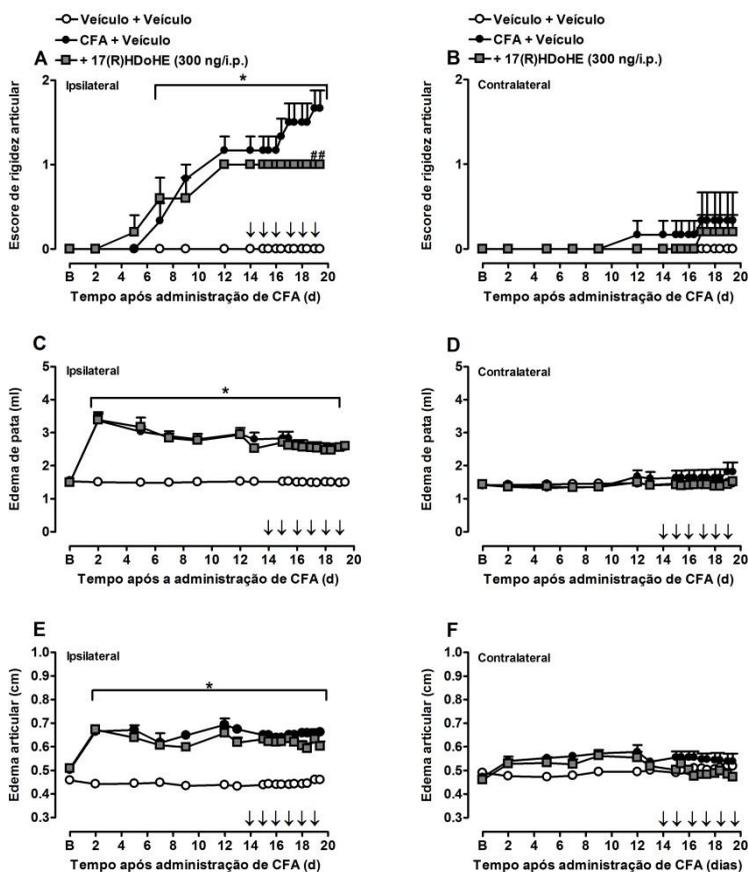


Figura 22. O tratamento repetido com o precursor de resolvinas da série D, 17(R)HDoHE (300 ng/i.p., por 6 dias, 1 vez ao dia, iniciando-se 14 dias após), preveniu o aumento do escore de rigidez articular (A), mas não do edema de pata (C) e do edema articular (E) na pata ipsilateral de ratos com artrite-induzida por adjuvante (AIA). (B), (D) e (F) representam o escore de rigidez articular, o edema de pata e o edema articular, respectivamente, da pata traseira contralateral de ratos com AIA. Os resultados são apresentados como média \pm E.P.M. de 5 a 6 animais por grupo. * $P < 0,05$ e # $P < 0,05$ indicam diferenças significativas quando comparado ao grupo veículo e CFA, respectivamente. B = valor basal. A seta (\downarrow) acima do eixo X representa o tratamento com 17(R)HDoHE.

4.9. Efeito do tratamento terapêutico repetido com o precursor 17(R)HDoHE ou com a resolvina AT-RvD1 sobre os níveis de citocinas pró-inflamatórias na medula espinhal e no tecido da pata de ratos com artrite induzida por adjuvante (AIA)

Com o objetivo de investigar alguns dos mecanismos pelos quais o precursor 17(R)HDoHE e a resolvina AT-RvD1 podem modular a hiperalgesia mecânica induzida pelo modelo de artrite induzida por adjuvante (AIA), tanto a medula espinhal (nível entre lombar 5 e lombar 6 - L5/L6) quanto o tecido plantar da pata traseira ipsilateral foram coletados para a quantificação dos níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β utilizando-se a técnica de ELISA.

Ao término do tratamento repetido com o precursor 17(R)HDoHE (300 ng/i.p.; por 5 dias, 1 vez ao dia) ou com a resolvina AT-RvD1 (100 ng/i.p.; por 4 dias, 2 vezes ao dia), os tecidos foram removidos, imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -70 °C até o momento das análises. Como pode ser observado na Figura 23, o modelo de AIA induziu aumento significativo dos níveis de ambas citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β no tecido plantar da pata traseira ipsilateral. De maneira interessante, o tratamento repetido com o precursor 17(R)HDoHE diminuiu, de maneira significativa, os níveis de TNF- α (Figura 23A) e IL-1 β (Figura 23B) na pata traseira ipsilateral, resultando em uma porcentagem de inibição de 60 e 63%, respectivamente. Entretanto, quando foram avaliados os níveis de ambas as citocinas pró-inflamatórias (Figura 24A) e IL-1 β (Figura 24B) na medula espinhal destes animais, pôde-se observar que a indução de AIA não foi capaz de alterar os níveis destas citocinas, conseqüentemente, também não foi observado diferença significativa quando os animais foram tratados com o precursor 17(R)HDoHE.

O potencial do tratamento repetido com a resolvina AT-RvD1 em modular os níveis tanto da citocina TNF- α quanto da citocina IL-1 β , no tecido da pata e na medula espinhal de ratos com AIA, também foi avaliado. Como ilustrado na Figura 25, o tratamento repetido com a resolvina AT-RvD1 resultou em redução significativa dos níveis de TNF- α (Figura 25A) assim como de IL-1 β (Figura 25B) no tecido da pata traseira ipsilateral de ratos com AIA, observando-se uma redução de 90 e 23%, respectivamente.

Do mesmo modo que o tratamento com o precursor 17(R)HDoHE, o tratamento repetido com AT-RvD1 não alterou de

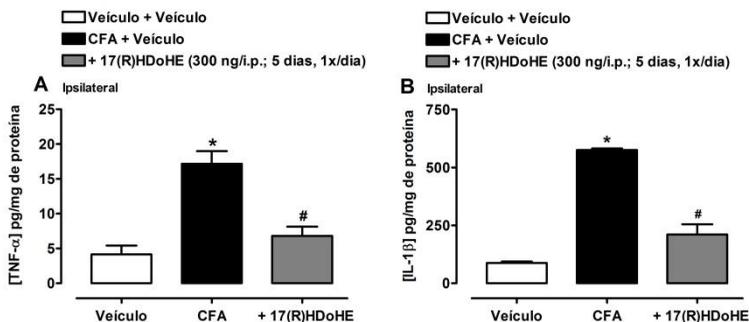


Figura 23. O tratamento repetido com o precursor de resolvinas da série D, 17(R)HDoHE (300 ng/i.p., por 5 dias, 1 vez ao dia, 3 dias após a indução), reduziu os níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF- α (A) e IL-1 β (B) no tecido plantar da pata traseira ipsilateral de ratos com artrite-induzida por adjuvante (AIA). Os resultados estão apresentados como média \pm E.P.M. de 4 a 6 animais por grupo. * $P < 0,05$ e # $P < 0,05$ indicam diferenças significativas quando comparado ao grupo veículo e CFA, respectivamente.

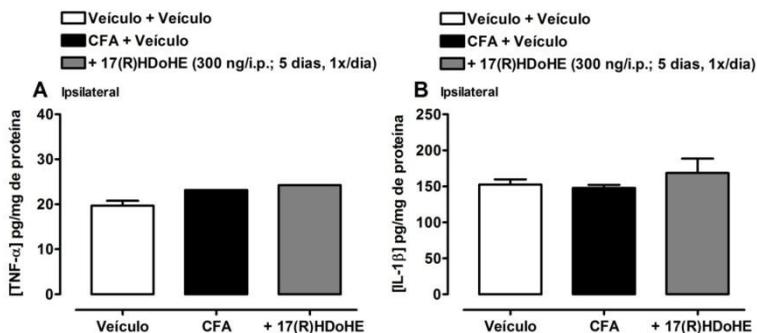


Figura 24. O tratamento repetido com o precursor de resolvinas da série D, 17(R)HDoHE (300 ng/i.p., por 5 dias, 1 vez ao dia, 3 dias após), não alterou os níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF- α (A) e IL-1 β (B) na medula espinhal (nível entre lombar 5 e lombar 6 - L5/L6) de ratos com artrite-induzida por adjuvante (AIA). Os resultados estão apresentados como média \pm E.P.M. de 4 a 6 animais por grupo.

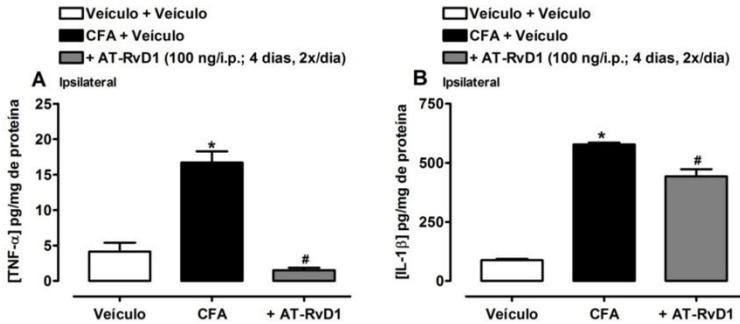


Figura 25. O tratamento repetido com a resolvina formada na presença da aspirina, AT-RvD1, (100 ng/i.p., por 4 dias, 2 vezes ao dia, 3 dias após), reduziu os níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF- α (A) e IL-1 β (B) no tecido plantar da pata traseira ipsilateral de ratos com artrite-induzida por adjuvante (AIA). Os resultados estão apresentados como média \pm E.P.M. de 4 a 6 animais por grupo. * $P < 0,05$ e # $P < 0,05$ indicam diferenças significativas quando comparado ao grupo veículo e CFA, respectivamente.

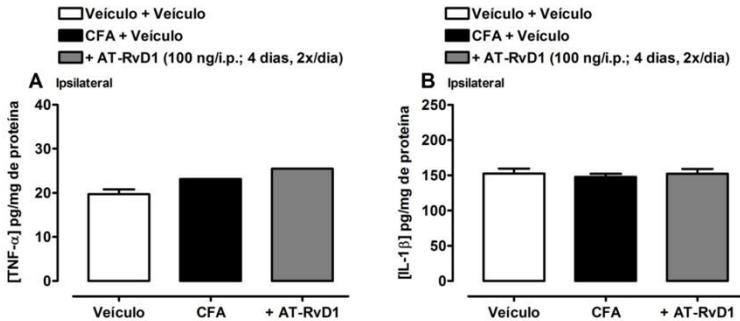


Figura 26. O tratamento repetido com a resolvina formada na presença da aspirina, AT-RvD1, (100 ng/i.p., por 4 dias, 2 vezes ao dia, 3 dias após), não alterou os níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF- α (A) e IL-1 β (B) na medula espinhal (nível entre lombar 5 e lombar 6 - L5/L6) de ratos com artrite-induzida por adjuvante (AIA). Os resultados estão apresentados como média \pm E.P.M. de 4 a 6 animais por grupo.

maneira significativa os níveis de ambas as citocinas na medula espinhal dos animais com AIA (Figura 26).

4.10. Efeito do pós-tratamento com o precursor 17(R)HDoHE sobre a expressão do fator de transcrição NF- κ B e da enzima COX-2 na medula espinhal e no gânglio da raiz dorsal de ratos com artrite induzida por adjuvante (AIA)

A fim de investigar outros mediadores que possam estar envolvidos na mediação dos efeitos anti-hiperalgésicos observados para o precursor 17(R)HDoHE, optou-se pelo ensaio de imunistoquímica como outra abordagem para se avaliar o efeito do precursor sobre a ativação do fator de transcrição NF- κ B e da enzima COX-2 no gânglio da raiz dorsal (GRD; nível entre lombar 4 e lombar 5 - L4-L5), região superficial (lâmina I e II) e região do pescoço (lâmina V e VI) do corno dorsal da medula espinhal.

Na figura 27A estão demonstradas as fotos representativas das imunomarcações para a subunidade p65 fosforilada do fator de transcrição NF- κ B tanto na medula espinhal (painel superior), quanto no GRD (painel inferior). Como esperado, a indução da artrite induzida por adjuvante (AIA) resultou no aumento significativo da fosforilação da subunidade p65 do NF- κ B tanto na região superficial e na região do pescoço do corno dorsal da medula espinhal (Figura 27A painel superior) quanto no GRD (Figura 27A painel inferior).

De modo interessante, o tratamento sistêmico com o precursor 17(R)HDoHE (300 ng/i.p.; 3 dias após) reduziu significativamente a ativação do fator de transcrição NF- κ B na medula espinhal (Figura 27B) e no GRD (Figura 27C), sendo o efeito mais proeminente observado na medula espinhal. Ainda, as porcentagens de inibição observadas para a fosforilação da subunidade p65 foram de 74 e 44% na medula espinhal e no GRD, respectivamente.

Com relação à expressão da enzima COX-2, na figura 28A estão demonstradas as fotos representativas das imunomarcações para COX-2 na medula espinhal (painel superior) e GRD (painel inferior). Semelhante ao que foi observado para a ativação do fator de transcrição NF- κ B na medula espinhal e no GRD, observou-se aumento significativo da expressão de COX-2 em ambos os tecidos (Figuras 28B e 28C). De modo relevante, o tratamento com o precursor 17(R)HDoHE (300 ng/i.p.; 3 dias após) preveniu significativamente o aumento da

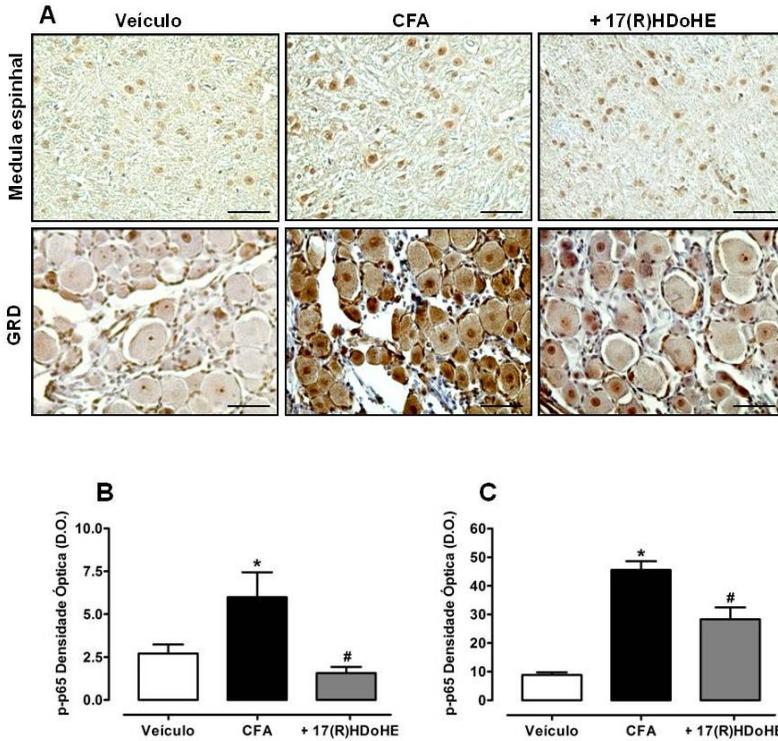


Figura 27. Tratamento único com o precursor de resolvinas da série D, 17(R)HDoHE (300 ng/i.p., 3 dias após), preveniu o aumento da ativação da subunidade p65 do fator de transcrição NF- κ B na medula espinhal (**B**) e no gânglio da raiz dorsal (GRD) (**C**) de ratos com artrite induzida por adjuvante (AIA). (**A**) Imagens representativas da imunoreatividade na medula espinhal (painel superior) e o GRD (painel inferior). Barra da escala = 100 μ m. Os resultados estão apresentados como média \pm E.P.M. de 5-6 animais por grupo. * $P < 0,05$ e # $P < 0,05$ indicam diferenças significativas quando comparados ao grupo veículo e CFA, respectivamente.

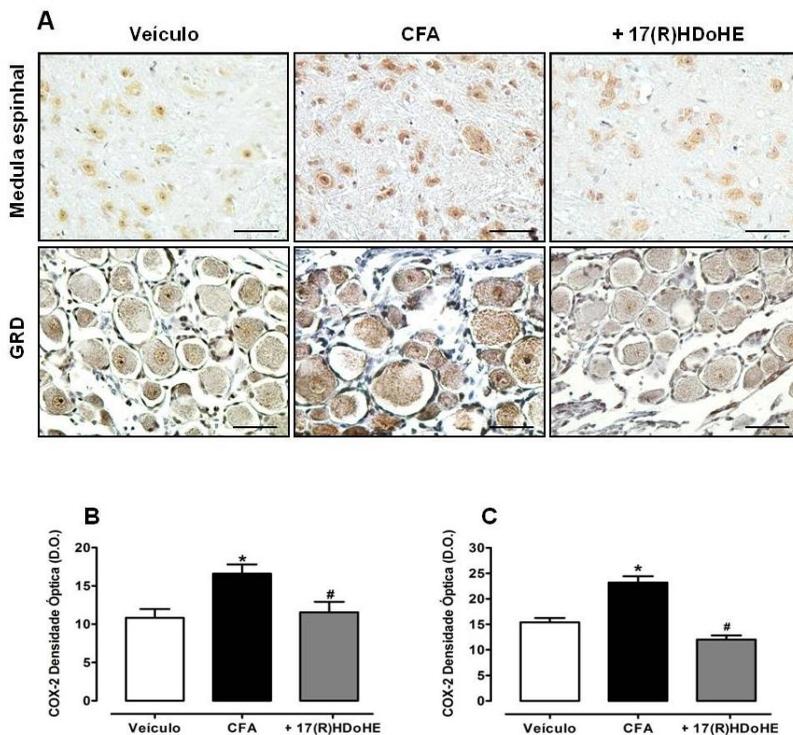


Figura 28. Tratamento único com o precursor de resolvinas da série D, 17(R)HDoHE (300 ng/i.p., 3 dias após), preveniu o aumento da expressão da enzima ciclooxigenase COX-2 na medula espinhal (**B**) e no gânglio da raiz dorsal (GRD) (**C**) de ratos com artrite induzida por adjuvante (AIA). (**A**) Imagens representativas da imunoreatividade na medula espinhal (painel superior) e o GRD (painel inferior). Barra da escala = 100 μ m. Os resultados estão apresentados como média \pm E.P.M. de 5-6 animais por grupo. * $P < 0,05$ e # $P < 0,05$ indicam diferenças significativas quando comparados ao grupo veículo e CFA, respectivamente.

expressão de COX-2, tanto na medula espinhal (Figura 28B), quanto no GRD (Figura 28C). Além disso, as porcentagens de inibição observadas quanto à expressão da enzima COX-2 foram de 68 e 66% na medula espinhal e no GRD, respectivamente.

4.11. Avaliação do efeito do pós-tratamento com o precursor 17(R)HDoHE sobre os níveis de RNAm do fator de transcrição NF- κ B e da enzima COX-2 na medula espinhal e no gânglio da raiz dorsal de ratos com artrite induzida por adjuvante (AIA)

Em adição aos estudos realizados até então, outro grupo de experimentos foi conduzido com o objetivo de avaliar se o precursor 17(R)HDoHE também poderia modular os níveis do RNAm para o NF- κ B e para a COX-2 na medula espinhal e no GRD de ratos com AIA, assim como observado para a expressão de ambas as proteínas, as quais foram detectadas com o auxílio da técnica de imunistoquímica como descrito anteriormente.

Como pode ser observado na figura 29, os níveis do RNAm para o fator de transcrição NF- κ B não foram alterados de maneira significativa em nenhum dos grupos testados, nem na medula espinhal (Figura 29A) nem no GRD (Figura 29B), quando avaliados 3 dias após a indução de AIA. Contudo, quando se avaliou os níveis do RNAm para COX-2 na medula espinhal de animais com AIA, observou-se um aumento expressivo do RNAm para esta proteína, sendo que este aumento foi prevenido de maneira significativa nos animais tratados com 17(R)HDoHE (300 ng/i.p.) (Figura 30A). Considerando ainda os níveis do RNAm para COX-2 no GRD, no entanto, não se observou diferença significativa entre os grupos avaliados (Figura 30B).

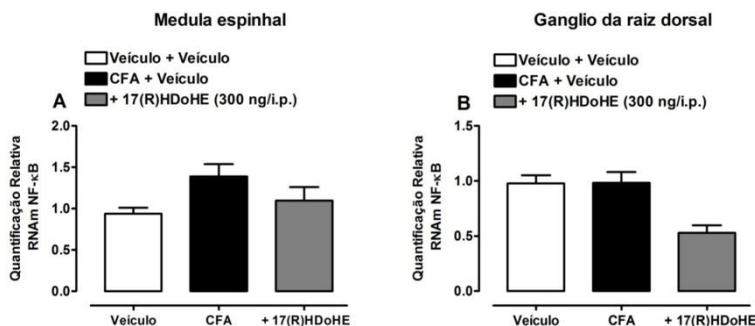


Figura 29. Tratamento único com o precursor de resolvinas da série D, 17(R)HDoHE (300 ng/i.p., 3 dias após), não alterou os níveis de RNAm do fator de transcrição NF-κB na medula espinhal (A) e no gânglio da raiz dorsal (GRD) (B) de ratos com artrite induzida por adjuvante (AIA). A reação da cadeia da polimerase em tempo real (PCR em tempo real) foi realizada em duplicata e o RNAm para β-actina foi utilizada para normalizar a quantidade relativa de RNAm. Os resultados estão apresentados como média ± E.P.M. de 3-5 animais por grupo.

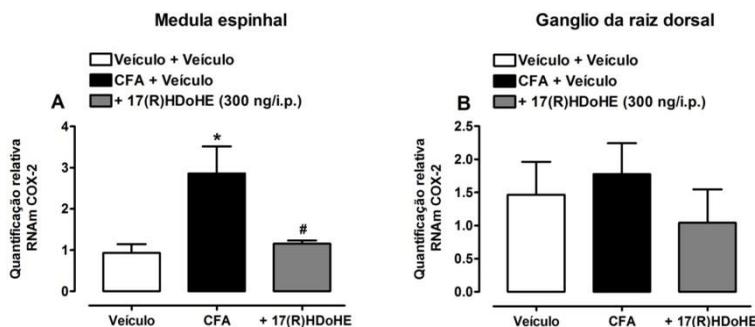


Figura 30. Tratamento único com o precursor de resolvinas da série D, 17(R)HDoHE (300 ng/i.p., 3 dias após), modulou os níveis de RNAm da enzima ciclooxigenase-2 (COX-2) na medula espinhal (A), mas não no gânglio da raiz dorsal (GRD) (B) de ratos com artrite induzida por adjuvante (AIA). A reação da cadeia da polimerase em tempo real (PCR em tempo real) foi realizada em duplicata e o RNAm para β-actina foi utilizada para normalizar a quantidade relativa de RNAm. Os resultados estão apresentados como média ± E.P.M. de 3-5 animais por grupo. * $P < 0,05$ e # $P < 0,05$ indicam diferenças significativas quando comparados ao grupo veículo e grupo CFA, respectivamente.

5. DISCUSSÃO

O incentivo para o consumo de fontes alimentares ricas em ácidos graxos poliinsaturados, como os ácidos graxos ω -3, sempre foi evidenciado em nossa sociedade devido aos diversos benefícios que estes trazem a nossa saúde. No entanto, somente nos últimos anos foram descobertas as bases moleculares pelas quais estes compostos lipídicos promovem, por exemplo, a prevenção do desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Estes ácidos graxos são precursores de mediadores lipídicos envolvidos em diversas vias de sinalização celular, como a via de resolução do processo inflamatório, e, principalmente, naquelas relacionadas a diversas doenças inflamatórias.

Estes mediadores lipídicos foram descritos como lipoxinas, resolvinas, protectinas e maresinas (GILROY et al., 2004; SERHAN et al., 2008), os quais apresentam atividades anti-inflamatórias e pró-resolução, ou seja, apresentam a capacidade de inibir o processo inflamatório e restauram a homeostasia tecidual. Desta forma, a descoberta destes mediadores lipídicos trouxe novas e importantes perspectivas nas terapias que visam à redução do progresso da resposta inflamatória, possibilitando o desenvolvimento de novos tratamentos para diversas doenças inflamatórias crônicas, como a AR (SERHAN et al., 2000, 2002; HONG et al., 2003; GILROY et al., 2004; para revisão ver SERHAN, 2007).

Estudos recentes demonstraram que mediadores lipídicos da classe das resolvinas da série D, os quais são substâncias produzidas ativamente durante a resolução do processo inflamatório, apresentam papel anti-inflamatório quando administrados em diferentes modelos animais, como peritonite, lesão renal induzida por isquemia/reperfusão e colite ulcerativa induzida por DSS (DUFFIELD et al., 2006; SUN et al., 2007). Além disso, poucos estudos até então investigaram o potencial das resolvinas da série D em inibir a hiperalgisia de origem inflamatória (XU et al., 2007; BANG et al., 2010). De maneira interessante, confirmando e estendendo os dados da literatura, os resultados do presente estudo demonstraram que o precursor das resolvinas da série D, 17(R)HDoHE, quando administrado sistemicamente 30 min antes ou 3 dias após a indução do modelo experimental de artrite induzida por adjuvante (AIA) em ratos, resultou em marcada inibição da hiperalgisia mecânica, mas não da hiperalgisia térmica. Neste modelo de artrite, o mecanismo envolvido no desenvolvimento da hiperalgisia mecânica parece ser diferente daquele responsável pela hiperalgisia térmica. De fato, diferentes autores demonstraram o envolvimento dos receptores

AMPA e cainato periféricos no desenvolvimento da hiperalgesia térmica induzida por carragenina, mas não da hiperalgesia mecânica induzida por CFA (JACKSON et al., 1995; LEEM et al., 2001). Ainda, foi observado que a administração de um antagonista peptídico do receptor NMDA, a histogranina, inibiu moderadamente a hiperalgesia mecânica, mas não alterou a hiperalgesia térmica no modelo de dor inflamatória induzida por CFA em ratos (HAMA e SAGEN, 2002). Além disso, outro estudo avaliou o efeito da administração central e periférica de antagonistas do receptor TRPV1 na hiperalgesia térmica e mecânica induzida por CFA em ratos (KANAI et al., 2007). Neste trabalho foi observado que o tratamento intraplantar com os antagonistas de TRPV1, BCTC ou SB-366791, inibiu a hiperalgesia térmica, mas não a hiperalgesia mecânica induzida por CFA. Por outro lado, neste mesmo trabalho foi observada uma redução da hiperalgesia tanto mecânica quanto térmica quando administraram os mesmos antagonistas do receptor TRPV1 por via intratecal (i.t.). Estes dados demonstram que o receptor TRPV1 presente na periferia tem um papel importante na modulação da hiperalgesia térmica, mas não da hiperalgesia mecânica, e que a modulação deste receptor presente na medula espinhal é capaz de inibir os dois tipos de hiperalgesia. Assim, analisando estes estudos em conjunto se observa que mecanismos distintos estão envolvidos no processamento da hiperalgesia mecânica e térmica frente a diferentes estímulos pró-inflamatórios, o que dá suporte à teoria de que diferentes mecanismos também estejam envolvidos na hiperalgesia mecânica e térmica no modelo de artrite avaliado neste estudo.

Além disso, sugere-se que esta diferença observada nos mecanismos envolvidos na transmissão de diferentes estímulos nociceptivos pode estar associada a diferentes tipos de fibras envolvidas. De fato, Ossipov e colaboradores (1999) demonstraram que o tratamento com resiniferatoxina (RTX), um análogo mais potente da capsaicina, foi capaz de aumentar a latência de resposta ao estímulo térmico, mas não ao estímulo mecânico, no modelo de lesão do nervo ciático em ratos. Ademais, este estudo demonstrou que a dessensibilização de fibras que expressam o receptor TRPV1 como, por exemplo, as fibras C, inibe somente a transmissão da resposta hiperalgesia térmica e não mecânica. Estes autores ainda sugerem que a alodinia mecânica pode ser mediada pela ativação de fibras mielinizadas de grande diâmetro insensíveis a capsaicina como, por exemplo, as fibras A β , visto que estes tipos de fibras são incapazes de transmitir estímulo térmico nocivo e são insensíveis a dessensibilização por capsaicina ou RTX (SZOLCSANYI et al., 1990). Em uma condição normal, estas fibras chegam a regiões mais

profundas (lâminas III-V) do corno dorsal da medula espinhal, e estão envolvidas na transmissão de estímulos não-nocivos (SUGIURA et al., 1986). Após a lesão de um nervo periférico, essas fibras A β formam projeções e fazem sinapses com neurônios de segunda ordem na lâmina II (WOOLF et al., 1992, 1995), sendo que esta região superficial do corno dorsal da medula espinhal normalmente recebe informações nociceptivas de fibras C não-mielinizadas (SUGIURA et al., 1986), onde o estímulo anteriormente considerado não-nocivo passa a ser interpretado como nocivo. Além disso, trabalhos descritos na literatura sugerem a importância das vias espinhal e supra-espinhal no processamento da alodinia mecânica e hiperalgesia térmica. Assim, Bian e colaboradores (1998) sugerem que alodinia mecânica resultante da lesão de um nervo periférico envolve a ativação de circuitos supra-espinhais. Porém, não está claro se as alterações no processamento desta informação (estímulo mecânico) estão associadas a alterações na via ascendente, no processamento que ocorre no mesencéfalo, ou se envolve alterações na via descendente, tanto inibitória quanto facilitatória. Considerando a hiperalgesia térmica, esta parece ser dependente tanto de um circuito localizado na medula espinhal quanto de circuitos supra-espinhais, e dependendo da intensidade do estímulo térmico nocivo pode ocorrer a ativação de fibras A δ e fibras C, resultando em um diferente processamento da informação nociceptiva no nervo lesionado.

Nesse sentido, analisando os resultados obtidos no presente estudo onde foi observado um efeito predominante do precursor de resolvinas da série D sobre a hiperalgesia mecânica, mas não sobre a hiperalgesia térmica, pode ser sugerido que este mediador lipídico esteja modulando a dor inflamatória através da inibição do processo inflamatório. Consequentemente, uma menor quantidade de mediadores pró-nociceptivos seria produzida, sensibilizando em menor grau fibras A β e as fibras C presentes na periferia e/ou no sistema nervoso central. No entanto, estudos adicionais são necessários para confirmar esta hipótese.

Como mencionado anteriormente, o precursor de resolvinas da série D 17(R)HDoHE é formado endogenamente quando a enzima COX-2 está inibida de forma irreversível pela aspirina, porém a atividade de peroxidase desta enzima ainda permanece preservada (VANE et al., 1998). Desse modo, a atividade da enzima COX-2 que resultaria na produção das prostaglandinas fica inibida, sendo que uma via alternativa é ativada, resultando na formação do precursor 17(R)HDoHE a partir da oxidação do ácido graxo DHA (SERHAN et al., 2002). Adicionalmente, o precursor 17(R)HDoHE pode ainda sofrer

um processo de metabolização, o qual envolve uma série de reações de epoxidação e hidrólise enzimáticas, podendo originar quatro tipos de resolvinas formadas na presença da aspirina: AT-RvD1 a AT-RvD4 (SERHAN et al., 2004; SERHAN, 2007). Até o presente momento, somente dois trabalhos investigaram o potencial anti-inflamatório da resolvina formada na presença da aspirina 1 (AT-RvD1), sendo que seus efeitos foram comparados com os do seu epímero, a resolvina D1 (RvD1) (SUN et al., 2007; BENTO et al., 2011). Dessa forma, Sun e colaboradores (2007) observaram que tanto a RvD1 quanto a AT-RvD1 apresentam a mesma potência em diminuir a infiltração de células polimorfonucleares (PMN) de uma maneira dependente da dose em um modelo de peritonite em camundongos, assim como a migração transendotelial de neutrófilos humanos *in vitro*. Mais recentemente, Bento e colaboradores (2011) demonstraram que o tratamento sistêmico com o precursor 17(R)HDoHE, a resolvina AT-RvD1 e a RvD2 apresentaram potente efeito anti-inflamatório nos modelos de colite induzida por DSS e por TNBS em camundongos.

De modo interessante, o presente estudo demonstrou pela primeira vez que a resolvina AT-RvD1 também apresenta grande potencial anti-hiperalgésico quando avaliada no modelo de artrite induzida por adjuvante em ratos. Outro ponto bastante relevante observado é que, assim como o precursor 17(R)HDoHE, a AT-RvD1 apresentou efeito anti-hiperalgésico em doses extremamente baixas (100-300 ng), demonstrando o quão potente são estes mediadores lipídicos. Corroborando os achados deste trabalho com relação ao efeito anti-hiperalgésico do precursor de resolvinas da série D e da resolvina AT-RvD1, outros trabalhos também investigaram o potencial anti-hiperalgésico de diferentes mediadores pró-resolução quando administrados por diferentes vias e em diferentes modelos de dor. Neste sentido, Svensson e colaboradores (2007) foram os primeiros a investigarem o potencial das lipoxinas LXA₄ e LXB₄, assim como os seus respectivos análogos ATLa e 8,9-aLXB₄, sobre a hiperalgesia térmica induzida pela administração intraplantar de carragenina.

Recentemente, Xu e colaboradores (2010) demonstraram que a administração de resolvina E1 (RvE1) ou de resolvina D1 (RvD1), na pata ou na medula espinhal de camundongos, reduz a dor inflamatória em diferentes modelos experimentais, como a dor induzida por formalina, carragenina e CFA. Ainda, de maneira interessante, Bang e colaboradores (2010) observaram que a RvD1 atua como inibidor endógeno de diferentes canais iônicos de potencial transitório sensíveis a temperatura, os chamados termo-TRPs, especificamente o TRPA1,

TRPV3 e TRPV4 (DA COSTA et al., 2009). É sabido que estes canais iônicos estão intimamente envolvidos na via de transmissão da dor, sendo capazes de detectar estímulos de diferentes naturezas e intensidades (PATAPOUTIAN et al., 2009), sendo que a modulação destes receptores se torna um alvo interessante para o controle da dor. Além disso, estes autores observaram que o pré-tratamento com a RvD1 na pata de camundongos inibe o comportamento de *licking* e *flinching* induzido por cinamaldeído, assim como as duas fases da dor aguda induzida por formalina (MACPHERSON et al., 2007; MCNAMARA et al., 2007). Ainda, o pré-tratamento com RvD1 na pata de camundongos preveniu parcialmente o comportamento nociceptivo induzido pela ativação do receptor TRPV4, mas não quando se utilizou capsaicina, um agonista do receptor TRPV1 (BANG et al., 2010). Recentemente, Huang e colaboradores (2011) demonstraram o potencial anti-hiperalgésico da RvD1 no modelo de dor pós-operatória em camundongos, sendo que a RvD1 administrada na medula espinhal destes animais 30 min antes, ou logo após o estímulo, promoveu redução significativa da hiperalgesia mecânica. Considerando que os resultados do presente estudo são preliminares em relação ao efeito anti-hiperalgésico do precursor de resolvinas da série D, não se pode descartar a possível participação de outros produtos da metabolização do precursor 17(R)HDoHE nesta atividade anti-nociceptiva, tais como a AT-RvD1 a AT-RvD4, tendo em vista que estudos anteriores mencionam a possível formação destas resolvinas a partir deste precursor (SERHAN et al., 2000; SERHAN et al., 2002; HONG et al., 2003).

O resultado mais expressivo obtido no presente trabalho foi a observação obtida pela comparação do efeito anti-hiperalgésico do precursor 17(R)HDoHE com outras drogas clássicas utilizadas na clínica para o tratamento da dor por artrite. Assim, foi observado um efeito anti-hiperalgésico marcante deste mediador lipídico quando comparado com outras drogas, como a morfina, indometacina e gabapentina (Tabela 1). De modo bastante expressivo, a dose efetiva observada para o precursor 17(R)HDoHE foi de aproximadamente 500 vezes menor do que a da morfina e aproximadamente 5000 vezes menor do que as outras drogas utilizadas. Entretanto, se a dose de morfina for aumentada, é provável que se observe um efeito anti-hiperalgésico pronunciado, visto que esta droga é conhecida por inibir a dor de origem inflamatória. Além disso, a ausência de efeito após o tratamento com a dexametasona pode ter sido em função do tempo de avaliação da resposta comportamental, necessitando um tempo maior pra que a droga apresentasse efeito. De

qualquer maneira, estes resultados demonstram que o efeito do precursor é bastante pronunciado em relação às outras drogas quando se considera a faixa de concentração que foi utilizada (nanogramas).

Além de se avaliar o potencial anti-hiperalgésico do precursor de resolvinas da série D no modelo de artrite induzida por adjuvante, também foi avaliado se este mediador pró-resolução poderia modular os parâmetros relacionados ao desenvolvimento da artrite, isto é, o edema de pata, o edema articular e a rigidez articular. Na clínica, a rigidez articular é definida como um desconforto do paciente quando este tenta mover as articulações após um período de inatividade. Mais característico ainda é a rigidez matinal, sendo esta considerada um critério do Colégio Americano de Reumatologia (*American College of Rheumatology*) para o diagnóstico de artrite reumatóide. Ademais, quando um quadro de degeneração articular já se encontra estabelecido, o grau de rigidez está relacionado com a frequência que a articulação lesionada é utilizada. Após uso excessivo desta articulação, a rigidez articular aumenta e geralmente melhora após alguns dias de descanso. Embora a ausência de rigidez articular não exclua a possibilidade de uma doença inflamatória sistêmica, como a artrite reumatóide, a sua ausência é incomum (KELLEY e HARRIS, 2005). Outra queixa frequente de pacientes portadores de doenças reumáticas é a limitação do movimento. Esta deve ser diferenciada de rigidez articular a qual é geralmente transiente e variável, enquanto que a real limitação do movimento é mais fixa e menos variável com o tempo. O aumento gradual da limitação do movimento é característico de doenças inflamatórias articulares. A restrição no movimento articular pode estar relacionada a alterações na articulação em si ou em estruturas periarticulares. Em vários pacientes, a amplitude do movimento realizado de forma passiva, ou seja, pelo médico, é em geral maior do que a amplitude do movimento realizado de forma ativa, ou seja, pelo próprio paciente. A presença de dor após tentativa de movimento ativo geralmente indica anormalidade na articulação ou tecidos periarticulares, sendo este um quadro característico de dor articular (SCOTT, 1960; KELLEY e HARRIS, 2005; KEENAN et al., 2006). O edema articular é outra característica de pacientes com doenças reumáticas, sendo que informações a respeito do início e persistência do edema e os fatores que o influenciam são de extrema importância para um tratamento adequado. Por exemplo, sensação de desconforto na articulação com edema pode indicar um quadro de sinovite (inflamação da membrana sinovial) devido à tensão sobre estes tecidos durante o movimento. O edema próximo à articulação pode ocorrer devido à

efusão de líquido intra-articular, isto é, ao aumento da produção de líquido pelos tecidos inflamados, ao espessamento da membrana sinovial, ou inflamação do tecido periarticular (KELLEY e HARRIS, 2005).

Com relação aos três parâmetros avaliados no presente estudo, ou seja, edema articular, edema de pata e rigidez articular, considerando apenas uma administração do precursor ou com intervalos grandes entre as administrações, nenhum destes parâmetros foi significativamente alterado nos diferentes períodos analisados, isto é, antes da indução de AIA, e nos períodos agudo, sub-crônico e crônico após a indução de AIA. De fato, dificilmente o tratamento com uma única dose de uma substância com intervalo de tempo de quase duas semanas entre um tratamento e outro alteraria satisfatoriamente um sinal clínico como a rigidez articular característico da artrite. Neste sentido, um tratamento mais próximo da realidade clínica foi realizado, considerando que um paciente só procura atendimento médico e, conseqüentemente, um tratamento adequado, quando os sintomas da doença aparecem, os quais em geral são posteriores ao início do desenvolvimento da doença. Dessa forma, foi escolhido o período sub-crônico (14 dias após a indução de AIA) para a realização do tratamento com o precursor de resolvinas, considerando que neste período os animais apresentam sinais característicos da artrite já bem estabelecidos (rigidez articular e edema de pata). De modo interessante, o tratamento terapêutico com o precursor de resolvinas da série D, 17(R)HDoHE, por 6 dias consecutivos a partir do 14º dia após a indução da artrite, resultou em redução no escore de rigidez articular, sendo este efeito observado nos dois últimos dias do tratamento. Este foi um resultado muito interessante, uma vez que a principal queixa de pacientes com artrite é a ocorrência de rigidez articular pela manhã (rigidez matinal), a qual, associada com a dor articular, resulta em grande incapacidade e perda da qualidade de vida destes pacientes (CROCI e ZARINI, 2007; MONTECUCCO et al., 2009). Apesar do tratamento prolongado com o precursor 17(R)HDoHE não ter alterado os outros parâmetros avaliados (edema de pata e edema articular), não se pode descartar a possibilidade de que um tratamento mais prolongado poderia alterar estes parâmetros. Após um estímulo inflamatório, ocorre a ativação de diversas células residentes, como células dendríticas, macrófagos e mastócitos. Conseqüentemente, estas células ativadas liberam uma variedade de citocinas pró-inflamatórias, as quais possuem um papel extremamente importante no desenvolvimento da dor inflamatória (VERRI et al., 2006; SCHAIBLE et al., 2010). As primeiras citocinas liberadas são a IL-1 β , o

TNF- α e a IL-6. Desta forma, o bloqueio da síntese ou atividade destas citocinas se torna um modo interessante de se bloquear o desenvolvimento da dor inflamatória (VERRI et al., 2007).

Diversos trabalhos demonstraram e vem demonstrando o envolvimento de várias citocinas como mediadoras da dor de origem inflamatória (SAMAD et al., 2001; CUNHA et al., 2005; VERRI et al., 2006; BINSHTOK et al., 2008; SCHAIBLE et al., 2009). Ainda, alguns trabalhos apontam para o papel crucial que a citocina TNF- α apresenta na indução da dor inflamatória (CUNHA et al., 1992; WOOLF et al., 1997; SOMMER e KRESS, 2004; NARITA et al., 2008; VON BANCHET et al., 2009; ZHANG et al., 2011). Desta forma, esta citocina pode promover tanto a sensibilização periférica, atuando em seus receptores específicos localizados nos nociceptores presentes na periferia, quanto na sensibilização central, aumentando a transmissão sináptica e a excitabilidade dos neurônios do corno dorsal da medula espinhal (KAWASAKI et al., 2008). Trabalhos recentes demonstraram que o bloqueio desta citocina é capaz de diminuir a hiperalgesia inflamatória em diferentes modelos animais de dor (INGLIS et al., 2007; BOETTGER et al., 2008; VON BANCHET et al., 2009; BOETTGER et al., 2010). Outra citocina que apresenta papel importante na hiperalgesia inflamatória é a citocina IL-1 β , a qual também tem a sua produção estimulada em resposta ao TNF- α (WOOLF et al., 1997; IWAKURA, 2002; VERRI et al., 2006). A citocina IL-1 β também pode promover a hiperalgesia de maneira indireta através da indução da produção de alguns mediadores, como fator de crescimento do nervo (NGF) (SAFIEH-GARABEDIAN et al., 1995), da enzima COX-2 (SAMAD et al., 2001; NARITA et al., 2008), prostanoídes (FERREIRA et al., 1988), enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e o óxido nítrico (NO) (SUNG et al., 2004), entre outros. Ainda, a produção de IL-1 β é induzida em resposta a diferentes modelos de dor inflamatória e neuropática, contribuindo assim para o desenvolvimento da hiperalgesia (WANG et al., 1997; SWEITZER et al., 1999, 2001; KIGUCHI et al., 2010). Diante desses achados e a fim de investigar possíveis mecanismos pelos quais o precursor 17(R)HDoHE e a resolvina AT-RvD1 poderiam inibir a hiperalgesia no início do processo inflamatório, foram avaliados os níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β no tecido da superfície plantar e na medula espinhal de ratos após o tratamento sistêmico com ambos mediadores lipídicos. De modo interessante, o tratamento sistêmico e prolongado com o precursor 17(R)HDoHE, ou com a resolvina AT-RvD1, diminuiu de forma

acentuada os níveis de ambas as citocinas no tecido da pata de ratos submetidos a AIA. Alguns trabalhos mostram que o pré-tratamento com o antagonista do receptor de IL-1 β (IL-1ra) inibe a hipernocicepção induzida por esta citocina (HORI et al., 1998) e a hiperalgesia mecânica induzida por CFA (SAFIEH-GARABEDIAN et al., 1995). Além disso, o pré-tratamento com anticorpo anti-TNF β , 1 h antes da administração de CFA, retardou o desenvolvimento da hiperalgesia inflamatória, enfatizando um papel importante desta citocina no desenvolvimento da hiperalgesia neste modelo de dor inflamatória. Em pacientes com dor inflamatória crônica do tecido conectivo foi observado níveis elevados de TNF- α na sinóvia da articulação temporomandibular, sendo que a presença desta citocina está diretamente relacionada com a dor nesta articulação (NORDAHL et al., 2000). Corroborando os dados do presente estudo, Xu e colaboradores (2010) observaram que o tratamento local (i.pl.) com a RvE1 2 h após a injeção de carragenina promoveu redução significativa nos níveis de várias citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α , IL1- β e IL-6, no tecido da pata de camundongos. No entanto, apesar de diferentes trabalhos terem demonstrado que a produção de TNF- α e da IL-1 β na medula espinhal de animais apresente um importante papel no desenvolvimento da dor inflamatória persistente, o tratamento sistêmico com doses repetidas com o precursor de resolvina da série D, ou com a resolvina AT-RvD1, não inibiu a produção destas citocinas na medula espinhal de ratos submetidos ao modelo de artrite induzida por adjuvante. De qualquer modo, os resultados do presente estudo reforçam e estendem os recentes achados da literatura que mostram o potencial analgésico dos mediadores lipídicos pró-resolução, em especial o precursor 17(R)HDoHE e a resolvina AT-RvD1, por meio da modulação dos níveis de importantes citocinas inflamatórias, como o TNF- α e IL-1 β (XU et al., 2010).

O processo inflamatório também promove a ativação do fator de transcrição NF- κ B, que por sua vez, ao se ligar em regiões promotoras de vários genes, incluindo os das citocinas (TNF- α e IL-1 β), a enzima ciclooxigenase-2 (COX-2), óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e proteases (metaloproteinases de matriz-MMPs), promove a transcrição destas proteínas alvos e, conseqüentemente, modula a via de processamento e transmissão da informação nociceptiva (NIEDERBERGER e GEISLINGER, 2008). Lee e colaboradores (2004) demonstraram que a inflamação periférica induzida por CFA causou aumento da expressão do fator de transcrição NF- κ B tanto na

medula espinhal, quanto no GRD de ratos. Neste mesmo estudo, foi demonstrado que o tratamento i.t. com inibidores do NF- κ B causou redução significativa da alodinia mecânica, da hiperalgesia térmica, da ativação espinhal do NF- κ B e do aumento dos níveis do RNAm para a COX-2 induzidos pela administração i.pl. de CFA (LEE et al., 2004). Desse modo, o presente estudo verificou se o precursor das resolvinas da série D 17(R)HDoHE também poderia inibir a ativação deste fator de transcrição, o qual, conseqüentemente, diminuiria a produção de mediadores pró-inflamatórios e pró-nociceptivos. Nossos resultados demonstraram que o processo inflamatório resultante do modelo de artrite induzida por adjuvante também promove aumento da ativação do NF- κ B tanto na medula espinhal quanto no GRD de ratos e, de modo interessante, o precursor 17(R)HDoHE, quando administrado i.p. durante o processo inflamatório agudo, diminuiu a ativação do NF- κ B em ambos os tecidos avaliados.

Além do envolvimento do fator de transcrição NF- κ B na transmissão da informação nociceptiva, diversos estudos demonstram o envolvimento das enzimas ciclooxigenases na produção de mediadores pró-nociceptivos, como as prostaglandinas. Ambas as isoformas COX-1 e COX-2 estão envolvidas na produção de prostanóides a partir do ácido araquidônico, os quais são conhecidos por seus efeitos pró-nociceptivos (para revisão ver BURIAN e GEISSLINGER, 2005). A expressão destas enzimas varia em função dos tecidos considerados, sendo que a diferença mais marcante é que a enzima COX-1 está expressa constitutivamente nos tecidos, enquanto que a enzima COX-2, apesar de estar constitutivamente expressa em algumas regiões do sistema nervoso central, tem sua expressão induzida durante o processo inflamatório (DUBOIS et al., 1998; VANE et al., 1998; YACOUBIAN e SERHAN, 2007). Vários trabalhos confirmam o aumento evidente da expressão da COX-2, tanto no local da inflamação, quanto em neurônios, glia, células endoteliais na medula espinhal e no cérebro de ratos (SAMAD et al., 2001). Ainda, foi demonstrado que a hiperalgesia mecânica induzida pela IL-1 β depende da produção de prostanóides, visto que o pré-tratamento com a indometacina, inibidor de enzimas ciclooxigenases, bloqueia o efeito desta citocina (FERREIRA et al., 1988). Ademais, recentemente foi demonstrado que a enzima COX-2 neuronal possui papel importante no desenvolvimento da hipersensibilidade mecânica, mas não na hipersensibilidade térmica (VARDEH et al., 2009). Além disso, a administração do inibidor seletivo da COX-2, celecoxibe, inibe a hiperalgesia mecânica de

maneira dependente da dose em um modelo de monoartrite em ratos (MI et al, 2008). Desta forma, observa-se que o bloqueio da atividade de enzimas COX-2, ou a regulação da transcrição desta proteína modula o processo hiperalérgico em modelos animais de nociceção. Assim, além da participação do fator de transcrição NF- κ B no mecanismo de ação proposto para o precursor de resolvinas da série D 17(R)HDoHE, também foi investigada a possível participação da enzima COX-2 no mecanismo de ação proposto para o precursor de resolvinas 17(R)HDoHE. Como esperado, o precursor das resolvinas da série D quando administrado no período agudo do processo inflamatório após a indução de artrite também resultou na diminuição significativa da imunomarcagem para COX-2 na medula espinhal e no GRD. Estes resultados nos permitem concluir que o bloqueio tanto do fator de transcrição NF- κ B, bem como da enzima COX-2, parece ser um dos mecanismos pelos quais o precursor de resolvinas da série D 17(R)HDoHE inibe o desenvolvimento da hiperalgesia no início do processo inflamatório observado no modelo de artrite induzido por CFA. Além de ter avaliado o efeito do precursor 17(R)HDoHE na modulação pós-transcricional destes mediadores, foi avaliado se este precursor poderia modular os níveis de RNAm do fator de transcrição NF- κ B e da enzima COX-2. Analisando-se somente a expressão do fator de transcrição NF- κ B em ratos com AIA que não foram tratados com o precursor 17(R)HDoHE, foi observado aumento significativo dos níveis de RNAm somente na medula espinhal, mas não no GRD, quando avaliados no início do processo inflamatório. Estes resultados corroboram, em parte, o estudo realizado por Chan e colaboradores (2000), os quais demonstraram pelo ensaio de alteração da mobilidade eletroforética (do inglês *electrophoretic mobility shift assay* - EMSA) que o heterodímero p50/p65 do fator de transcrição NF- κ B tem sua capacidade de ligação aumentada na medula espinhal 30 min após a indução da inflamação periférica, sendo que 2 h após estes níveis começam a diminuir. Além disso, Lee e colaboradores (2004) também demonstraram que a capacidade de ligação ao DNA pela subunidade p65 do NF- κ B aumentou na medula espinhal 30 min e diminuiu 2 h após a injeção de CFA, enquanto que nenhuma alteração significativa foi detectada na atividade da subunidade p50 do NF- κ B. Apesar da diferença nas técnicas empregadas, ou seja, os autores mencionados anteriormente utilizaram a técnica de EMSA para avaliar a atividade das subunidades do NF- κ B e, no presente trabalho, foi utilizada a técnica de PCR em tempo real, não foi possível detectar diferenças nos níveis de

RNA_m do NF- κ B, provavelmente devido ao período escolhido para a avaliação. No entanto, foi possível detectar aumento dos níveis das proteínas como verificado pela técnica de imunistoquímica. Consequentemente, estudos complementares são necessários para investigar se existem diferenças nos níveis de RNA_m do fator de transcrição NF- κ B em um período anterior ao avaliado no modelo de artrite induzida por adjuvante.

Paralelamente ao aumento dos níveis da proteína COX-2 observado na medula espinhal, também foi observado aumento significativo dos níveis do RNA_m desta proteína 3 dias após a indução da artrite. Alguns autores demonstraram que os níveis de RNA_m para a COX-2 estão aumentados por, pelo menos, 24 h após a indução da inflamação periférica (SAMAD et al., 2001) e outros detectaram uma diminuição nos níveis do RNA_m pra COX-2 3 dias após (HAY et al., 1997). Entretanto, Beiche e colaboradores (1996) também detectaram diferentes padrões de expressão do RNA_m para a COX-2, os quais ainda se encontravam elevados 7 dias após a injeção de CFA. Corroborando os dados do presente trabalho, já foi demonstrado aumento do RNA_m para COX-2 na medula espinhal 3 dias após a indução de inflamação crônica em camundongos (NARITA et al., 2008). No entanto, no presente trabalho não foi observado nenhuma diferença nos níveis de RNA_m para COX-2 no GRD quando avaliado 3 dias após a indução da artrite em ratos. De fato, já foi demonstrado que durante a inflamação periférica induzida pela injeção de CFA na pata de ratos ocorre um pequeno aumento, mas não significativo, do RNA_m para COX-2 no GRD, contrastando com o aumento significativo do RNA_m na medula espinhal (AMAYA et al., 2009). De maneira interessante, os nossos resultados demonstraram que o tratamento com o precursor de resolvinas da série D 17(R)HDoHE preveniu o aumento dos níveis de RNA_m para COX-2 na medula espinhal. Nesse sentido, o precursor das resolvinas da série D 17(R)HDoHE parece modular a sensibilização periférica através da inibição do fator de transcrição NF- κ B (proteína) e da enzima COX-2 (proteína e RNA_m) no GRD, bem como modular a sensibilização central pela inibição do NF- κ B (proteína) e da enzima COX-2 (proteína e RNA_m) na medula espinhal de ratos com AIA.

Até pouco tempo atrás, pouco era conhecido em relação aos mecanismos pelos quais a RvD1 promovia seus efeitos anti-inflamatórios. Recentemente, foi demonstrado que ela é capaz de se ligar a receptores acoplados à proteína G: o receptor de lipoxina A4 (ALX) e o receptor órfão GPR32 presente em fagócitos humanos

(KRISHNAMOORTHY et al., 2010). Além do mais, um estudo recente do nosso grupo demonstrou que a resolvina AT-RvD1, mas não o seu precursor 17(R)HDoHE e a RvD2, inibe a produção de várias citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-6, em macrófagos estimulados com lipopolissacarídeo, sendo que este efeito é dependente da ativação do receptor ALX (BENTO et al., 2011). No entanto, se o precursor 17(R)HDoHE e a resolvina AT-RvD1 também promovem os seus efeitos anti-hiperalgésicos através da ativação dos receptores de lipoxina ALX e/ou do receptor órfão GPR32 ainda não está estabelecido e estudos adicionais necessitam ser realizados para investigar esta hipótese.

Início processo inflamatório articular

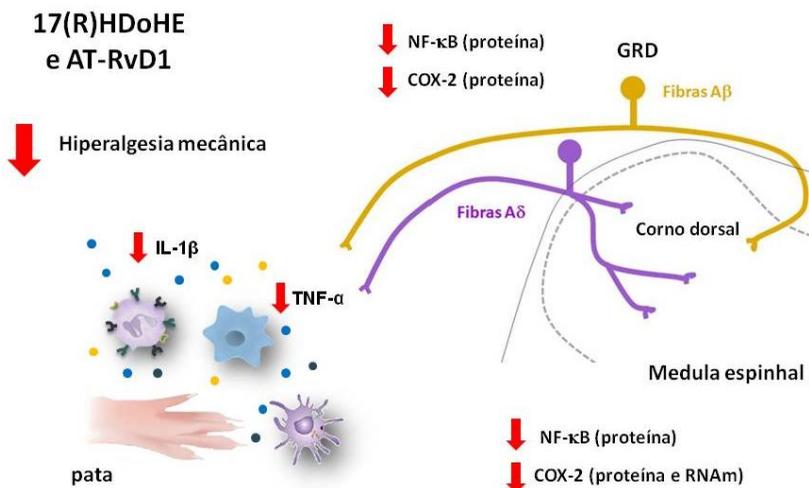


Figura 31. Possíveis mecanismos de ação do precursor de resolvinas da série D, 17(R)HDoHE, e da resolvina formada na presença da aspirina, AT-RvD1, no início do processo inflamatório articular no modelo da artrite induzida por adjuvante (AIA). A administração i.pl. de CFA da pata ipsilateral causa, 3 dias após a indução de AIA, um aumento significativo da hiperalgisia mecânica e térmica, bem como a produção das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β no tecido da pata e a ativação do fator de transcrição NF- κ B e da enzima COX-2 na medula espinhal e no gânglio da raiz dorsal (GRD). O tratamento com o precursor 17(R)HDoHE (300 ng/i.p.) e com a resolvina AT-RvD1 (100 e 300 ng/i.p.), no início do processo inflamatório articular, reduz de forma significativa a hiperalgisia mecânica, mas não a térmica. O efeito anti-hiperalgésico do precursor 17(R)HDoHE e da resolvina AT-RvD1 ocorre em decorrência, possivelmente, da sua atuação sobre fibras A δ e/ou A β , por diminuir a produção de TNF- α e IL-1 β no tecido da pata e a ativação do fator de transcrição NF- κ B e da enzima COX-2 na medula espinhal e no GRD.

Processo inflamatório articular estabelecido

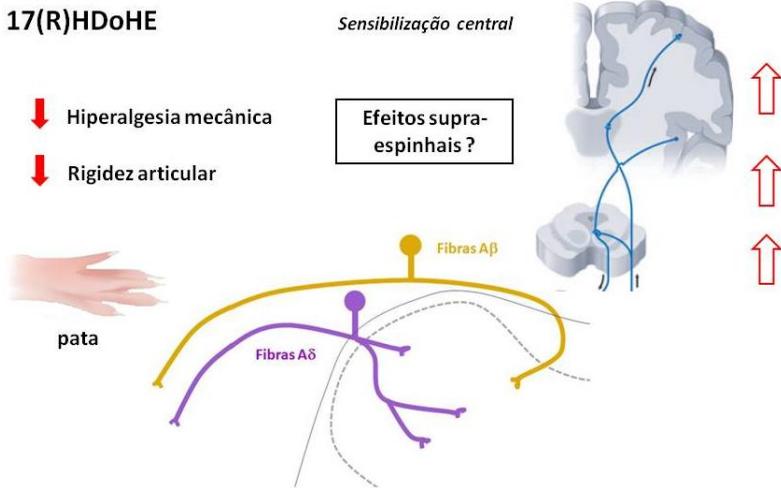


Figura 32. Possíveis mecanismos de ação do precursor de resolvinas da série D, 17(R)HDoHE, no processo inflamatório articular estabelecido no modelo da artrite induzida por adjuvante (AIA). A administração i.pl. de CFA da pata ipsilateral causa um aumento significativo da hiperálgia mecânica e térmica quando avaliadas no período sub-crônico (14 dias após a indução de AIA) e crônico (30 dias após a indução de AIA) da inflamação articular. O tratamento com doses maiores do precursor 17(R)HDoHE (300, 600 e 900 ng/i.p.) diminuiu de forma significativa a hiperálgia mecânica, mas não a hiperálgia térmica. O efeito anti-hiperalgésico do precursor 17(R)HDoHE no período sub-crônico ocorre em decorrência, possivelmente, da sua atuação sobre fibras A δ e/ou A β . Além disso, observou-se que após o tratamento repetido com o precursor 17(R)HDoHE (300 ng/i.p.; 6 dias, 1x ao dia) houve uma redução do escore de rigidez articular. No entanto, efeitos supra-espinais do precursor 17(R)HDoHE no período sub-crônico da inflamação articular precisam ser investigados.

6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados descritos no presente estudo, foi demonstrado pela primeira vez o potencial anti-hiperalgésico do precursor das resolvinas da série D 17(R)HDoHE, bem como de um de seus metabólitos, a AT-RvD1, quando avaliados no modelo de artrite induzida por adjuvante em ratos. De modo relevante, o tratamento com o precursor 17(R)HDoHE apresentou efeito anti-hiperalgésico superior ao observado com outras drogas utilizadas atualmente no tratamento da dor da artrite. Os resultados aqui apresentados demonstram ainda que inibição do fator de transcrição NF- κ B e COX-2 na medula espinhal e no GRD parece contribuir em parte para o efeito anti-hiperalgésico do precursor 17(R)HDoHE tratado i.p. durante o processo inflamatório agudo. Além disso, o efeito anti-hiperalgésico de ambos os mediadores lipídicos, o precursor 17(R)HDoHE e a AT-RvD1, parece ser resultante da modulação da produção das citocinas TNF- α e IL-1 β na pata de ratos submetidos ao modelo de artrite induzida por adjuvante. Considerando os parâmetros relacionados à artrite, o efeito do precursor 17(R)HDoHE em prevenir o aumento a rigidez articular em ratos com artrite mostra não somente o potencial anti-hiperalgésico deste mediador lipídico como o seu potencial em diminuir a progressão do dano articular.

Finalmente, os resultados do presente trabalho demonstram a importância do consumo de ácidos graxos ω -3, uma vez que são precursores de mediadores lipídicos, como o precursor 17(R)HDoHE bem como a resolvina AT-RvD1, os quais exercem papel relevante na resolução do processo inflamatório e doloroso, além de demonstrar que estes mediadores lipídicos são moléculas promissoras para tratamento da dor de origem inflamatória, a qual ainda se caracteriza como um sintoma de difícil tratamento de doenças inflamatórias crônicas como a artrite reumatóide.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALARCÓN, G.S. Epidemiology of rheumatoid arthritis. *Rheum. Dis. Clin. North Am.*, v. 21, n. 3, p. 589-604, 1995.
- ALBERT, C.M. et al. Fish consumption and risk of sudden cardiac death. *JAMA*, v. 279, n. 1, p. 23-28, 1998.
- ALBERT, C.M. et al. Blood levels of long-chain n-3 fatty acids and the risk of sudden death. *New Engl. J. Med.*, v. 346, p. 1113-1118, 2002.
- AMAYA, F. et al. Periganglionic inflammation elicits a distally radiating pain hypersensitivity by promoting COX-2 induction in the dorsal root ganglion. *Pain.*, v. 142, p. 59-67, 2009.
- ARIEL, A. et al. Apoptotic neutrophils and T cells sequester chemokines during immune response resolution through modulation of CCR5 expression. *Nat. Immunol.*, v. 7, n. 11, p. 1209-1216, 2006.
- ARITA, M. et al. Stereochemical assignment, anti-inflammatory properties, and receptor for the omega-3 lipid mediator resolvin E1. *J. Exp. Med.*, v. 201, n. 5, p. 713-722, 2005a.
- ARITA, M. et al. Resolvin E1, an endogenous lipid mediator derived from omega-3 eicosapentaenoic acid, protects against 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 102, p. 7671-7676, 2005b.
- ARITA, M. et al. Resolvin E1 selectively interacts with leukotriene B4 receptor BLT1 and ChemR23 to regulate inflammation. *J. Immunol.*, v. 178, p. 3912-3917, 2007.
- BANG, S. et al. Resolvin D1 attenuates activation of sensory transient receptor potential channels leading to multiple anti-nociception. *Br. J. Pharmacol.*, v. 161, p. 707-720, 2010.

- BANNENBERG, G.; SERHAN, C.N. Specialized pro-resolving lipid mediators in the inflammatory response: an update. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1801, p. 1260-1273, 2010.
- BASBAUM, A.I. et al. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*, v. 139, p. 267-284, 2009.
- BEICHE, F. et al. Up-regulation of cyclooxygenase-2 mRNA in the rat spinal cord following peripheral inflammation. *FEBS Letters*, v. 390, p. 165-169, 1996.
- BELLUZZI, A. et al. Effect of an enteric-coated fish-oil preparation on relapses in crohn's disease. *New Engl. J. Med.*, v. 334, n. 24, p. 1557-1560, 1996.
- BENDELE, A.M. Animal models of rheumatoid arthritis. *J. Musculoskel. Neuron Interact.*, v. 1, n. 4, p. 377-385, 2001.
- BENTO, A. F. et al. ω -3 Fatty acid-derived mediators 17(R)-hydroxy docosahexaenoic acid, aspirin-triggered resolvin D1 and resolvin D2 prevent experimental colitis in mice. *J. Immunol.*, v. 187, n. 4, p. 1957-69, 2011.
- BESSON, J-M. The neurobiology of pain. *Lancet*, v. 353, p. 1610-1615, 1999.
- BIAN, D. et al. Tactile allodynia, but not thermal hyperalgesia, of the hindlimbs is blocked by spinal transection in rats with nerve injury. *Neurosci. Letters*, v. 241, p. 79-82, 1998.
- BINSHTOK, A.M. et al. Nociceptors are interleukin-1 β sensors. *J. Neurosci.*, v. 28, n. 52, 14062-14073, 2008.
- BOETTGER, M.K. et al. Antinociceptive effects of tumor necrosis factor neutralization in a rat model of antigen-induced arthritis evidence of a neuronal target. *Arthritis Rheum.*, v. 58, n. 8, p. 2368-2378, 2008.
- BOETTGER, M.K. et al. Spinal tumor necrosis factor neutralization reduces peripheral inflammation and hyperalgesia

and suppresses autonomic responses in experimental arthritis: a role for spinal tumor necrosis factor during induction and maintenance of peripheral inflammation. *Arthritis Rheum.*, v. 62, n. 5, 1308-1318, 2010.

- BRADFORD, M.M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRASH, A.R. Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *J. Biol. Chem.*, v. 274, p. 23679-23682, 1999.
- BROWN, P.B. et al. Human complement activation by self-associated IgG rheumatoid factors. *Arthritis Rheum.*, v. 25, n. 9, p. 1101-1107, 1982.
- BUCH, M.H., EMERY, P. New therapies in the management of rheumatoid arthritis. *Curr. Opinion Rheumatol.*, v. 23, p. 245-251, 2011.
- BURIAN, M.; GEISLINGER, G. COX-dependent mechanisms involved in the antinociceptive action of NSAIDs at central and peripheral sites. *Pharmacol. Ther.*, v. 107, n. 2, p. 139-154, 2005.
- BUTTGEREIT, F. et al. Glucocorticoids in the treatment of rheumatic diseases: an update on the mechanisms of action. *Arthritis Rheum.*, v. 50, n. 11, p. 3408-3417, 2004.
- CALDER, P.C. Polyunsaturated fatty acids and inflammation. *Biochem. Soc. Trans.*, v. 33, p. 423-427, 2005.
- CALDER, P.C. n-3 Polyunsaturated fatty acids, inflammation and inflammatory diseases. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 83, p. 1505S-1519S, 2006.

- CALDER, P.C. Polyunsaturated fatty acids, inflammatory processes and inflammatory bowel diseases. *Mol. Nutr. Food Res.*, v. 52, p. 885-897, 2008a.
- CALDER, P.C. Joint Nutrition Society and Irish Nutrition and Dietetic Institute Symposium on 'Nutrition and autoimmune disease' PUFA, inflammatory processes and rheumatoid arthritis. *Proc. Nutr. Soc.*, v. 67, p. 409-418, 2008b.
- CALIXTO J.B. et al. Kinin B1 receptors: key G-protein-coupled receptors and their role in inflammatory and painful processes. *Br. J. Pharmacol.*, v. 143, n. 7, p.803-818, 2004.
- CAMPBELL, E.L. et al. Resolvin E1 promotes mucosal surface clearance of neutrophils: a new paradigm for inflammatory resolution. *FASEB J.*, v. 21, p. 3162-3170, 2007.
- CHAN, C-F. et al. Activation of transcription factors of nuclear factor kappa B, activator protein-1 and octamer factors in hyperalgesia. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 402, p. 61-68, 2000.
- CHEN, Y-F. et al. Cyclooxygenase-2 selective non-steroidal anti-inflammatory drugs (etodolac, meloxicam, celecoxib, rofecoxib, etoricoxib, valdecoxib and lumiracoxib) for osteoarthritis and rheumatoid arthritis: a systematic review and economic evaluation. *Health Technol. Assess.*, v. 12, n. 11, p. 1-78, 2008.
- CHOY, E.H.S., PANAYI, G.S. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *New Engl. J. Med.*, v. 344, n. 12, p. 907-916, 2001.
- COHEN, S.B. et al. Rituximab for rheumatoid arthritis refractory to anti-tumor necrosis factor therapy: results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial evaluating primary efficacy and safety at twenty-four weeks. *Arthritis Rheum.*, v. 54, n. 9, p. 2793-2806, 2006.

- CORTES-BURGOS, L.A. et al. CJ-13610, an orally active inhibitor of 5-lipoxygenase is efficacious in preclinical models of pain. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 617, p. 59–67, 2009.
- COSTIGAN, M., WOOLF, C.J. Pain: molecular mechanisms. *J. Pain*, v. 1, p. 35-44, 2000.
- CROCI, T; ZARINI, E. Effect of the cannabinoid CB1 receptor antagonist rimonabant on nociceptive responses and adjuvant induced arthritis in obese and lean rats. *Br. J. Pharmacol.*, v. 150, p. 559-566, 2007.
- CUNHA, F.Q. et al. The pivotal role of tumour necrosis factor α in the development of inflammatory hyperalgesia. *Br. J. Pharmacol.* v. 107, p. 660-664, 1992.
- CUNHA, T.M. et al. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. *PNAS*, v. 102, n. 105, p. 1755-1760, 2005.
- DA COSTA, D.S. et al. The involvement of the transient receptor potential A1 (TRPA1) in the maintenance of mechanical and cold hyperalgesia in persistent inflammation. *Pain*, v. 148, n. 3, p. 431-437, 2009.
- DA MOTA, L.M.H., et al. 2011 Consensus of the Brazilian Society of Rheumatology for diagnosis and early assessment of rheumatoid arthritis. *Rev. Bras. Reumatol.*, v. 51, n. 3, p. 199-219, 2011.
- DELVES, P.J., ROITT, I.M. The immune system: first of two parts. *New Engl. J. Med.*, v. 343, n. 1, p. 37-49, 2000.
- DORNELLES, F.N. et al. In vivo up-regulation of kinin B1 receptors after treatment with *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide in rat paw. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 330, p. 756-763, 2009.

- DRY, J., VINCENT D. Effect of a fish oil diet on asthma: results of a 1-year double-blind study. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, v. 95, p. 156-157, 1991.
- DUBOIS R.N., et al. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J.*, v. 12, p. 1063-1073, 1998.
- DUFFIELD, J.S. et al. Resolvin D series and protectin D1 mitigate acute kidney injury. *J. Immunol.*, v. 177, p. 5902-5911, 2006.
- EMERY, P. et al. IL-6 receptor inhibition with tocilizumab improves treatment outcomes in patients with rheumatoid arthritis refractory to anti-tumour necrosis factor biologicals: results from a 24-week multicentre randomised placebo-controlled trial. *Ann Rheum Dis.*, v. 67, p. 1516-1523, 2008.
- FERREIRA, S.H. et al. Interleukin-1 as a potent hyperalgesic agent antagonized by a tripeptide analogue. *Nature*, v. 334, p. 698-700, 1988.
- FERREIRA, S.H., LORENZETTI, B.B. Intrathecal administration of prostaglandin E2 causes sensitization of the primary afferent neuron via the spinal release of glutamate. *Inflamm. Res.*, v. 45, n. 10, p. 499-502, 1996.
- FIRESTEIN, G.S. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature*, v. 423, p. 356-361, 2003.
- GIESECKE, T. et al. The relationship between depression, clinical pain, and experimental pain in a chronic pain cohort. *Arthritis Rheum.*, v. 52, n. 5, p. 1577-1584, 2005.
- GILROY, D.W. et al. Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.*, v. 3, p. 401-416, 2004.
- GISSI-Prevenzione Investigators. Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI Prevenzione trial. Gruppo

Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto miocardico. *Lancet*, v. 354, p. 447-455, 1999.

- GONZÁLEZ, M.E.L. et al. Variability among nonsteroidal antiinflammatory drugs in risk of upper gastrointestinal bleeding. *Arthritis Rheum.*, v. 62, p. 1592-1601, 2010.
- GREGERSEN, P.K. et al. The shared epitope hypothesis: an approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, v. 30, n. 11, p. 1205-1213, 1987.
- HAMA, A., SAGEN, J. Selective antihyperalgesic effect of [Ser1] histogranin on complete Freund's adjuvant-induced hyperalgesia in rats. *Pain*, v. 95, p. 15-21, 2002.
- HARGREAVES, K. et al. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain*, v. 32, p. 77-88, 1988.
- HARRIS, W.S.; VON SCHACKY, C. The omega-3 index: a new risk factor for death from coronary heart disease? *Prev. Med.*, v. 39, p. 212-220, 2004.
- HASTURK, H. et al. RvE1 protects from local inflammation and osteoclast-mediated bone destruction in periodontitis. *FASEB J.*, v. 20, p. 401-403, 2006.
- HAWORTH, Oliver, et al. Resolvin E1 regulates interleukin 23, interferon-gamma and lipoxin A(4) to promote the resolution of allergic airway inflammation. *Nat. Immunol.*, v. 9, p. 873-879, 2008.
- HAY, C.H. et al. The potential role of spinal cord cyclooxygenase-2 in the development of freund's complete adjuvant changes in hyperalgesia and allodynia. *Neurosci.*, v. 78, n. 3, p. 843-850, 1997.

- HEGEN, M et al. Utility of animal models for identification of potential therapeutics for rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, v. 67, p. 1505-1515, 2008.
- HEISE, C.E. et al. Characterization of the human cysteinyl leukotriene 2 receptor. *J. Biol. Chem.*, v. 275, n. 39, p. 30531–30536, 2000.
- HONG, S. et al. Novel docosatrienes and 17S-Resolvins generated from docosahexaenoic acid in murine brain, human blood, and glial cells. *J. Biol. Chem.*, v. 278, p. 14677-14687, 2003.
- HORI, T. et al. Pain modulatory actions of cytokines and prostaglandin E2 in the brain. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v. 840, p. 269-281, 1998.
- HUANG, L. et al. Enduring prevention and transient reduction of postoperative pain by intrathecal resolvin D1. *Pain*, v. 152, p. 557-565, 2011.
- HUNT, S.P., MANTYH, P.W. The molecular dynamics of pain control. *Nat. Rev. Neurosci.*, v. 2, p. 83-91, 2001.
- INGLIS, J.J. et al. Collagen-induced arthritis as a model of hyperalgesia: functional and cellular analysis of the analgesic actions of tumor necrosis factor blockade. *Arthritis Rheum.*, v. 56, n. 12, p. 4015-4023, 2007.
- IWAKURA, Y. Roles of IL-1 in the development of rheumatoid arthritis: consideration from mouse models. *Cytokine Growth Factor Rev.*, v.13, p. 341-355, 2002.
- JACKSON, D.L. et al. Glutamate participates in the peripheral modulation of thermal hyperalgesia in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 284, p. 321-325, 1995.
- JANEWAY, C.A. Jr et al. *Immunobiology: the immune system in health and disease*. 5th edition. New York: Garland Science; 2001.

- JOE, B., WILDER, R.L. Animal models of rheumatoid arthritis. *Mol. Med. Today*, v. 5, p. 367-369, 1999.
- JULIUS, D., BASBAUM, A.I. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, v. 413, p. 203-210, 2000.
- KANAI, Y. et al. Differential involvement of TRPV1 receptors at the central and peripheral nerves in CFA-induced mechanical and thermal hyperalgesia. *J. Pharm. Pharmacol.*, v. 59, n. 5, p. 733-738, 2007.
- KANNAN, K. et al. Animal models of rheumatoid arthritis and their relevance to human disease. *Pathophysiol.*, v. 12, p. 167-181, 2005.
- KAWASAKI, Y. et al. Cytokine mechanisms of central sensitization: distinct and overlapping role of interleukin-1 β , interleukin-6, and tumor necrosis factor- α in regulating synaptic and neuronal activity in the superficial spinal cord. *J. Neurosci.*, v. 28, n. 20, p. 5189-5194, 2008.
- KELLEY, W.N.; HARRIS, E.D. *Kelley's textbook of rheumatology*. 7th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2005.
- KEENAN, A.M. et al. Impact of multiple joint problems on daily living tasks in people in the community over age fifty-five. *Arthritis Rheum.* v. 55, n. 5, p. 757-764, 2006.
- KIGUCHI, N. et al. Macrophage inflammatory protein-1 α mediates the development of neuropathic pain following peripheral nerve injury through interleukin-1 β up-regulation. *Pain*, v. 149, p. 305-315, 2010.
- KOHLI, P.; LEVY, B.D. Resolvins and protectins: mediating solutions to inflammation. *Br J Pharmacol*, v. 158, p. 960-971, 2009.
- KREMER, J.M. et al. Results of a two-year follow up study of patients with rheumatoid arthritis who received a combination of abatacept and methotrexate. *Arthritis Rheum.*, v. 58, n. 4, p. 953-963, 2008.

- KRISHNAMOORTHY, S. et al. Resolvin D1 binds human phagocytes with evidence for proresolving receptors. *PNAS*, v. 107, n. 4, p. 1660–1665, 2010.
- KUMAR, V et al. *Patologia básica*. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.
- KUNER, R. Central mechanisms of pathological pain. *Nat. Med.*, v. 16, n. 11, p. 1258-1266, 2010.
- LARSSON, S.C. et al. Dietary long-chain n-3 fatty acids for the prevention of cancer: a review of potential mechanisms. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 79, p. 935-945, 2004.
- LEE, D.M.; WEINBLATT, M.E. Rheumatoid arthritis. *Lancet*, v. 358, p. 903-911, 2001.
- LEE, K.M. et al. Spinal NF- κ B activation induces COX-2 upregulation and contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *Eur. J. Neurosci.*, v. 19, p. 3375-3381, 2004.
- LEEM, J.W. et al. The role of peripheral N-methyl-d-aspartate receptors in Freund's complete adjuvant induced mechanical hyperalgesia in rats. *Neurosci. Letters*, v. 297, p. 155-158, 2001.
- LOESER, J.D.; TREEDE, R-D. The Kyoto protocol of IASP basic pain terminology. *Pain*, v. 137, p. 473-477, 2008.
- LUKIW, W.J.; BAZAN, N.G. Docosahexaenoic acid and the aging brain. *J. Nutr.*, v. 138, p. 2510-2514, 2008.
- MACPHERSON, L.J. et al. An ion channel essential for sensing chemical damage. *J. Neurosci.*, v. 27, n. 42, p.11412-11415, 2007.
- MAJNO, G.; JORIS, I. *Cells, tissues and disease: principles of general pathology*. 2. ed., New York: Oxford, Oxford University Press, 2004.

- MANJAVACHI, M.N. et al. The effects of the selective and non-peptide CXCR2 receptor antagonist SB225002 on acute and long-lasting models of nociception in mice. *Eur. J. Pain.*, v. 14, p. 23–31, 2010.
- MARCHESELLI, V.L. et al. Novel docosanoids inhibit brain ischemia-reperfusion-mediated leukocyte infiltration and pro-inflammatory gene expression. *J. Biol. Chem.*, v. 278, p. 43807-43817, 2003.
- MARQUES-NETO, J.F. et al. Multicentric study of the prevalence of adult rheumatoid arthritis in Brazilian population samples. *Rev. Bras. Reumatol.*, v. 33, n. 5, p. 169-173, 1993.
- MCDOUGALL, J.J. et al. Triggering of proteinase-activated receptor 4 leads to joint pain and inflammation in mice. *Arthritis Rheum.*, v. 60, p. 728–737, 2009.
- MCINNES, I.B., SCHETT, G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Immunol.*, v. 7, p. 429-442, 2007.
- MCNAMARA, C.R. et al. TRPA1 mediates formalin-induced pain. *PNAS*, v. 104, n. 33, p. 13525-13530, 2007.
- MI, W-L., et al. Synergistic anti-hyperalgesia of electroacupuncture and low dose of celecoxib in monoarthritic rats: involvement of the cyclooxygenase activity in the spinal cord. *Brain Res. Bull.*, v. 77, p. 98-104, 2008.
- MONTECUCCO, C.; CAVAGNA, L.; CAPORALI, R. Pain and rheumatology: an overview of the problem. *Eur. J. Pain.*, v. 3, p. 105-109, 2009.
- MONTEIRO, R.D.C.; ZANINI, A.C. Análise de custo do tratamento medicamentoso da artrite reumatoide. *Brazilian J. Pharmac. Sci.*, v. 44, n. 1, p. 25-33, 2008.

- NAGAKURA, Y. et al. Allodynia and hyperalgesia in adjuvant-induced arthritic rats: time course of progression and efficacy of analgesics. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 306, p. 490–497, 2003.
- NARITA, S.M. et al. Role of interleukin-1 β and tumor necrosis factor-dependent expression of cyclooxygenase-2 RNAm in thermal hyperalgesia induced by chronic inflammation in mice. *Neurosci.*, v. 152, p. 477-486, 2008.
- NIEDERBERGER, E.; GEISSLINGER, G. The IKK-NF- κ B pathway: a source for novel molecular drug targets in pain therapy? *FASEB J.*, v. 22, p. 3432-3442, 2008.
- NORDAHL, S.; ALSTERGREN, P.; KOPP, S. tumor necrosis factor-alpha in synovial fluid and plasma from patients with chronic connective tissue disease and its relation to temporomandibular joint pain. *J Oral Maxillofac Surg.*, v. 58, n.5, p. 525-30, 2000.
- O'DELL, J.R. Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *N. Engl. J. Med.*, v. 350, p. 2591-2602, 2004.
- OGAWA, S. et al. Total synthesis and bioactivity of Resolvin E2. *Org. Lett.*, v. 16, p. 3602-3605, 2009.
- OSSIPOV, M.H. et al. Lack of involvement of capsaicin-sensitive primary afferents in nerve-ligation injury induced tactile allodynia in rats. *Pain*, v. 79, p. 127-133, 1999.
- PATAPOUTIAN, P.; TATE, S.; CLIFFORD, J.W. Transient receptor potential channels: targeting pain at the source. *Nat. Rev. Drug Discov.*, v. 8, p. 55-68, 2009.
- PIOMELLI, D., GREENGARD, P. Lipoxygenase metabolites of arachidonic acid in neuronal transmembrane signalling. *Trends Pharmacol. Sci.*, v. 11, n. 9, p. 367-373, 1990.
- PRICE, D.D. Central neural mechanisms that interrelate sensory and affective dimensions of pain. *Mol. Interv.*, v. 2, n. 6, p. 392-402, 2002.

- QUAN, L-D et al. The development of novel therapies for rheumatoid arthritis. *Expert Opin. Ther. Pat.*, v. 18, n. 7, p. 723-738, 2008.
- SAFIEH-GARABEDIAN, B. et al. Contribution of interleukin-1 β to the inflammation-induced increase in nerve growth factor levels and inflammatory hyperalgesia. *Br. J. Pharmacol.*, v. 115, p. 1265-1275, 1995.
- SALEM, N.Jr., et al. Arachidonic and docosahexaenoic acids are biosynthesized from their 18-carbon precursors in human infants. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 93, p. 49-54, 1996.
- SAMAD, T.A. et al. Interleukin-1 β -mediated induction of Cox-2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *Nature Letters*, v. 410, p.471-475, 2001.
- SAMUELSSON, B. et al. Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. *Science*, v. 237, p. 1171-1176, 1987.
- SCHAIBLE, H-G, GRUBB, B.D. Afferent and spinal mechanisms of joint pain. *Pain*, v. 55, p. 5-54, 1993.
- SCHAIBLE, H-G. et al. Pathophysiology and treatment of pain in joint disease. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, v. 58, p. 323-342, 2006.
- SCHAIBLE, H-G. et al. Joint pain. *Exp. Brain. Res.*, v. 196, p: 153-162, 2009.
- SCHAIBLE, H-G et al. The role of proinflammatory cytokines in the generation and maintenance of joint pain. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, v. 1193, p. 60-69, 2010.
- SCOTT, J.T. Morning stiffness in rheumatoid arthritis. *Ann. rheum. Dis.*, v. 19, p. 361-368, 1960.
- SEKI, H.; TANI, Y.; ARITA, M. Omega-3 PUFA derived anti-inflammatory lipid mediator resolvin E1. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, v. 89, p.126-130, 2009.

- SERHAN, C.N. Resolution phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways. *Annu. Rev. Immunol.*, v. 25, p. 101–137, 2007.
- SERHAN, C.N.; SAVILL, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nature Immunol.*, v. 6, n. 12, p. 1191-1197, 2005.
- SERHAN, C.N. et al. Novel functional sets of lipid-derived mediators with antiinflammatory actions generated from omega-3 fatty acids via cyclooxygenase 2–nonsteroidal anti-inflammatory drugs and transcellular processing. *J. Exp. Med.*, v. 192, n. 8, p. 1197-1204, 2000.
- SERHAN, C.N. 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.*, v. 196, n. 8, p. 1025-1037, 2002.
- SERHAN, C.N. et al. Resolvins, docosatrienes, and neuroprotectins, novel omega-3-derived mediators, and their aspirin-triggered endogenous epimers: an overview of their protective roles in catabasis. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, v. 73, p. 155–172, 2004.
- SERHAN, C.N. et al. Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. *FASEB J.*, v. 21, p. 325-332, 2007.
- SERHAN, C.N.; CHIANG, N.; VAN DYKE T.E. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat. Rev. Immunol.*, v. 8, p. 349-361, 2008.
- SERHAN, C.N.; YACOUBIAN, S.; YANG, R. Anti-inflammatory and proresolving lipid mediators. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, v. 3, p. 279-312, 2008.
- SHERWOOD, E.R., TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. *Best Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.*, v. 18, n. 3, p. 385-405, 2004.

- SILMAN, A.J.; PEARSON, J.E. Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.*, v. 4, n. 3, p. 265-272, 2002.
- SIMOPOULOS, Artemis P. Essential fatty acids in health and chronic disease. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 70, p. 560S–569S, 1999.
- SMOLEN, J. et al. Efficacy and safety of certolizumab pegol plus methotrexate in active rheumatoid arthritis: the RAPID 2 study: a randomised controlled trial. *Ann Rheum Dis.*, v. 68, p. 797-804, 2009.
- SOMMER, C.; KRESS, M. Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia. *Neurosci. Letters*, v. 361, p. 184-187, 2004.
- SPITE, M. et al. Resolvin D2 is a potent regulator of leukocytes and controls microbial sepsis. *Nat. Lett.*, v. 461, p. 1287-1292, 2009.
- STEIN, C. et al. Unilateral inflammation of the hindpaw in rats as a model of prolonged noxious stimulation: alterations in behavior and nociceptive thresholds. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, v. 2, p. 451–455, 1988.
- SUGIURA, Y. LEE, C.L., PERL, E.R. Central projections of identified, unmyelinated (C) afferent fibers innervating mammalian skin. *Science*, v. 234, p. 358-361, 1986.
- SUN, Y-P et al. Resolvin D1 and its aspirin-triggered 17R epimer: stereochemical assignments, anti-inflammatory properties, and enzymatic inactivation. *J. Biol. Chem.*, v. 282, n. 13, p. 9323-9334, 2007.
- SUNG, C-S et al. Intrathecal interleukin-1 β administration induces thermal hyperalgesia by activating inducible nitric oxide synthase expression in the rat spinal cord. *Brain Res.*, v. 1015, p. 145-153, 2004.
- SURETTE, M.E. et al. The impact of a medical food containing gammalinolenic and eicosapentaenoic acids on asthma

management and the quality of life of adult asthma patients. *Curr. Med. Res. Opin.*, v. 24, p. 559-567, 2008.

- SVENSSON, C.I.; ZATTONI, M.; SERHAN, C.N. Lipoxins and aspirin-triggered lipoxin inhibit inflammatory pain processing. *J. Exp. Med.*, v. 204, p 245-252, 2007.
- SWEITZER, S.M., et al. Acute peripheral inflammation induces moderate glial activation and spinal IL-1 β expression that correlates with pain behavior in the rat. *Brain Res.*, v. 829, p. 209-221, 1999.
- SWEITZER, S.; MARTIN, D.; DELEO, J.A. Intrathecal interleukin-1 receptor antagonist in combination with soluble tumor necrosis factor receptor exhibits an anti-allodynic action in a rat model of neuropathic pain. *Neurosci.*, v. 103, n. 2, p. 529-539, 2001.
- SZOLCSANYI, J. et al. Resiniferatoxin: an ultrapotent selective modulator of capsaicin-sensitive primary afferent neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 255, n. 2, p. 923-928, 1990.
- TJONAHEN, E., et al. Resolvin E2: identification and anti-inflammatory actions: pivotal role of human 5-lipoxygenase in resolvin E series biosynthesis. *Chem. Biol.*, v. 13, p. 1193-1202, 2006.
- VAN DER LINDEN, M.P. et al. Value of anti-modified citrullinated vimentin and third-generation anti-cyclic citrullinated peptide compared with second-generation anti-cyclic citrullinated peptide and rheumatoid factor in predicting disease outcome in undifferentiated arthritis and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, v. 60, p. 2232-2241, 2009.
- VAN EDEN, W; WAKSMAN, B.H. Immune regulation in adjuvant-induced arthritis: possible implications for innovative therapeutic strategies in arthritis. *Arthritis Rheum.*, v. 48, n. 7, p. 1788–1796, 2003.

- VAN EVERDINGEN, A.A. et al. Low-dose prednisone therapy for patients with early active rheumatoid arthritis: clinical efficacy, disease-modifying properties, and side effects. *Ann. Intern. Med.*, v. 136, p. 1-12, 2002.
- VAN VOLLENHOVEN, R.F. Treatment of rheumatoid arthritis: state of the art 2009. *Nat. Rev. Rheumatol.*, v.5, p. 531-541, 2009.
- VANE, J.R. et al. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, v. 38, p. 97-120, 1998.
- VARDEH, D. COX2 in CNS neural cells mediates mechanical inflammatory pain hypersensitivity in mice. *J. Clin. Invest.*, v. 119, p. 287-294, 2009.
- VERRI, W.A. Jr. et al. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development? *Pharmacol. Therap.*, v. 112, p. 116–138, 2006.
- VERRI, W.A. Jr. et al. Cytokine inhibitors and pain control. *Rev. Bras. Rheumatol.*, v. 47, n. 5, p. 341-353, 2007.
- VIVIER, E., MALISSEN, B. Innate and adaptive immunity: specificities and signaling hierarchies revisited. *Nature Immunol.*, v. 6, n. 1, p. 17-21, 2005.
- VON BANCHET, G.S. et al. Experimental arthritis causes tumor necrosis factor- α -dependent infiltration of macrophages into rat dorsal root ganglia which correlates with pain-related behavior. *Pain*, v. 145, p. 151-159, 2009.
- WANG, C.X. et al. Increase of interleukin-1 β mRNA and protein in the spinal cord following experimental traumatic injury in the rat. *Brain Res.*, v. 759, p. 190-196, 1997.
- WATKINS, L.R., MAIER, S.F. Beyond neurons: evidence that immune and glial cells contribute to pathological pain states. *Physiol. Rev.*, v. 82, p. 981-1011, 2002.

- WEGNER, N. et al. Autoimmunity to specific citrullinated proteins gives the first clues to the etiology of rheumatoid arthritis. *Immunol. Rev.*, v. 233, p. 34-54, 2010.
- WEISSMANN, G. Pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J. Clin. Rheumatol.*, v. 10, p. S26-S31, 2004.
- WILLOUGHBY, D.A. et al. Resolution of inflammation. *Int. J. Immunopharmacol.*, v. 22, n. 12, p. 1131-1135, 2000.
- WOOLF, C.J., SHORTLAND, P., COGGESHALL, R.E. Peripheral nerve injury triggers central sprouting of myelinated afferents. *Nature*, v. 355, p. 75-78, 1992.
- WOOLF, C.J. Reorganization of central terminals of myelinated primary afferents in the rat dorsal horn following peripheral axotomy. *J. Comp. Neurol.*, v. 360, n. 1, p. 121-134, 1995.
- WOOLF, C.J. et al. Cytokines, nerve growth factor and inflammatory hyperalgesia: the contribution of tumour necrosis factor- α . *Br. J. Pharmacol.* v. 121, p. 417-424, 1997.
- WOOLF, C.J., SALTER, M.W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science*, v. 288, p. 1765-1768, 2000.
- XU, Z.-Z., et al. Resolvins RvE1 and RvD1 attenuate inflammatory pain via central and peripheral actions. *Nature Med.*, v. 16, p. 592-597, 2010.
- YACOUBIAN, S.; SERHAN, C.N. New endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators: implications for rheumatic diseases. *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.*, v.3, n. 10, p. 570-579, 2007.
- ZHANG, Ling et al. TNF-alpha contributes to spinal cord synaptic plasticity and inflammatory pain: distinct role of TNF receptor subtypes 1 and 2. *Pain*, v. 152, p. 419-427, 2011.

- ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*, v. 16, n. 2, p. 109-110, 1983.

8. ANEXO

RESEARCH PAPER

The precursor of resolvin D series and aspirin-triggered resolvin D1 display anti-hyperalgesic properties in adjuvant-induced arthritis in rats

JF Lima-Garcia¹, RC Dutra¹, KABS da Silva¹, EM Motta¹, MM Campos² and JB Calixto¹

¹Department of Pharmacology, Centre of Biological Sciences, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil, and ²Faculty of Dentistry and Institute of Toxicology, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

Correspondence

João B Calixto, Department of Pharmacology, Centre of Biological Sciences, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário, Trindade, Bloco D-CCB – Cx. Postal: 476, Florianópolis, Santa Catarina, 88040-900, Brazil. E-mail: calixto@farmaco.ufsc.br; calixto3@terra.com.br

Keywords

RvD series precursor; 17(R)HDoHE; AT-RvD1; inflammatory pain; arthritis

Received

13 September 2010

Revised

4 February 2011

Accepted

7 February 2011

BACKGROUND AND PURPOSE

Resolution of inflammation is mediated by endogenous molecules with anti-inflammatory and pro-resolving activities and they have generated new possibilities for the treatment of inflammatory diseases. Here, we have investigated the possible anti-hyperalgesic effects of two lipids, aspirin-triggered resolvin D1 (AT-RvD1) and its precursor, 17(R)-hydroxy-4Z,7Z,10Z,13Z,15E,17R,19Z-docosahexaenoic acid (17(R)HDoHE).

EXPERIMENTAL APPROACH

The anti-hyperalgesic effects of both lipid mediators were evaluated, using mechanical and thermal stimuli, at different time-points in adjuvant-induced arthritis in rats. Cytokine levels were measured, and immunohistochemistry and real-time PCR for pro-inflammatory mediators were also performed.

KEY RESULTS

The precursor of resolvin D series, 17(R)HDoHE, given systemically, inhibited the development and the maintenance of mechanical hyperalgesia in acute inflammation. Such effects were likely to be associated with modulation of both NF- κ B and COX-2 in dorsal root ganglia and spinal cord. 17(R)HDoHE was also effective against sub-chronic pain. Unexpectedly, repeated treatment with 17(R)HDoHE did not modify paw and joint oedema in the sub-chronic model, while joint stiffness was prevented. Notably, AT-RvD1 exhibited marked anti-hyperalgesic effects in acute inflammation when given systemically. The efficacy of long-term treatment with either 17(R)HDoHE or AT-RvD1 was partly related to decreased production of TNF- α and IL-1 β in rat hind paw.

CONCLUSIONS AND IMPLICATIONS

Our findings provide fresh evidence for the anti-hyperalgesic properties of 17(R)HDoHE and its pro-resolution metabolite AT-RvD1. Such lipid mediators might be useful for treating pain associated with acute or chronic inflammation.

LINKED ARTICLE

This article is commented on by Xu and Ji, pp. 274–277 of this issue. To view this commentary visit <http://dx.doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01348.x>

Abbreviations

17(R)HDoHE, 17(R)-hydroxy-4Z,7Z,10Z,13Z,15E,17R,19Z-docosahexaenoic acid; AIA, adjuvant-induced arthritis; AT-RvD1, aspirin-triggered resolvin D1, 7S,8R,17R-trihydroxy-4Z,9E,11E,13Z,15E,19Z-docosahexaenoic acid; RA, rheumatoid arthritis

Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is a progressive and destructive chronic autoimmune disease of the joints, characterized by inflammation of the synovial membranes, joint stiffness and pain. Synovial inflammation is elicited by the infiltration of cells of the immune system into the joint and the release of pro-inflammatory and pro-nociceptive mediators (Firestein, 2003; Müller-Ladner *et al.*, 2005; Brennan and McInnes, 2008). Joint hyperalgesia is expressed in response to the inflammatory mediators, which may sensitize primary nociceptive fibres innervating the joints (Schaible and Grubb, 1993; Schaible *et al.*, 2002; Pinto *et al.*, 2010). During the last two decades, great efforts have been made to determine the mechanisms underlying the physiopathology of RA and also to develop new therapies to treat the devastating outcomes of this disease (Quan *et al.*, 2008; van Vollenhoven, 2009). Current therapy includes the disease-modifying anti-rheumatic drugs, such as methotrexate, and the biological agents, such as anti-TNF- α inhibitors and the newly approved anti-IL-6 receptor agent, tocilizumab. Moreover, non-steroidal anti-inflammatory drugs and the selective inhibitors of the COX-2 enzyme are also used for the treatment of joint pain. However, all these drugs have limited efficacy in most patients, and induce several side effects, such as gastrointestinal bleeding and/or perforation (Quan *et al.*, 2008; González *et al.*, 2010). Accordingly, new therapies with increased efficacy and without or with fewer side effects are urgently required for the treatment of joint pain.

Interesting potential candidates for such analgesics are the endogenous lipid mediators, such as lipoxins, resolvins, protectins and the newly described group of maresins, derived from ω -3-fatty acids (Sommer and Birklein, 2010), the latter demonstrating beneficial effects in pathological states, including Crohn's disease (Belluzzi *et al.*, 1996), coronary heart disease (GISSI-Prevenzione Investigators, 1999) and sudden cardiac death (Albert *et al.*, 2002). In addition, it was shown that i.v. administration of ω -3 fatty acids leads to clinical improvement of patients with RA (Leeb *et al.*, 2006). The two main ω -3 fatty acids present in fish oil are eicosapentaenoic acid (EPA, C20:5) and docosahexaenoic acid (DHA, C22:6).

The resolvins (resolution phase interaction products) are a family of lipid mediators derived from both EPA and DHA (Serhan *et al.*, 2000; 2002; Hong *et al.*, 2003), denoted the E series (RvE) and the D series (RvD) resolvins (Serhan *et al.*, 2002). DHA is the precursor for two groups of resolvins, referred to as the 17S- and 17R-resolvin D series, which are produced by different biosynthetic routes during the resolution phase of inflammation (Serhan *et al.*, 2002; Hong *et al.*, 2003). Endogenous DHA is converted *in vivo* via lipoxygenase (LOX)-catalysed mechanisms to the 17S-hydroxy-containing series of four resolvins, known as resolvin D1 to resolvin D4 (Serhan *et al.*, 2002; Hong *et al.*, 2003). Specifically, RvD1 biosynthesis involves sequential oxygenations by 15-LOX and 5-LOX. However, in the case of aspirin treatment, aspirin-acetylated COX-2 generates 17R-hydroxy-DHA, which on subsequent oxygenation by 5-LOX results in production of 17-epi-RvD1, also known as aspirin-triggered resolvin D1, (AT-RvD1) (Serhan *et al.*, 2002; Serhan and Clish, 2003; Serhan, 2004). Recently, the structural elucidation of

RvD1 and AT-RvD1 was confirmed by total organic synthesis and their complete stereochemistry were established as 7S, 8R, 17S-trihydroxy-4Z, 9E, 11E, 13Z, 15E, 19Z-docosahexaenoic acid and 7S, 8R, 17R-trihydroxy-4Z, 9E, 11E, 13Z, 15E, 19Z-docosahexaenoic acid respectively (Serhan *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2007).

The resolvins are not only anti-inflammatory, but they also promote resolution of the inflammation, back to the non-inflamed state (Gilroy *et al.*, 2004; Bannenberg *et al.*, 2005; Serhan, 2007; Serhan, 2009; Serhan *et al.*, 2009). Initially, Levy *et al.* (2001) have demonstrated a lipid mediator class switching during the spontaneous resolution of acute inflammatory response. Furthermore, RvDs were demonstrated to display anti-inflammatory actions in an animal model of kidney ischaemia/reperfusion (Duffield *et al.*, 2006). Specifically, both RvD1 and AT-RvD1 mediators limit the transendothelial migration (Serhan *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2007) and infiltration (Kasuga *et al.*, 2008) of polymorphonuclear (PMN) leukocytes *in vivo* and regulate leukocyte trafficking as well as clearance of neutrophils from mucosal surfaces (Campbell *et al.*, 2007). More recently, RvD1 was shown to diminish leukocyte and prostanoic generation in a murine model of oxidative stress, a common feature of the inflammatory process (Filep, 2009; Spite *et al.*, 2009).

Most of the work addressing the potential effects of pro-resolving lipid mediators has been concerned with inflammatory processes. Recent reports suggest that the resolvins RvE1 and RvD1 could modulate the nociceptive state that usually accompanies inflammatory disease (Svensson *et al.*, 2007; Bang *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2010). Therefore, considering the release of inflammatory mediators, such as cytokines and chemokines, which contribute to hyperalgesia, the major goal of this study was to evaluate the potential effect of the precursor of the resolvin D series, 17(R)HDoHE, as well as AT-RvD1, in modulating inflammatory pain and disease parameters in a rat model of arthritis. Efforts have also been made to investigate some of the mechanisms through which these mediators exert their anti-hyperalgesic actions.

Methods

Animals

All animal care and experimental procedures used in the present study followed the National Institute of Health Animal Care Guidelines (NIH publications) and were approved by the Ethics Committee of the Universidade Federal de Santa Catarina (Protocol Number 043/CEUA/PRPe/2008). The number of animals and intensity of noxious stimuli used were the minimum necessary to demonstrate consistent effects of the drug treatment. Male Hannover rats (180–250 g) kept under controlled temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) and humidity (60–80%) under a 12:12 h light–dark cycle were housed. Food and water were provided *ad libitum*, except during the experiments. The animals were acclimatized to the laboratory for at least 1 h prior to experimental procedures.

Complete Freund's Adjuvant (CFA)-induced inflammatory pain and arthritis

The protocol was conducted as previously described (Stein *et al.*, 1988). Briefly, animals were anesthetized with a mixture

of isoflurane-oxygen (2.5%–2.5%) and received an intraplantar (i.p.) injection of CFA emulsified in phosphate-buffered saline (PBS). CFA (1 mg·mL⁻¹ heat-killed and dried *M. tuberculosis*, each mL of vehicle containing 0.85 mL paraffin oil plus 0.15 mL mannide monooleate) and PBS were emulsified in a 1:1 ratio by the syringe-extrusion method with two syringes connected by a three-way stopcock until a stable emulsion was obtained (~5 min). Each animal received a total of 200 µL in the right hind paw (ipsilateral). This model of adjuvant-induced arthritis (AIA) allows us to initially evaluate the acute inflammatory pain, resulting in a progressive diffuse inflammatory reaction characteristic of arthritis (Bendele, 2001; Nagakura *et al.*, 2003).

Assessment of pain behaviour

Hind paw withdrawal response induced by von Frey hairs. Mechanical hyperalgesia induced by CFA was evaluated according to the method previously described (Nagakura *et al.*, 2003), with some modifications. Rats were placed individually in clear Plexiglas boxes (13.8 cm × 18.0 cm × 68.2 cm) on elevated wire mesh platforms (23.0 cm × 39.8 cm × 72.7 cm) to allow access to the plantar surface of both hind paws. The animals were acclimatized for at least 1 h prior to behavioural testing. The paw withdrawal response frequency (%), was quantified following 10 applications of 8.0 g von Frey Hairs (Stoelting, USA) with a duration of ~3 s each. Stimuli were applied on the plantar surface of each hind paw separately. The nociceptive responses were evaluated at different times (1 to 24 h, 72 h, 14 and 30 days), following CFA injection. All groups were evaluated before CFA injection in order to determine the baseline mechanical thresholds.

Thermal threshold evaluation. Thermal hyperalgesia of the hind paw was assessed using the plantar test (Ugo Basile, Italy), according to the methodology described already (Hargreaves *et al.*, 1988). Briefly, the rats were acclimatized to an apparatus consisting of individual Perspex boxes on an elevated glass table. An infrared radiant heat (40 W) source was directed to the plantar surface of the hind paw, and the time spent to remove the hind paw was defined as the paw withdrawal latency. The cut-off point was set at 20 s in order to prevent tissue damage. The apparatus was calibrated to give a paw withdrawal latency of approximately 15 s in naïve rats.

Evaluation of disease parameters: paw oedema, joint oedema and joint stiffness

Paw oedema and joint diameter. Oedema of both right (ipsilateral) and left (contralateral) hind paws were measured by means of a plethysmometer (Ugo Basile, Italy) before and at several times after the i.p. injection of CFA during the period of study (30 days). Moreover, the tibio-tarsal joint oedema was measured by means of a manual caliper oriented in a mediolateral plane across the joint line (McDougall *et al.*, 2009), with minimal compression of the joint. This parameter was evaluated in triplicate, and the mean value was used as an index of joint oedema.

Joint stiffness. The joint stiffness score was evaluated according to the method previously described (Nagakura *et al.*,

2003). The animals were restrained by the experimenter with one hand, and the bending and extension movement of the ankle joint (once in each direction) was conducted with the other hand. A score was attributed as the following: score 0, no restriction of movement; score 1, a restriction of movement in bending or extension; score 2, restrictions of movement in bending and extension.

Immunohistochemical studies

Rats were deeply anesthetized with 7% chloral hydrate (8 mL·kg⁻¹; i.p.) and perfused with fresh 4% paraformaldehyde in 0.2 M sodium phosphate, pH 7.4. Immunohistochemical analysis was performed on paraffin-embedded spinal cord (L4–L5) and in the dorsal root ganglion (DRG; L4–L5) (5 µm) sections using polyclonal rabbit anti-COX-2 (1:500) and monoclonal mouse anti-phospho-p65 NF-κB (1:500) antibodies, according to the method described previously with some modifications (Vitor *et al.*, 2009). After quenching of endogenous peroxidase with 1.5% hydrogen peroxide in methanol (v/v) for 20 min, high-temperature antigen retrieval was performed by immersion of the slides in a water bath at 95 to 98°C in 10 mM⁻¹ trisodium citrate buffer, pH 6.0, for 45 min. The slides were then processed using the VECTASTAIN Elite ABC reagent, according to the manufacturer's instructions. After the appropriate biotinylated secondary antibody, immune complexes were visualized with 0.05% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride + 0.03% H₂O₂ in PBS (for exactly 1 min), the reaction was stopped by means of washing the slides in water and counterstained with Harris's haematoxylin. Besides staining untreated animals as negative controls, sections were incubated with isotype-matched irrelevant primary antibodies, or the primary antibody was omitted. Despite antigen retrieval, these controls resulted in little or no staining. Images were acquired using a Sight DS-5 M-L1 digital camera connected to an Eclipse 50i light microscope (both from Nikon, USA). Settings for image acquisition were identical for control and experimental tissues. Five ocular fields per section (five mice per group) at 400× magnification, of the DRG and superficial (lamina I and II) and neck region (lamina V and VI) of the dorsal horn of spinal cord regions associated primarily with the termination of nociceptive primary afferents were captured and a threshold optical density was obtained using the NIH ImageJ 1.36b imaging software (NIH, USA). The nucleus proprius (lamina III and IV) and ventral horn of spinal cord were not evaluated. For all analysis, total pixels intensity was determined, and data was expressed as optical density.

RNA extraction and real-time PCR

Total RNA from spinal cord (L4–L5) and DRG (L4–L5) was extracted using the TRizol® protocol, and its concentration was determined using a NanoDrop 1100 (NanoDrop Technologies, USA). A reverse transcription assay was performed as described in the M-MLV Reverse Transcriptase protocol, according to the manufacturer's instructions. cDNA (300 ng) was amplified in triplicate using the TaqMan® Universal PCR Master Mix Kit with specific TaqMan Gene Expression target genes, the 3' quencher MGB and FAM-labelled probes for rat COX-2 (Rn00568225_m1), NF-κB (Rn01399583) and β-actin (Rn00667869_m1) that was used as an endogenous control

for normalization. The PCR reactions were performed in a 96-well Optical Reaction Plate (Applied Biosystems, USA). The thermocycler parameters were as follows: 50°C for 2 min, 95°C for 10 min, 50 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. Expression of the target genes was calibrated against conditions found in control animals (i.e. animals that had received vehicle).

Determination of cytokine levels

Levels of the pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-1 β were determined in spinal cord samples (lumbar segments L4–L5) and in the hind paw tissue as previously described (Manjavachi *et al.*, 2010). Briefly, samples were homogenized in phosphate buffer containing 0.05% Tween 20, 0.1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride, 0.1 mM benzethonium chloride, 10 mM ethylene diamine tetracetic acid and 20 UI aprotinin A. The homogenate was centrifuged at 7000 \times g for 10 min and supernatants were stored at -70°C until further analysis. Cytokine levels were evaluated using an ELISA kit according to the manufacturer's recommendations (R&D Systems, USA).

General protocols of treatment

The following series of experiments were designed to evaluate the potential effect of 17(R)HDoHE and AT-RvD1 on inflammatory pain and disease parameters, as well as the possible mechanisms of action in the AIA model in rats. (i) To determine the effect of the lipid precursor on the genesis of inflammatory hyperalgesia, the animals were pre-treated with 17(R)HDoHE (300 ng/i.p.), 30 min before the induction of AIA. (ii) In order to evaluate the effect of 17(R)HDoHE or AT-RvD1, after hyperalgesia had been already established, the animals were treated at different periods of the experimental model – development of hyperalgesia (the third day after AIA) – 17(R)HDoHE (300 ng/i.p.) and AT-RvD1 (100 or 300 ng/i.p.); sub-chronic inflammatory state (14th day after AIA) – 17(R)HDoHE (300, 600 or 900 ng/i.p.) and chronic inflammatory state (30th day after AIA) – 17(R)HDoHE (300 or 600 ng/i.p.). (iii) To assess the effects of repeated treatment with 17(R)HDoHE and AT-RvD1 to modulate the development of inflammatory hyperalgesia and pro-inflammatory mediators production, the animals were treated with 17(R)HDoHE (300 ng/i.p., given for 5 days, once a day) and AT-RvD1 (100 ng/i.p., given for 4 days, twice a day), starting 3 days after AIA induction. (iv) In order to further evaluate the possible mechanisms involved in the analgesic actions of 17(R)HDoHE, we next assessed whether systemic treatment with 17(R)HDoHE (300 ng/i.p., 3 days after AIA induction) was able to decrease the activation of NF- κ B and COX-2 in the DRG and the spinal cord. For this reason, 4 h after the last treatment, the DRG and lumbar spinal cord were collected and immunohistochemically evaluated as described above. (v) We also evaluate the possible effect of 17(R)HDoHE on mRNA levels of both NF- κ B and COX-2 in the spinal cord and DRG. For this purpose, 3 days after AIA, animals were treated with 17(R)HDoHE (300 ng/i.p.) and 4 h after treatment, the DRG and lumbar spinal cord were collected and processed for real-time PCR assay. (vi) In another set of experiments, we compared the analgesic efficacy of 17(R)HDoHE with standard, clinically used analgesics: indomethacin (5 mg \cdot kg $^{-1}$,

i.p.), morphine (0.5 mg \cdot kg $^{-1}$, s.c.), gabapentin (70 mg \cdot kg $^{-1}$, p.o.) and dexamethasone (5 mg \cdot kg $^{-1}$, s.c.) in AIA induced hyperalgesia. All experiments were conducted in a double-blinded manner.

Statistical analysis

The results are expressed as mean \pm SEM from 5–6 animals. Behavioural data were analysed by two-way analysis of variance (ANOVA) with repeated measures, followed by Bonferroni's *post hoc* test. The non-parametric Kruskal–Wallis test was employed for analysing ordinal parameters. For ELISA, immunohistochemistry and real-time PCR data, one-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test was used to determine the differences among groups. The accepted level of significance for the tests was $*P < 0.05$. All tests were performed using the GraphPad® 4 Software (USA).

Materials

17(R)HDoHE and AT-RvD1 were purchased from Cayman Chemicals (Ann Arbor, USA). CFA, dexamethasone, indomethacin, gabapentin, haematoxylin, eosin, hydrogen peroxide, tetramethylbenzidine, Tween-20, Tween-80, paraffin, PBS, sodium citrate, phenylmethylsulphonyl fluoride, paraformaldehyde, leupeptin, aprotinin, ethylene diamine tetracetic acid and benzethonium chloride were all purchased from Sigma Chemical Company (USA). Rabbit polyclonal anti-COX-2 was obtained from Cell Signaling Technology (USA). Rabbit polyclonal anti-phospho-p65 NF- κ B was obtained from Santa Cruz Biotech. Inc. (USA). Rat TNF- α and IL-1 β DuoSet kits were obtained from R&D Systems (USA). Morphine, sodium chloride and sodium phosphate were obtained from Merck (Germany). Acetone, xylol, ethyl alcohol and methyl alcohol were purchased from LabSynth (Brazil). Citric acid and sodium citrate were purchased from Merck (Brazil). Chloral hydrate was purchased from Vetec (Brazil). Harris's haematoxylin solution was purchased from Merck (Germany). 3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride and streptavidin-biotin peroxidase were obtained from Dako Cytomation (USA). Primers and probes for rat COX-2, NF- κ B and β -actin were purchased from Applied Biosystems (UK). All receptors and channel nomenclature follow Alexander *et al.* (2009).

Results

Effect of pretreatment with 17(R)HDoHE on the genesis of mechanical and thermal hyperalgesia in AIA in rats

Our model of AIA is one of the most commonly used animal models to assess the preclinical efficacy of potential new agents to treat arthritis (Hegen *et al.*, 2008). In order to evaluate the potential of 17(R)HDoHE in preventing the induction of mechanical and thermal hyperalgesia evoked by the acute inflammatory pain in response to AIA, rats were pretreated with 17(R)HDoHE (300 ng/i.p.), 30 min before the induction of AIA. The choice of the dose for each drug was based on pilot experiments (data not shown) and on previous data described in the literature (Dornelles *et al.*, 2009). In the present study, i.pl. administration of CFA into the right hind

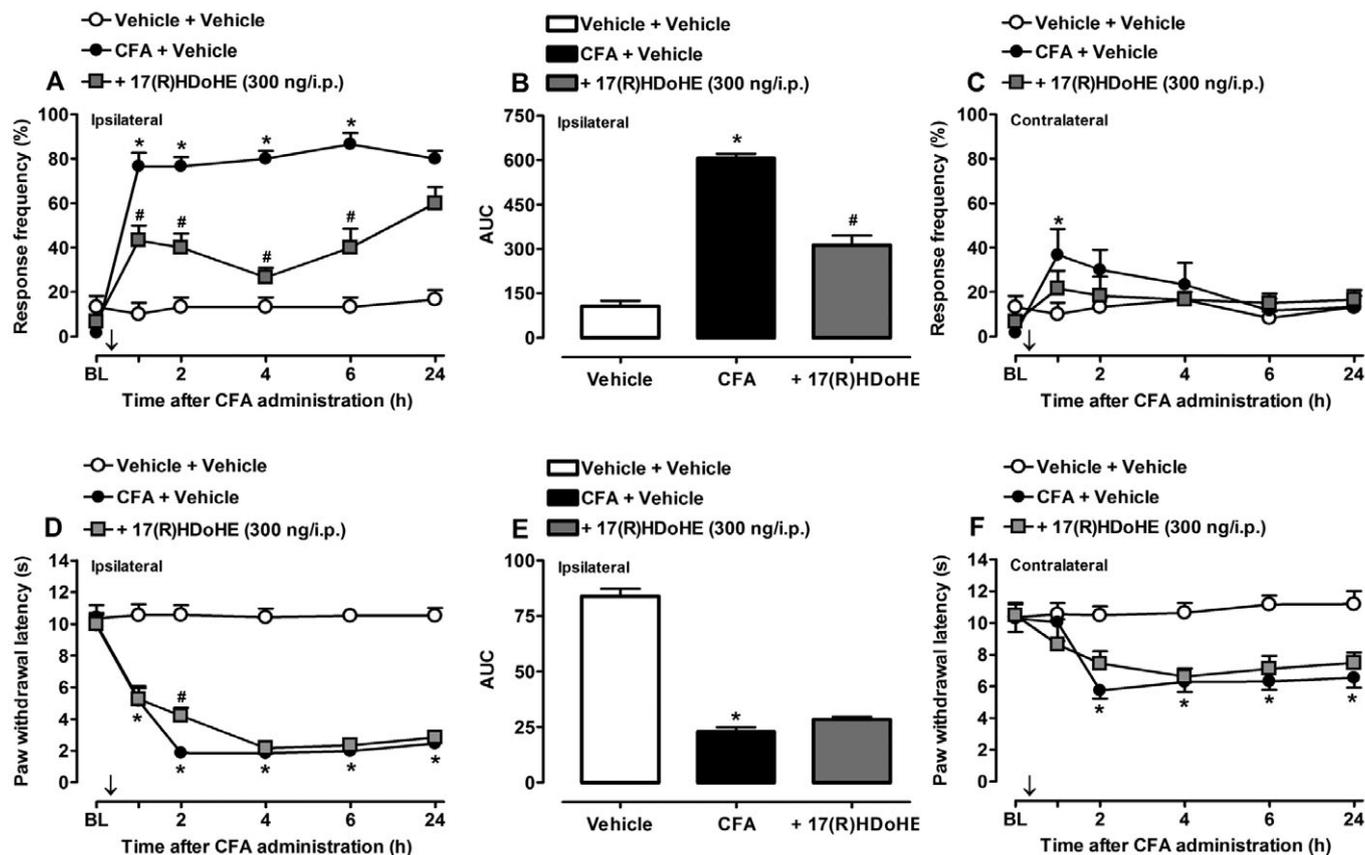


Figure 1

Pretreatment with the resolvin D series precursor, 17(R)HDoHE (300 ng/i.p., 30 min before), prevented the induction of mechanical (A,B) and thermal (D,E) hyperalgesia in ipsilateral hind paws of rats with adjuvant-induced arthritis (AIA). (C) and (F) represent mechanical and thermal hyperalgesia, respectively, in the contralateral hind paws of rats with AIA. Data are presented as the mean \pm SEM of five to six animals per group. * $P < 0.05$ and # $P < 0.05$ are significantly different from the vehicle and complete Freund's Adjuvant (CFA) groups respectively. The arrow (\downarrow) above X-axis represents the treatment with 17(R)HDoHE. BL, baseline.

paw markedly increased the mechanical (Figure 1A) and thermal hyperalgesia (Figure 1D) as early as 1 h after AIA induction ($P < 0.05$). Nonetheless, 1 h after pretreatment with 17(R)HDoHE, the animals displayed a significant reduction of the mechanical hyperalgesia, in the ipsilateral paw, compared with the control group. Moreover, 17(R)HDoHE exhibited its maximum effect 4 h after treatment and lasted for up to 6 h (Figure 1A,B). However, the pre-treatment with 17(R)HDoHE produced a moderate and transient reduction of the thermal hypersensitivity only at 2 h (Figure 1D,E). The mechanical and thermal threshold of the contralateral paw (Figure 1C,E,F) and the baseline threshold (data not shown) were not altered by pretreatment with 17(R)HDoHE.

Effect of post-treatment with 17(R)HDoHE on the development of mechanical and thermal hyperalgesia in AIA rats

As the resolvin D series precursor 17(R)HDoHE clearly prevented the genesis of mechanical, but only slightly affected that of the thermal hyperalgesia induced by AIA, we next attempted to evaluate whether 17(R)HDoHE could also

inhibit the same parameters in established inflammatory pain. Accordingly, 3 days after AIA induction, rats were treated with a single dose of 17(R)HDoHE (300 ng/i.p.), and mechanical and thermal hyperalgesia were evaluated as described previously. Interestingly, this therapeutic treatment with 17(R)HDoHE significantly inhibited the mechanical hyperalgesia in the ipsilateral paw from 1 h to 12 h, with an inhibition of about 59%, compared with AIA group ($P < 0.05$, $P < 0.001$) (Figure 2A,B), demonstrating the clinical relevance of treatment with 17(R)HDoHE after hyperalgesia is already established. Conversely, treatment with 17(R)HDoHE did not inhibit thermal hyperalgesia in ipsilateral hind paw (Figure 2D,E). Furthermore, the treatment with 17(R)HDoHE also failed to significantly modify the mechanical and thermal hyperalgesia in contralateral paws (Figure 2C,F).

Effect of classic clinically used drugs on the development of mechanical hyperalgesia in AIA rats

In order to compare the effect of the post-treatment with the precursor 17(R)HDoHE with classic drugs used in clinic

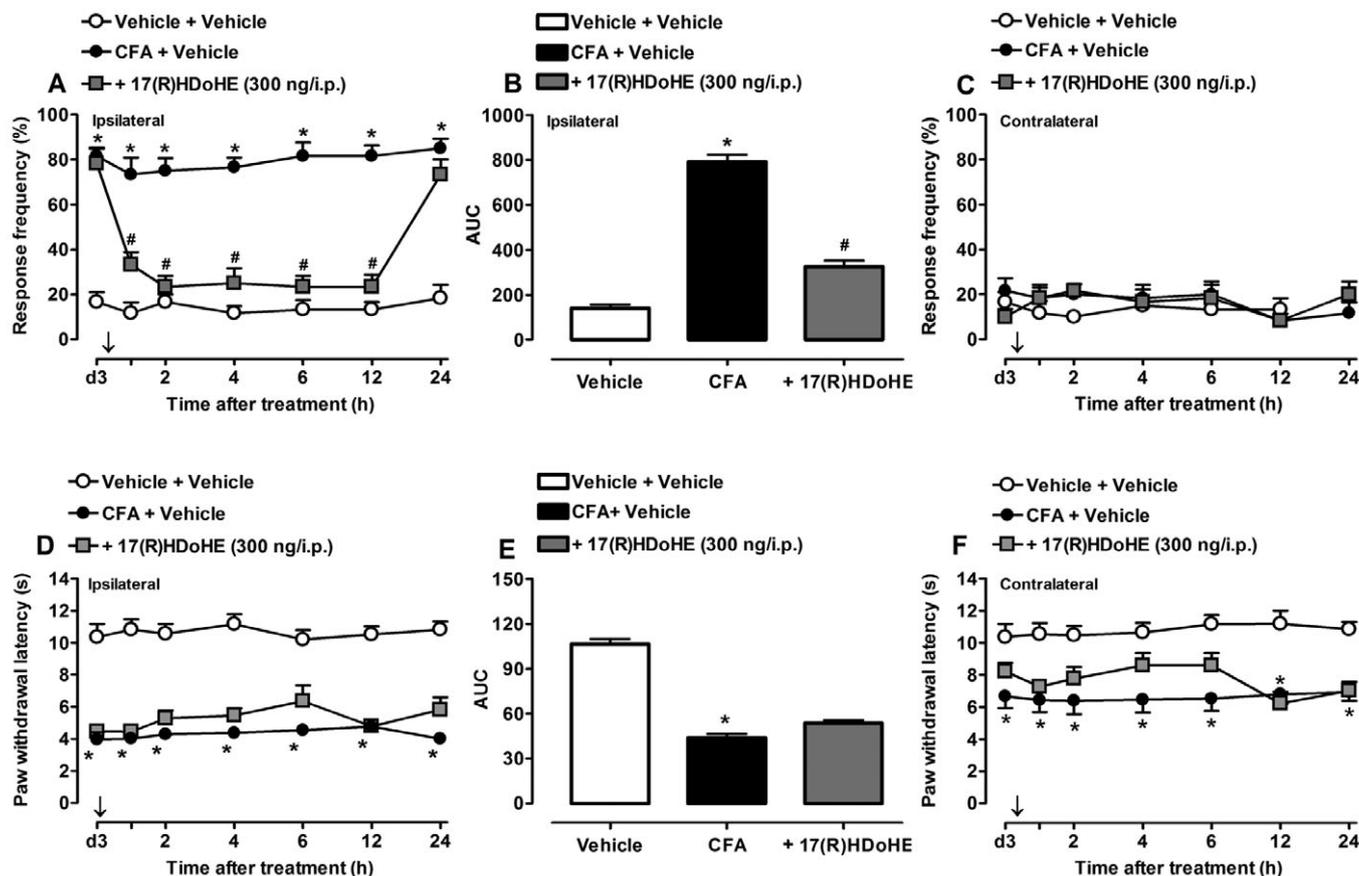


Figure 2

Post-treatment with 17(R)HDoHE (300 ng/i.p., 3 days after), almost abolished the mechanical (A,B) but not thermal (D,E) hyperalgesia in ipsilateral hind paws of rats with adjuvant-induced arthritis (AIA). (C) and (F) represent mechanical and thermal hyperalgesia, respectively, in the contralateral hind paws of rats with AIA. Data are presented as the mean \pm SEM of five to six animals per group. * $P < 0.05$ and # $P < 0.05$ are significantly different from the vehicle and complete Freund's Adjuvant (CFA) groups respectively. The arrow (\downarrow) above X-axis represents the treatment with 17(R)HDoHE; d3, day 3 after AIA induction.

for the treatment of painful states, 3 days after AIA induction, the rats were treated with a single dose of 17(R)HDoHE (300 ng/i.p.), or the non-selective COX inhibitor indomethacin (5 mg·kg⁻¹, i.p.), morphine (0.5 mg·kg⁻¹, s.c.), an opioid analgesic drug, gabapentin (70 mg·kg⁻¹, p.o.), an anti-epileptic drug, or dexamethasone (5 mg·kg⁻¹, s.c.), a glucocorticoid agent. Injection of CFA into the rat hind paw induced a significant reduction in nociceptive threshold, which was strongly inhibited by post-treatment with the precursor 17(R)HDoHE, with an inhibition of $72 \pm 3\%$ (Table 1). However, post-treatment with indomethacin, morphine and gabapentin resulted in less inhibition of mechanical hyperalgesia, inhibitions of $35 \pm 5\%$, $34 \pm 4\%$ and $42 \pm 4\%$ respectively (Table 1). Conversely, the treatment with dexamethasone (5 mg·kg⁻¹, s.c.) caused a mild but statistically not significant ($12 \pm 3\%$) reduction in the mechanical hyperalgesia induced by adjuvant arthritis (Table 1). All drugs were administered 1 h before the measurement of pain parameters, with exception of dexamethasone, which was given 4 h before evaluation.

Effect of post-treatment with 17(R)HDoHE on the mechanical and thermal hyperalgesia in a sub-chronic and chronic inflammatory state in AIA rats

Here, we addressed the possible effects of 17(R)HDoHE in the mechanical and thermal hyperalgesia in a sub-chronic inflammatory pain state. To achieve this, we decided to treat the animals 14 days after AIA induction, when the animals started to present signs of systemic inflammation of the joints (i.e. joint stiffness and paw oedema in both ipsi- and contralateral hind paws), that is, parameters related to development of the arthritis. Fourteen days after AIA, the animals were treated with a single dose of 17(R)HDoHE (300, 600 or 900 ng/i.p.) and both mechanical and thermal hyperalgesia were evaluated. As shown in Figure 3A, the low dose of 17(R)HDoHE (300 ng/i.p.) was not able to inhibit the mechanical hyperalgesia induced by AIA. On the other hand, when rats were treated with higher doses (600 and 900 ng/i.p.) a significant reduction of mechanical hyperalgesia was observed for up to 6 h after treatment ($P < 0.05$) (Figure 3A,B).

Table 1

Effect of 7(R)HDoHE and different classes of drugs in a rat model of AIA

Drug	Mechanism of action	Dose	Inhibition (%) ^a
17(R)HDoHE	Unknown	300 ng/i.p.	72 ± 3*
Indomethacin	Cyclooxygenase inhibitor	5 mg·kg ⁻¹ (i.p.)	35 ± 5*
Morphine	Opioid analgesic	0.5 mg·kg ⁻¹ (s.c.)	34 ± 4*
Gabapentin	Anti-epileptic	70 mg·kg ⁻¹ (p.o.)	42 ± 4*
Dexamethasone	Glucocorticoid	5 mg·kg ⁻¹ (s.c.)	12 ± 3

Asterisk denote significant differences from CFA-treated group (**P* < 0.05).

^aMean ± SEM (*n* = 5–6 rats/group). The inhibition is given as the difference (in percentage) between the mean area under the time-response curve (1–6 h values) of the responses in the drug-treated group and in relation to the CFA-treated group. All drugs were administered on the third day after induction of adjuvant arthritis. 17(R)HDoHE, indomethacin, morphine and gabapentin were administered 1 h before and dexamethasone 4 h before the evaluation of pain response.

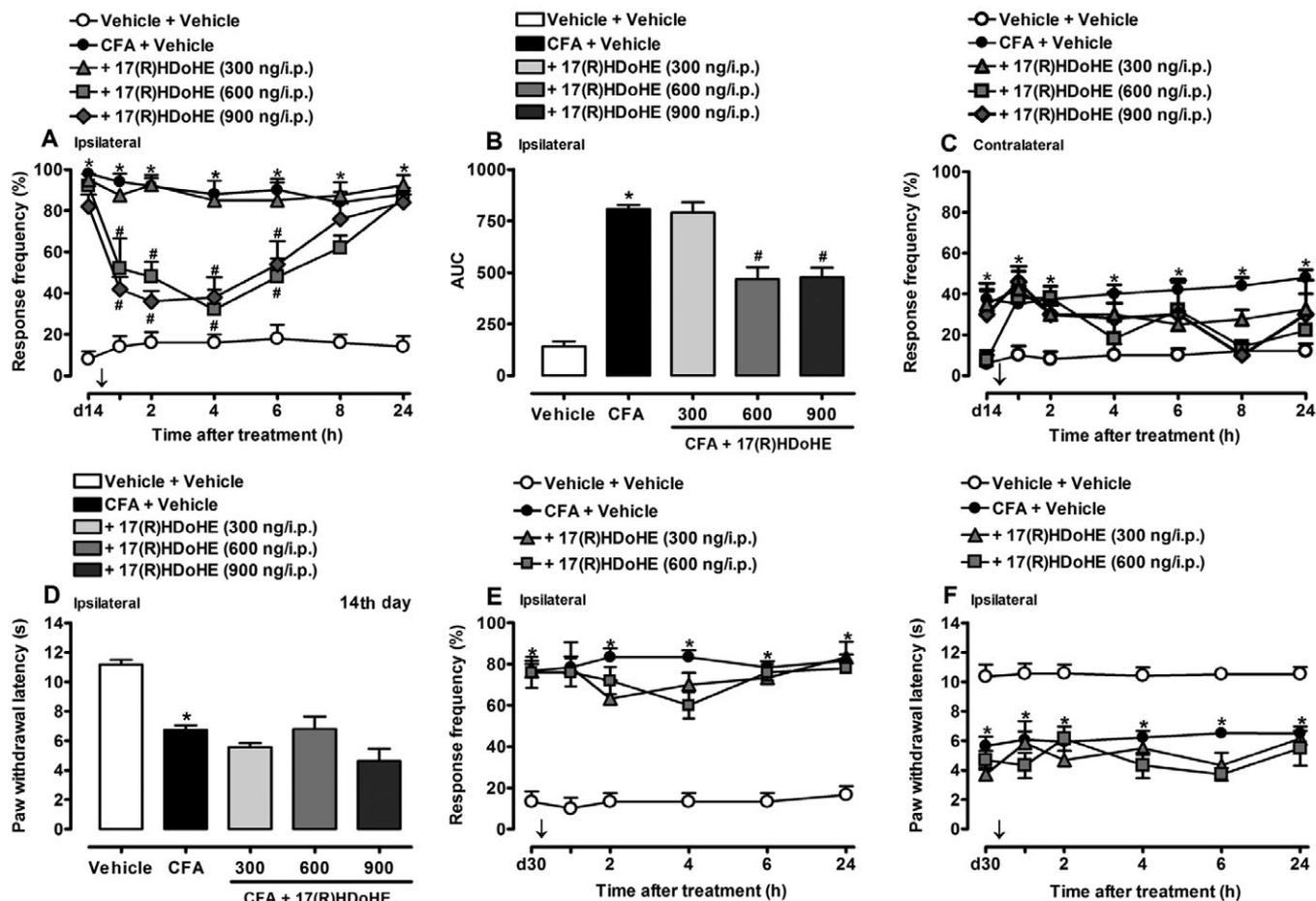


Figure 3

Post-treatment with 17(R)HDoHE (300, 600 or 900 ng/i.p., 14 days after), diminished mechanical (A,B) but not thermal (D) hyperalgesia in ipsilateral hind paws of rats with adjuvant-induced arthritis (AIA). (C) Represents the mechanical hyperalgesia in the contralateral hind paws of rats with AIA. Post-treatment with 17(R)HDoHE (300 or 600 ng/i.p., 30 days after) did not alter mechanical (E) nor thermal (F) hyperalgesia in ipsilateral hind paws of rats with AIA. Data are presented as the mean ± SEM of five to six animals per group. **P* < 0.05 and #*P* < 0.05 are significantly different from the vehicle and complete Freund's Adjuvant (CFA) groups respectively. The arrow (↓) above X-axis represent the treatment with 17(R)HDoHE; d14, day 14 after AIA induction; d30, day 30 after AIA induction.

None of the tested doses of 17(R)HDoHE (300, 600 and 900 ng/i.p.) was effective in inhibiting the mechanical hyperalgesia in the contralateral hind paw (Figure 3C). Also, thermal hyperalgesia evaluated 4 h after 17(R)HDoHE administration was not significantly inhibited by any of the tested doses of 17(R)HDoHE (Figure 3D). Finally, when evaluated in a established chronic inflammatory state (i.e. 30 days after AIA induction), 17(R)HDoHE (300 and 600 ng/i.p.) was not effective in inhibiting either mechanical or thermal hyperalgesic responses (Figure 3E,F).

Effect of 17(R)HDoHE on clinical signs of arthritis

Animals treated with a single dose of 17(R)HDoHE (300 ng/i.p.) 30 min before, 3 days and 30 days after AIA induction did not display any significant alterations in paw oedema, joint oedema and joint stiffness of both ipsi- and contralateral hind paws (data not shown). However, when animals received 17(R)HDoHE (300 ng/i.p.) for 6 consecutive days beginning on day 14 after AIA induction, the development of joint stiffness (Figure 4A), but not paw and joint oedema (Figure 4C,E), was significantly attenuated in comparison with AIA group ($P < 0.05$). No significant alterations were detected in the contralateral paws (Figure 4B,D,E).

Effect of post-treatment with AT-RvD1 on the mechanical hyperalgesia in AIA rats

AT-RvD1 is one of the resolvins of the D series that can be produced by the metabolism of the precursor 17(R)HDoHE (Serhan *et al.*, 2002). Thus, we addressed the potential of AT-RvD1 to inhibit the development of mechanical hyperalgesia in the established acute inflammatory state (the third day after AIA induction). As shown in Figure 5A,B, a single dose of AT-RvD1 (100 or 300 ng/i.p.) significantly inhibited the hyperalgesia caused by i.pl. injection of CFA for up to 6 h ($P < 0.05$). The treatment with AT-RvD1 did not significantly alter the baseline threshold of mechanical nociception (data not shown).

Effect of repeated treatment with 17(R)HDoHE or AT-RvD1 on the mechanical hyperalgesia in AIA rats

In the next series of experiments, we assessed the ability of repeated treatment with 17(R)HDoHE and AT-RvD1 to inhibit the development of inflammatory hyperalgesia, as assessed 3 days after AIA induction. As shown in Figure 5C, systemic treatment with 17(R)HDoHE (300 ng/i.p.; given once a day, for 5 days) inhibited the mechanical hyperalgesia induced by i.pl. CFA, an effect that lasted for up to 6 h (Figure 5C) with a reduction of 48% ($P < 0.05$) (Figure 5D). In addition, repeated treatment with AT-RvD1 (100 ng/i.p.; given for 4 days, twice a day) markedly inhibited the development of inflammatory hyperalgesia induced by i.pl. CFA-injection, as assessed 3 days after AIA induction, an effect that lasted for up to 6 h (Figure 5E) with an inhibition of 34% ($P < 0.05$) (Figure 5F).

Effect of repeated treatment with 17(R)HDoHE or AT-RvD1 on the levels of the pro-inflammatory cytokines in spinal cord and hind paw tissue of AIA rats

By the end of the repeated treatment with 17(R)HDoHE (300 ng/i.p.; for 5 days; once a day) or AT-RvD1 (100 ng/i.p.; for 4 days; twice a day), as described above, the spinal cord and paw tissue of both hind paws (ipsi- and contralateral) were collected and TNF- α and IL-1 β levels were determined by ELISA assay. As expected, AIA resulted in a significant enhancement in the levels of both TNF- α and IL-1 β in the ipsilateral hind paw tissue ($P < 0.05$) (Figure 6A–D). Repeated treatment with 17(R)HDoHE resulted in a significant decrease of both TNF- α (Figure 6A) and IL-1 β (Figure 6B) in the ipsilateral hind paw tissue ($P < 0.05$), but not in the spinal cord (Figure 6E,F). Moreover, treatment with AT-RvD1 was more effective in reducing the levels of TNF- α (Figure 6C) than IL-1 β (Figure 6D) in the hind paw tissue ($P < 0.05$). Similar to 17(R)HDoHE treatment, AT-RvD1 did not significantly reduce the levels of both cytokines in the spinal cord (Figure 6G,H).

Effect of 17(R)HDoHE on NF- κ B and COX-2 immunostaining in the spinal cord and DRG of AIA rats

To further define some of the signalling pathways that could mediate the analgesic effects of 17(R)HDoHE, we assessed, using immunohistochemical assays, the actions of 17(R)HDoHE (300 ng/i.p.), 4 h after treatment, on the activation of the transcription factor NF- κ B or COX-2 expression in (L4–L5) and superficial (lamina I and II) and neck region (lamina V and VI) of the dorsal horn of spinal cord. As expected, AIA led to a pronounced phosphorylation of the p65 subunit of NF- κ B (Figure 7) and increased COX-2 expression (Figure 7) ($P < 0.05$), either in the superficial and neck region of the dorsal horn of spinal cord, or in the DRG neurons (L4–L6), which correlates with persistent inflammatory hypersensitivity. Relevantly, treatment with 17(R)HDoHE (300 ng/i.p.) significantly reduced the activation of NF- κ B ($P < 0.05$) and inhibited the increase of COX-2 expression ($P < 0.05$) in the dorsal horn of lumbar spinal cord (Figure 7A,C,E) and in DRG neurons (Figure 7B,D,F).

Effect of 17(R)HDoHE on NF- κ B and COX-2 mRNA levels in the spinal cord and DRG of AIA rats

Another set of experiments was conducted to evaluate the effect of 17(R)HDoHE on NF- κ B and COX-2 mRNA levels in both the lumbar spinal cord and DRG of rats subjected to AIA. As can be seen in Figure 8, the mRNA levels of the transcription factor NF- κ B were not modified either in the spinal cord (Figure 8A) or in the DRG (Figure 8C), 3 days after AIA induction. However, in the same period of evaluation, COX-2 mRNA levels were increased in the spinal cord (Figure 8B), but not in the DRG (Figure 8D). Furthermore, treatment with 17(R)HDoHE decreased COX-2 mRNA levels in the spinal cord (Figure 8B).

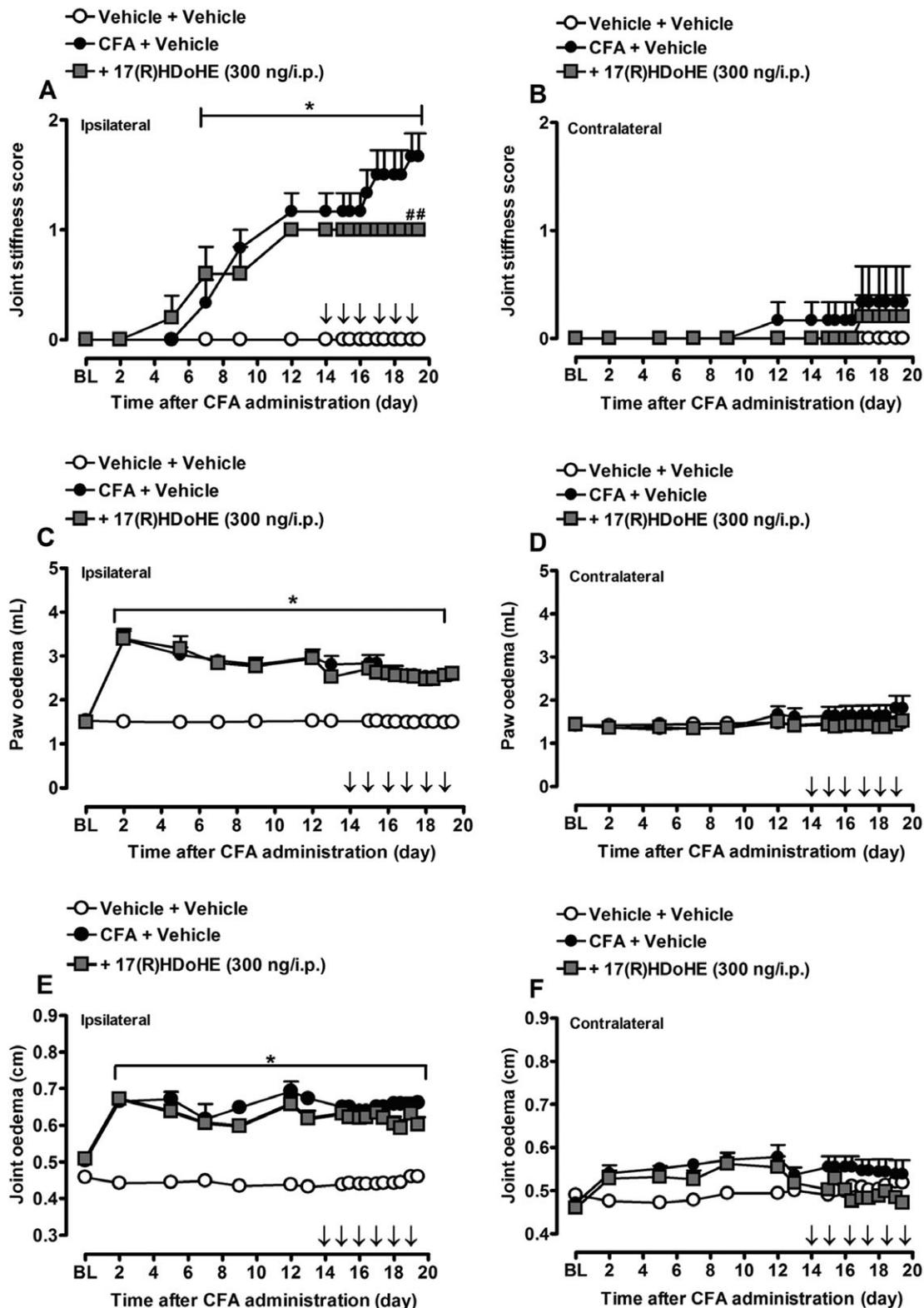


Figure 4

Repeated post-treatment with 17(R)HDoHE (300 ng/i.p., 14 days after AIA induction, for 6 days, once a day), prevented joint stiffness score (A) but not paw (C) and joint oedema (E) increase in ipsilateral hind paws of rats with adjuvant-induced arthritis (AIA). (B), (D) and (F) represent joint stiffness score, paw and joint oedema, respectively, of contralateral hind paw of rats with AIA. Data are presented as the mean \pm SEM of five to six animals per group. * $P < 0.05$ and ## $P < 0.05$ are significantly different from the vehicle and complete Freund's Adjuvant (CFA) groups respectively. The arrow (\downarrow) above X-axis represents the treatment with 17(R)HDoHE. BL, baseline.

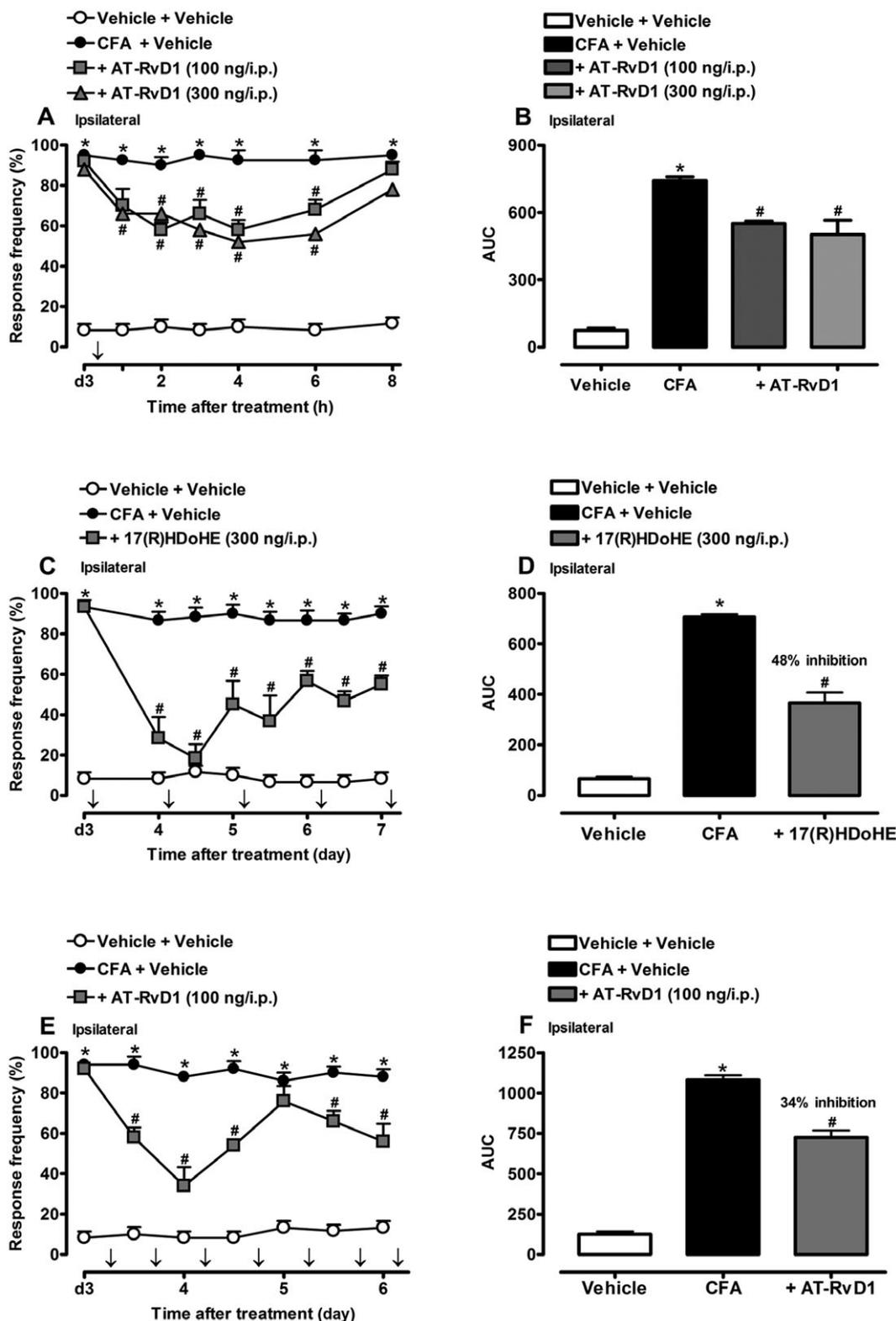
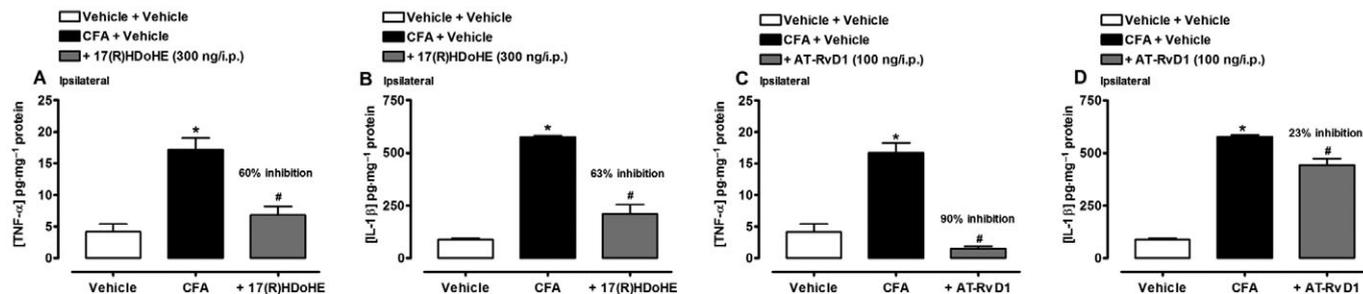


Figure 5

Post-treatment with AT-RvD1 (100 or 300 ng/i.p., 3 days after) (A,B), with the resolvins D series precursor 17(R)HDoHE (300 ng/i.p., 3 days after, for 5 days) (C,D) or with AT-RvD1 (100 ng/i.p., 3 days after, for 4 days) (E,F) partially inhibited mechanical hyperalgesia (ipsilateral hind paw) induced by adjuvant-induced arthritis (AIA). Data are presented as the mean \pm SEM of four to six animals per group. * $P < 0.05$ and # $P < 0.05$ are significantly different from the vehicle and complete Freund's Adjuvant (CFA) groups respectively. The arrow (\downarrow) above X-axis represent the treatment with AT-RvD1 or 17(R)HDoHE.; d3, day 3 after AIA induction.

Paw Tissue



Spinal Cord

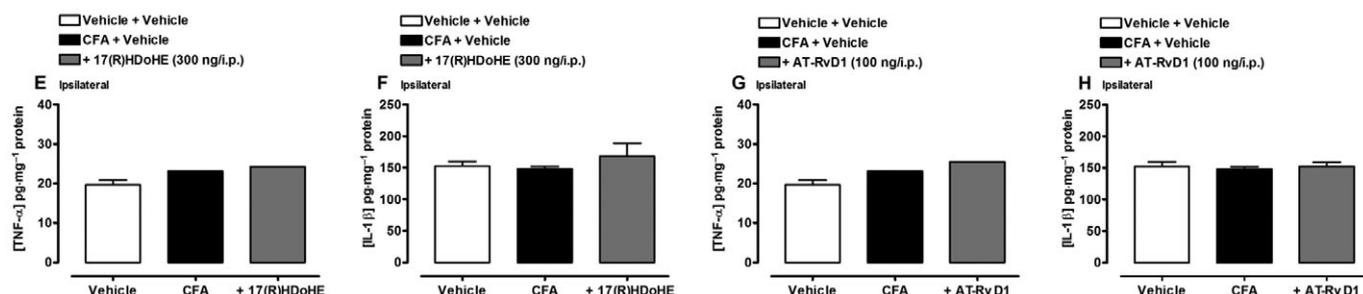


Figure 6

Repeated post-treatment with 17(R)HDoHE, or AT-RvD1 attenuated TNF- α and IL-1 β levels in rat hind paw tissue, but not in the spinal cord after induction of adjuvant arthritis (AIA). TNF- α and IL-1 β levels in the paw tissue (A–D) and in the spinal cord (E–H) after 17(R)HDoHE (300 ng/i.p., 3 days after, for 5 days, once a day) and AT-RvD1 (100 ng/i.p., 3 days after, for 4 days, twice a day) treatment respectively. Data are presented as the mean \pm SEM of four to six animals per group. * $P < 0.05$ and # $P < 0.05$ are significantly different from the vehicle and complete Freund's Adjuvant (CFA) groups respectively.

Discussion and conclusions

The main results emerging from the present study are, to the best of our knowledge, the first evidence showing that systemic administration of the resolvin D series precursor [17(R)HDoHE] or the aspirin-triggered resolvin D1 epimer (AT-RvD1) caused pronounced and long-lasting anti-hyperalgesic effects when assessed in a model of AIA in rats. Our data also show that mechanisms underlying the anti-hyperalgesic actions of 17(R)HDoHE and AT-RvD1 were primarily associated with the inhibition of pro-inflammatory and pro-nociceptive mediators, namely TNF- α and IL-1 β , and through the blockade of COX-2 expression and NF- κ B activation.

The AIA is a well-characterized model of persistent hyperalgesia, which progresses to chronic inflammation of the joints (Hegen *et al.*, 2008). It is well known that the release of several pro-inflammatory mediators, for example, prostaglandin E₂ and pro-inflammatory cytokines such as TNF- α and IL-1 β , occurs after an inflammatory insult in the periphery, which in turn promotes nociceptor sensitization and a decrease in nociceptive threshold (Kassuya *et al.*, 2007; Coderre, 2009; Schaible *et al.*, 2009; Uçeyler *et al.*, 2009). Furthermore, IL-1 β also produces inflammation and induces synthesis of several nociceptor sensitizers and directly activates nociceptors to induce pain hypersensitivity (Binshtok *et al.*, 2008). Thus, the inhibition of mechanical hyperalgesia

observed soon after 17(R)HDoHE administration might be a result of an indirect modulation of nociceptor sensitization, because the precursor could attenuate the onset of inflammation and consequently the release of pro-inflammatory mediators, diminishing sensitization of afferent fibres.

In the present study, we observed that 17(R)HDoHE has suppressed the mechanical but not the thermal hyperalgesia induced by CFA. Earlier studies have demonstrated differences between tactile allodynia and thermal hyperalgesia, that is, the former being mediated through large diameter A β afferent fibres, and the latter being mediated through small diameter unmyelinated C-fibres (Xu *et al.*, 1997; Ossipov *et al.*, 1999). In addition, rats that received capsaicin neonatally (significantly reducing the number of C-fibres) failed to develop thermal hyperalgesia, but displayed heightened responses to mechanical nociceptive stimuli after chronic constriction injury (Shir and Seltzer, 1990). Therefore, during CFA-induced inflammation, the mechanism responsible for thermal hyperalgesia seems likely to be different from that of the mechanical hyperalgesia (Leem *et al.*, 2001). Also, it has been suggested that thermal hyperalgesia involves both spinal and supraspinal circuits, while mechanical allodynia depends on a supraspinal loop (Wegert *et al.*, 1997). This difference might reflect that afferent inputs might be associated with different types of fibre. It is tempting to suggest that 17(R)HDoHE might modulate inflammatory pain via sensitization of central and/or peripheral A β afferent fibres, mainly

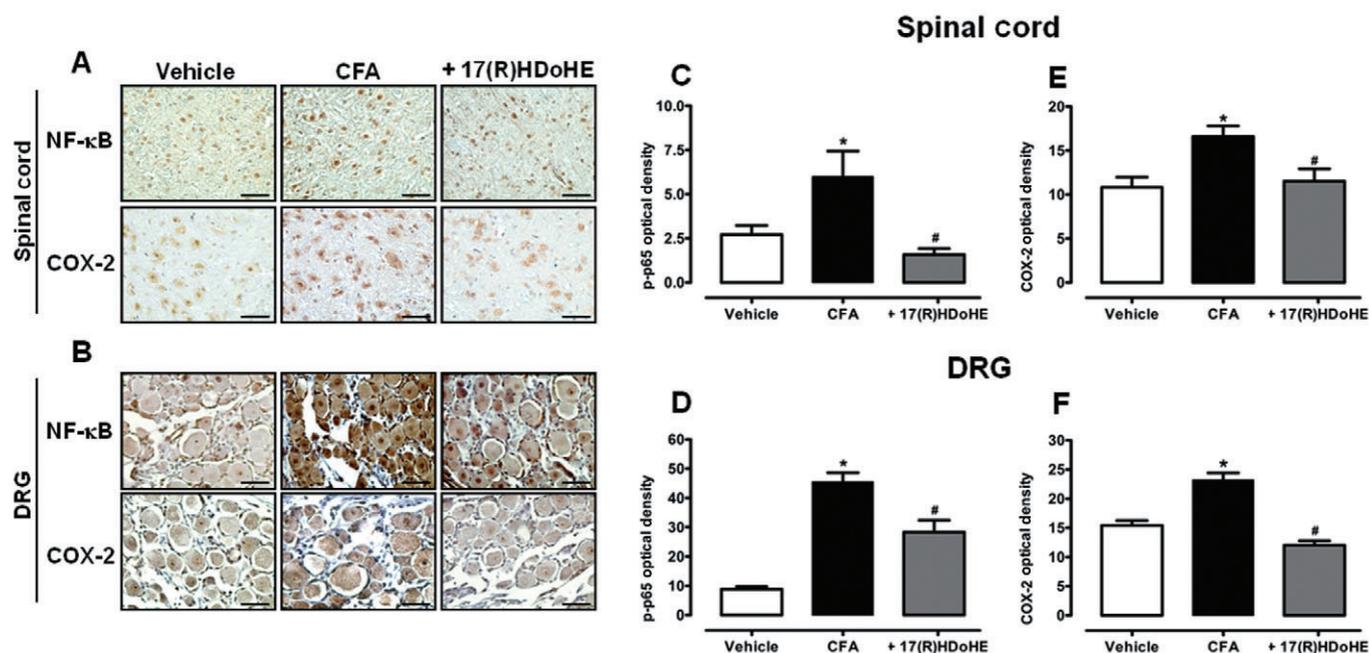


Figure 7

A single treatment with 17(R)HDoHE (300 ng/i.p., 3 days after), inhibited the increase of NF-κB and COX-2 in the spinal cord and dorsal root ganglion (DRG) of rats with adjuvant-induced arthritis (AIA). Representative images of NF-κB (upper panel) and COX-2 (lower panel) immunoreactivity in the spinal cord (A) and DRG (B) (scale bar = 100 μM). Graphic representation of the NF-κB (C,D) and COX-2 (E,F) immunostaining in the spinal cord and DRG respectively. Data are presented as the mean ± SEM of five to six animals per group. * $P < 0.05$ and # $P < 0.05$ are significantly different from the vehicle and complete Freund's Adjuvant (CFA) group respectively.

in the supraspinal circuits. However, additional experiments are needed to verify this hypothesis.

Concerning the parameters related to the disease model evaluated here (i.e. paw oedema, joint oedema and stiffness score), the marked prevention of joint stiffness by the treatment with 17(R)HDoHE is of great relevance, because one of the most common complaints of patients with arthritis is stiff joints, which together with joint pain results in great disability (Crocì and Zarini, 2007; Montecucco *et al.*, 2009).

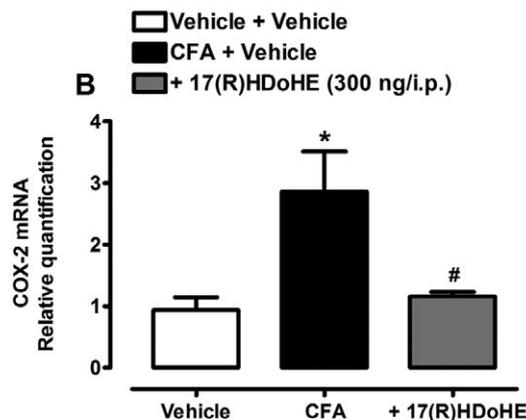
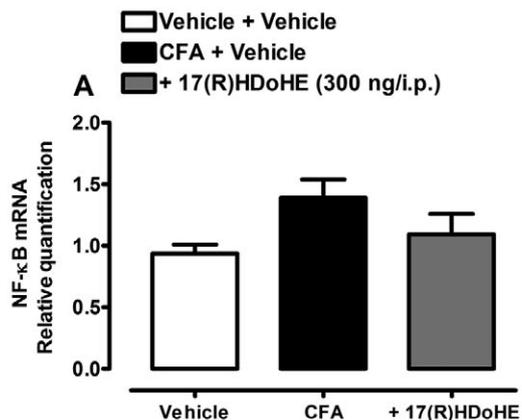
AT-RvD1 can be generated from 17(R)HDoHE in the presence of aspirin by a series of reactions that include enzymatic epoxidation and hydrolysis (Sun *et al.*, 2007; Serhan *et al.*, 2008). In murine peritonitis, RvD1 was found to be equipotent to AT-RvD1, limiting PMN infiltration in a dose-dependent fashion (Sun *et al.*, 2007). Our present results demonstrated that AT-RvD1, when administered at relatively low doses (100–300 ng), 3 days after AIA induction raised the threshold of mechanical hyperalgesia, demonstrating that not only the precursor 17(R)HDoHE, but also one of its end products, AT-RvD1, was very effective in modulating the acute inflammatory pain observed in the AIA model. However, we cannot rule out the possible conversion of the precursor 17(R)HDoHE to other 17R-RvD series, because previous studies have suggested that this precursor could generate different aspirin-triggered resolvins (Serhan *et al.*, 2000; 2002; Hong *et al.*, 2003). Furthermore, the possible conversion of 17(R)HDoHE to AT-RvD1 requires cells that possess 5-LOX, which is present or may be induced in several types of cells during inflammation, for example, in the paw, peripheral nerve fibre, infiltrated neutrophils, neurons in the spinal

cord and DRG, and therefore might be a site of aspirin-triggered resolvins biosynthesis (Cortes-Burgos *et al.*, 2009). Thus, because 17(R)HDoHE may be endogenously converted to other members of the AT-RvD series, that is, AT-RvD1 or AT-RvD2, we cannot be sure that the anti-hyperalgesic effect of 17(R)HDoHE observed in this study could be attributed to the molecule itself or the formation of other pro-resolution metabolites at the inflammatory site. Further studies would be required to confirm this hypothesis.

Extensive data already published has highlighted the involvement of pro-inflammatory cytokines as mediators of inflammatory pain (Firestein, 2003; Schaible *et al.*, 2006; 2009). Here, the reduction of mechanical hyperalgesia observed following repeated treatment with 17(R)HDoHE or AT-RvD1 might be, at least in part, due to their ability to decrease TNF-α and IL-1β in the rat paw. Recently, Xu *et al.*, (2010) have reported a marked analgesic effect of resolvin E1 (RvE1) in several models of acute and persistent pain by regulating production of pro-inflammatory cytokines. In addition, RvD1 was shown to possess acute antinociceptive effect in several inflammatory conditions, probably due to inhibition of thermoTRP channels, including TRPA1, TRPV3 and TRPV4 (Bang *et al.*, 2010). Thus, our results reinforce and extend the recently discovered analgesic properties of AT-RvD1 and its precursor, by showing that these lipids regulate the levels of important pro-inflammatory cytokines.

We have confirmed earlier data by showing that peripheral inflammation resulting from AIA increases the activation of NF-κB in both spinal cord and DRG (Chan *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2004). Noteworthy, we have demonstrated that

Spinal Cord



DRG

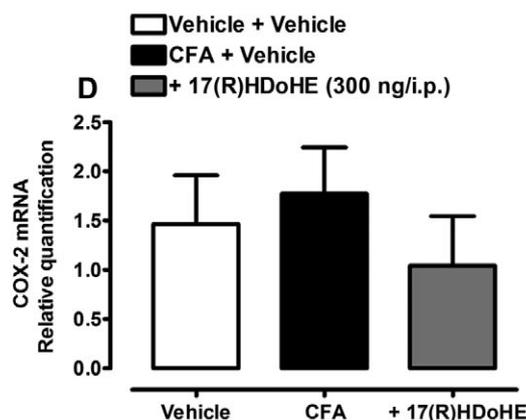
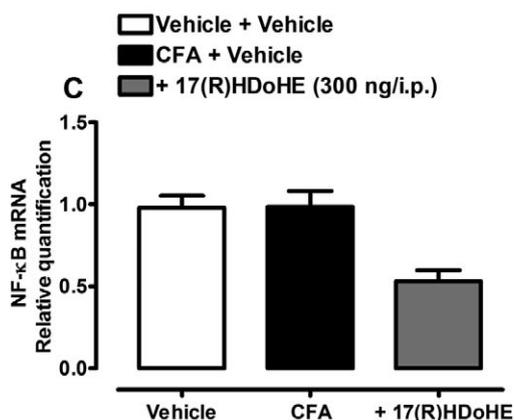


Figure 8

A single treatment with 17(R)HDoHE (300 ng/i.p., 3 days after), modulates (COX-2 mRNA levels in the spinal cord but not in dorsal root ganglion (DRG) nor (NF-κB mRNA levels in both tissues of rats with AIA. (A–D) Represent mRNA levels of NF-κB and COX-2 in the spinal cord and DRG respectively. Real-time PCR assay was performed in duplicate and β-actin mRNA was used to normalize the relative amount of mRNA. Data are presented as the mean ± SEM of three to five animals per group. * $P < 0.05$ and # $P < 0.05$ are significantly different from the vehicle and complete Freund's Adjuvant (CFA) groups respectively.

17(R)HDoHE (300 ng/i.p.) significantly decreased the phosphorylation of p65 subunit of NF-κB in the spinal cord and DRG, 3 days after AIA induction. NF-κB is known to have a pivotal role in immune and inflammatory responses through the regulation of several genes that encode pro-inflammatory molecules, including cytokines and COX-2 (Lawrence *et al.*, 2002). Although COX-2 drives the onset of inflammation through the production of pro-inflammatory prostaglandin E₂, it also drives the resolution of inflammation through the synthesis of the anti-inflammatory PG, 15deoxy-Δ^{12,14}-PGJ₂ (15dPGJ₂). In macrophage and lymphocyte cell lines, 15dPGJ₂ inhibited the activation of IKKβ, which regulates the activation of NF-κB in response to pro-inflammatory stimuli (Rossi *et al.*, 2000; Straus *et al.*, 2000). Our results confirm and also extend these findings by demonstrating that the resolvin D series precursor, 17(R)HDoHE, inhibited NF-κB activation in the DRG and dorsal horn of spinal cord. However, the exact mechanisms by which these lipid mediators inhibit the NF-κB expression should be further examined.

Considering mRNA levels of the transcription factor NF-κB, we did not detect a significant increase in the spinal cord and DRG in the acute inflammatory state. This data is in part supported by the study of Chan *et al.* (2000) who have demonstrated that the p50/p65 heterodimer of NF-κB increased as early as 30 min in the spinal cord, and started to decrease 2 h following peripheral inflammation, demonstrating that NF-κB expression/activity is dependent, at least in part, on the period of evaluation. Thus, we did not detect differences in the NF-κB mRNA levels probably because of the time at which we evaluated this variable in this study.

Moreover, marked increases in COX-2 expression occur locally at the sites of inflammation or in different cell types in the spinal cord and brain (Samad *et al.*, 2001). It has been shown that COX-2 is induced after peripheral inflammation (Yacoubian and Serhan, 2007), which indirectly sensitizes peripheral terminals of sensory fibres (Serhan *et al.*, 2008). Of note, 17(R)HDoHE (300 ng/i.p.) treatment elicited a significant decrease in the immunostaining for COX-2 in the spinal

cord and DRG in acute inflammation. We have also observed an increase in the levels of COX-2 mRNA 3 days after AIA induction. Some authors have shown that COX-2 mRNA levels are increased at least for up to 24 h after peripheral inflammation (Samad *et al.*, 2001) and others have observed a decrease in COX-2 mRNA levels after 3 days (Hay *et al.*, 1997). The increase in COX-2 mRNA in spinal cord 6 h and 3 days after chronic inflammation in mice (Narita *et al.*, 2008) would be in accordance with our results. Also, we detected a significant reduction of COX-2 mRNA in the spinal cord of rats treated with 17(R)HDoHE. When evaluating COX-2 mRNA expression in DRG, no significant differences were observed. The DRG from animals with CFA-induced inflammation showed a minimal increase in COX-2 mRNA contrasting to a significant induction of COX-2 mRNA in the spinal cord (Amaya *et al.*, 2009).

To summarize, our present data show that 17(R)HDoHE, a precursor of the resolvin D series, modulated both the genesis and the maintenance of mechanical hyperalgesia in the AIA model of arthritis in rats. Additionally, when comparing the effect of both 17(R)HDoHE and AT-RvD1 with other currently used analgesics (Table 1), we can observe that pro-resolution lipid mediators induced a greater percentage of inhibition of mechanical hyperalgesia. Moreover, the anti-hyperalgesic effect of 17(R)HDoHE in acute inflammation seems likely to be mediated by inhibition of both NF- κ B and COX-2 in spinal cord and DRG levels. Furthermore, the anti-hyperalgesic effects reported here for AT-RvD1 are likely to rely on the modulation of TNF- α and IL-1 β production in the hind paw tissue. Given the anti-hyperalgesic efficacy of resolvins and the safety associated with endogenous mediators, the present findings bring new evidence that lipid mediators, such as 17(R)HDoHE and AT-RvD1, may represent a new family of analgesics useful in treating inflammation-associated pain states such as arthritic pain.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and the Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Santa Catarina (FAPESC). J. F. L. G., R. C. D. and K. A. B. S. are PhD students funded by CNPq. E. M. M. is a recipient of a postdoctoral grant from CNPq.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

References

Albert CM, Campos H, Stampfer MJ, Ridker PM, Manson JE, Willett WC *et al.* (2002). Blood levels of long-chain n-3 fatty acids and the risk of sudden death. *N Engl J Med* 346: 1113–1118.

Alexander SPH, Mathie A, Peters JA (2009). Guide to receptors and channels (GRAC), 4th edition. *Br J Pharmacol* 150 (Suppl. 1): S1–S254.

Amaya F, Samad TA, Barrett L, Broom DC, Woolf CJ (2009). Periganglionic inflammation elicits a distally radiating pain hypersensitivity by promoting COX-2 induction in the dorsal root ganglion. *Pain* 142: 59–67.

Bang S, Yoo S, Yang TJ, Cho H, Kim YG, Hwang SW (2010). Resolvin D1 attenuates activation of sensory transient receptor potential channels leading to multiple anti-nociception. *Br J Pharmacol* 161: 707–720.

Bannenberg GL, Chiang N, Ariel A, Arita M, Tjonahen E, Gotlinger KH *et al.* (2005). Molecular circuits of resolution: formation and actions of resolvins and protectins. *J Immunol* 174: 4345–4355.

Belluzzi A, Brignola C, Campieri M, Pera A, Boschi S, Miglioli M (1996). Effect of an enteric-coated fish-oil preparation on relapses in Crohn's disease. *N Engl J Med* 334: 1557–1560.

Bendele AM (2001). Animal models of rheumatoid arthritis. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 1: 377–385.

Binshtok AM, Wang H, Zimmermann K, Amaya F, Vardeh D, Shi L *et al.* (2008). Nociceptors are interleukin-1 β sensors. *J Neurosci* 28: 14062–14073.

Brennan FM, McInnes IB (2008). Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 118: 3537–3545.

Campbell EL, Louis NA, Tomassetti SE, Canny GO, Arita M, Serhan CN *et al.* (2007). Resolvin E1 promotes mucosal surface clearance of neutrophils: a new paradigm for inflammatory resolution. *FASEB J* 21: 3162–3170.

Chan C-F, Sun W-Z, Lin J-K, Lin-Shiau S-Y (2000). Activation of transcription factors of nuclear factor kappa B, activator protein-1 and octamer factors in hyperalgesia. *Eur J Pharmacol* 402: 61–68.

Coderre TJ (2009). Spinal cord mechanisms of hyperalgesia and allodynia. In: Basbaum AI, Bushnell MC (eds). *Science of Pain*. Academic Press: San Diego, pp. 339–380.

Cortes-Burgos LA, Zweifel BS, Settle SL, Pufahl RA, Anderson GD, Hardy MM *et al.* (2009). CJ-13610, an orally active inhibitor of 5-lipoxygenase is efficacious in preclinical models of pain. *Eur J Pharmacol* 617: 59–67.

Croci T, Zarini E (2007). Effect of the cannabinoid CB1 receptor antagonist rimonabant on nociceptive responses and adjuvant-induced arthritis in obese and lean rats. *Br J Pharmacol* 150: 559–566.

Dornelles FN, Santos DS, Van Dyke TE, Calixto JB, Batista EL Jr, Campos MM (2009). In vivo up-regulation of kinin B1 receptors after treatment with *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide in rat paw. *J Pharmacol Exp Ther* 330: 756–763.

Duffield JS, Hong S, Vaidya VS, Lu Y, Fredman G, Serhan CN *et al.* (2006). Resolvin D series and protectin D1 mitigate acute kidney injury. *J Immunol* 177: 5902–5911.

Filep JG (2009). Lipid mediator interplay: resolvin D1 attenuates inflammation evoked by glutathione-conjugated lipid peroxidation products. *Br J Pharmacol* 158: 1059–1061.

Firestein GS (2003). Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 423: 356–361.

Gilroy DW, Lawrence T, Perretti M, Rossi AG (2004). Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 3: 401–415.

- GISSI-Prevenzione Investigators (1999). Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI Prevenzione trial. Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto miocardico. *Lancet* 354: 447–455.
- González ELM, Patrignani P, Tacconelli S, Rodríguez LAG (2010). Variability among nonsteroidal antiinflammatory drugs in risk of upper gastrointestinal bleeding. *Arthritis Rheum* 62: 1592–1601.
- Hargreaves K, Dubner R, Brown F, Flores C, Joris J (1988). A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain* 32: 77–88.
- Hay CH, Trevethick MA, Wheeldon A, Bowers JS, De Bellerocche JS (1997). The potential role of spinal cord cyclooxygenase-2 in the development of Freund's complete adjuvant-induced changes in hyperalgesia and allodynia. *Neurosci* 78: 843–850.
- Hegen M, Keith JC Jr, Collins M, Nickerson-Nutter CL (2008). Utility of animal models for identification of potential therapeutics for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 67: 1505–1515.
- Hong S, Gronert K, Devchand PR, Moussignac R-L, Serhan CN (2003). Novel docosatrienes and 17S-Resolvins generated from docosahexaenoic acid in murine brain, human blood, and glial cells. Autacoids in anti-inflammation. *J Biol Chem* 278: 14677–14687.
- Kassuya CAL, Ferreira J, Claudino RF, Calixto JB (2007). Intraplantar PGE₂ causes nociceptive behaviour and mechanical allodynia: the role of prostanoic E receptors and protein kinases. *Br J Pharmacol* 150: 727–737.
- Kasuga K, Yang R, Porter TF, Agrawal N, Petasis NA, Irimia D *et al.* (2008). Rapid appearance of resolvins precursors in inflammatory exudates: novel mechanisms in resolution. *J Immunol* 181: 8677–8687.
- Lawrence T, Willoughby DA, Gilroy DW (2002). Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol* 2: 787–795.
- Lee K-M, Kang B-S, Lee H-L, Son S-J, Hwang S-H, Kim D-S *et al.* (2004). Spinal NF- κ B activation induces COX-2 upregulation and contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *Eur J Neurosci* 19: 3375–3381.
- Leeb BF, Sautner J, Andel I, Rintelen B (2006). Intravenous application of omega-3 fatty acids in patients with active rheumatoid arthritis. The ORA-1 Trial. An open pilot study. *Lipids* 41: 29–34.
- Leem JW, Hwang JH, Hwang SJ, Park H, Kimb MK, Choib Y (2001). The role of peripheral N-methyl-d-aspartate receptors in Freund's complete adjuvant induced mechanical hyperalgesia in rats. *Neurosci Lett* 297: 155–158.
- Levy BD, Clish CB, Schmidt B, Gronert K, Serhan CN (2001). Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. *Nat Immunol* 2: 612–619.
- McDougall JJ, Zhang C, Cellars L, Joubert E, Dixon CM, Vergnolle N (2009). Triggering of proteinase-activated receptor 4 leads to joint pain and inflammation in mice. *Arthritis Rheum* 60: 728–737.
- Manjavachi MN, Quintão NL, Campos MM, Deschamps IK, Yunes RA, Nunes RJ *et al.* (2010). The effects of the selective and non-peptide CXCR2 receptor antagonist SB225002 on acute and long-lasting models of nociception in mice. *Eur J Pain* 14: 23–31.
- Montecucco C, Cavagna L, Caporali R (2009). Pain and rheumatology: an overview of the problem. *Eur J Pain* 3 (Suppl.): 105–109.
- Müller-Ladner U, Pap T, Gay RE, Neidhart M, Gay S (2005). Mechanisms of disease: the molecular and cellular basis of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol* 1: 102–110.
- Nagakura Y, Okada M, Kohara A, Kiso T, Toya T, Iwai A *et al.* (2003). Allodynia and hyperalgesia in adjuvant-induced arthritic rats: time course of progression and efficacy of analgesics. *J Pharmacol Exp Ther* 306: 490–497.
- Narita M, Shimamura M, Imai S, Kubota C, Yajima Y, Takagi T *et al.* (2008). Role of interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α dependent expression of cyclooxygenase-2 mRNA in thermal hyperalgesia induced by chronic inflammation in mice. *Neurosci* 152: 477–486.
- Ossipov MH, Bian D, Malan TP Jr, Lai J, Porreca F (1999). Lack of involvement of capsaicin-sensitive primary afferents in nerve-ligation injury induced tactile allodynia in rats. *Pain* 79: 127–133.
- Pinto LA, Cunha TM, Vieira SM, Lemos HP, Verri WA Jr, Cunha FQ *et al.* (2010). IL-17 mediates articular hypernociception in antigen-induced arthritis in mice. *Pain* 148: 247–256.
- Quan LD, Thiele GM, Tian J, Wang D (2008). The development of novel therapies for rheumatoid arthritis. *Expert Opin Ther Pat* 18: 723–738.
- Rossi A, Kapahi P, Natoli G, Takahashi T, Chen Y, Karin M *et al.* (2000). Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of I κ B kinase. *Nature* 403: 103–108.
- Samad TA, Moore KA, Sapirstein A, Billet S, Allchorne A, Poole S *et al.* (2001). Interleukin-1 β -mediated induction of Cox-2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *Nature* 410: 471–475.
- Schaible HG, Grubb BD (1993). Afferent and spinal mechanisms of joint pain. *Pain* 55: 5–54.
- Schaible HG, Ebersberger A, Von Banchet GS (2002). Mechanisms of pain in arthritis. *Ann N Y Acad Sci* 966: 343–354.
- Schaible HG, Schmelz M, Tegeder I (2006). Pathophysiology and treatment of pain in joint disease. *Adv Drug Deliv Rev* 58: 323–342.
- Schaible HG, Richter F, Ebersberger A, Boettger MK, Vanegas H, Natura G *et al.* (2009). Joint pain. *Exp Brain Res* 196: 153–162.
- Serhan CN (2004). U.S. Patent No. 2004/0116408 A1.
- Serhan CN (2007). Resolution phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways. *Annu Rev Immunol* 25: 101–137.
- Serhan CN (2009). Systems approach to inflammation resolution: identification of novel anti-inflammatory and pro-resolving mediators. *J Thromb Haemost* 7: 44–48.
- Serhan CN, Clish CB (2003). U.S. Patent No. 6,670,396 B2.
- Serhan CN, Clish CB, Brannon J, Colgan SP, Chiang N, Gronert K (2000). Novel functional sets of lipid-derived mediators with antiinflammatory actions generated from omega-3 fatty acids via cyclooxygenase 2–nonsteroidal anti-inflammatory drugs and transcellular processing. *J Exp Med* 192: 1197–1204.
- Serhan CN, Hong S, Gronert K, Colgan SP, Devchand PR, Mirick G *et al.* (2002). Resolvins: a family of bioactive products of omega-3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter proinflammation signals. *J Exp Med* 196: 1025–1037.
- Serhan CN, Yacoubian S, Yang R (2008). Anti-inflammatory and proresolving lipid mediators. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 3: 279–312.

- Serhan CN, Yang R, Martinoid K, Kassuga K, Pillai PM, Porter TF *et al.* (2009). Maresins: novel macrophage mediators with potent anti-inflammatory and proresolving actions. *J Exp Med* 206: 15–23.
- Shir Y, Seltzer Z (1990). A-fibers mediate mechanical hyperesthesia and allodynia and C-fibers mediate thermal hyperalgesia in a new model of causalgiform pain disorders in rats. *Neurosci Lett* 115: 62–67.
- Sommer C, Birklein F (2010). Fighting off pain with resolvins. *Nature Med* 16: 518–520.
- Spite M, Summers L, Porter TF, Srivastava S, Bhatnagar A, Serhan CN (2009). Resolvin D1 controls inflammation initiated by glutathione-lipid conjugates formed during oxidative stress. *Br J Pharmacol* 158: 1062–1073.
- Stein C, Millan MJ, Herz A (1988). Unilateral inflammation of the hindpaw in rats as a model of prolonged noxious stimulation: alterations in behavior and nociceptive thresholds. *Pharmacol Biochem Behav* 2: 451–455.
- Straus DS, Pascual G, Li M, Welch JS, Ricote M, Hsiang C-H *et al.* (2000). 15-Deoxy-D12,14-prostaglandin J2 inhibits multiple steps in the NF- κ B signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 4844–4849.
- Sun YP, Oh SF, Uddin J, Yang R, Gotlinger K, Campbell E *et al.* (2007). Resolvin D1 and its aspirin-triggered 17R epimer: stereochemical assignments, anti-inflammatory properties, and enzymatic inactivation. *J Biol Chem* 282: 9323–9334.
- Svensson CI, Zattoni M, Serhan CN (2007). Lipoxins and aspirin-triggered lipoxin inhibit inflammatory pain processing. *J Exp Med* 204: 245–252.
- Uçeyler N, Schäfers M, Sommer C (2009). Mode of action of cytokines on nociceptive neurons. *Exp Brain Res* 196: 67–78.
- Vitor CE, Figueiredo CP, Hara DB, Bento AF, Mazzuco TL, Calixto JB (2009). Therapeutic action and underlying mechanisms of a combination of two pentacyclic triterpenes, alpha- and beta-amyrin, in a mouse model of colitis. *Br J Pharmacol* 157: 1034–1044.
- van Vollenhoven RF (2009). Treatment of rheumatoid arthritis: state of the art. *Nat Rev Rheumatol* 5: 531–534.
- Wegert S, Ossipov MH, Nichols ML, Bian D, Vanderah TW, Malan TP *et al.* (1997). Differential activities of intrathecal MK-801 or morphine to alter responses to thermal and mechanical stimuli in normal or nerve-injured rats. *Pain* 71: 57–64.
- Xu X-J, Farkas-Szallasi T, Lundberg JM, Hiikfelt T, Wiesenfeld-Hallin Z, Szallasi A (1997). Effects of the capsaicin analogue resiniferatoxin on spinal nociceptive mechanisms in the rat: behavioral, electrophysiological and in situ hybridization studies. *Brain Res* 752: 52–60.
- Xu ZZ, Zhang L, Liu T, Park JY, Berta T, Yang R *et al.* (2010). Resolvins RvE1 and RvD1 attenuate inflammatory pain via central and peripheral actions. *Nature Med* 16: 592–597.
- Yacoubian S, Serhan CN (2007). New endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators: implication for rheumatic diseases. *Nat Clin Pract Rheumatol* 3: 570–579.

Resolvins are potent analgesics for arthritic pain

Zhen-Zhong Xu and Ru-Rong Ji

Sensory Plasticity Laboratory, Pain Research Center, Department of Anesthesiology, Brigham and Women's Hospital and Harvard Medical School, Boston, Massachusetts 02115

Number of words in Summary: 147

Number of words in the text: 1100

Number of table: 0

Number of figures: 1

Number of references: 13

Correspondence:

Ru-Rong Ji (rrji@zeus.bwh.harvard.edu), Department of Anesthesiology, Brigham and Women's Hospital, 75 Francis Street, Medical Research Building, Room 604, Boston, MA 02115

Tel: (617) 732-8852

Fax: (617) 730-2801

Email: rrji@zeus.bwh.harvard.edu

This is an Accepted Article that has been peer-reviewed and approved for publication in the *British Journal of Pharmacology*, but has yet to undergo copy-editing and proof correction. Please cite this article as an "Accepted Article"; doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01348.x

Summary

Arthritis-associated inflammatory pain represents a serious medical problem worldwide. Current treatments for arthritis pain are not very effective and can cause unwanted side effects. Resolvins, including resolvin D and resolvin E series, are a family of novel endogenous lipid mediators derived from Omega-3 polyunsaturated fatty acids. Resolvins display potent anti-inflammatory and pro-resolution actions in animal models of inflammation. Emerging evidence also points to a potent anti-hyperalgesic role of resolvins in animal models of inflammatory pain. This study by Lima-Garcia et al demonstrated that systemic delivery of the precursor of resolvin D series, 17(R)HDoHE and its product aspirin-triggered resolvin D1 (AT-RvD1), at very low doses (1 µg/kg), reduced inflammatory pain in an adjuvant-induced arthritis model. Of interest 17(R)HDoHE reduced joint stiffness but not paw and joint edema. Given the potency and safety profile, resolvins may represent a new class of analgesics for treating inflammatory pain associated with arthritis.

Key words: Resolvin, RvD1 precursor, lipid mediators, inflammatory pain, arthritis, dorsal root ganglion, spinal cord, TNF- α

Abbreviations: COX-2, cyclooxygenase-2; DHA, docosahexaenoic acid; DRG, dorsal root ganglion; EPA, eicosapentaenoic acid, IL-1 β , interleukin-1beta; NF- κ B, nuclear factor- κ B; RA, rheumatoid arthritis; RvD1, resolvin D1; RvE1, resolvin E1; TNF- α , tumor necrosis factor-alpha; 17(R)HdoHE, precursor of resolvin D series, 17(R)-hydroxy-4Z,7Z,10Z,13Z,15E,17R,19Z-docosahexaenoic acid; AT-RvD1, aspirin-triggered resolvin D1

Increasing evidence suggests that resolution of acute inflammation involves active biochemical programs by producing pro-resolution mediators (Serhan et al., 2008). The mechanisms of pro-resolution mediators are quite different from that of anti-inflammatory therapeutics, such as COX-2 inhibitors which are known to delay resolution (Gilroy *et al.*, 1999). Resolvins, such as resolvin D1 (RvD1) and resolving E1 (RvE1), represent a new family of pro-resolution mediators that are biosynthesized from omega-3 fatty acids docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA), respectively (Serhan *et al.*, 2002). Resolvins display remarkable potency in resolving inflammation-related diseases such as periodontal diseases, asthma, and retinopathy (Serhan *et al.*, 2008).

New evidence also points to an antinociceptive role of resolvins in inflammatory pain (Xu *et al.*, 2010; Bang *et al.*, 2010). Inflammatory pain after tissue injury such as arthritis results from peripheral sensitization, sensitization of nociceptor terminals in inflamed tissues and nociceptor cell bodies in the dorsal root ganglion (DRG), induced by inflammatory mediators such as TNF- α , IL-1 β , and prostaglandin (Cheng & Ji, 2008). Inflammatory pain is also mediated by central sensitization, sensitization of spinal cord dorsal horn neurons, induced by the same inflammatory mediators (TNF- α , IL-1 β , and prostaglandin) produced in the spinal cord (Samad *et al.*, 2001; Kawasaki *et al.*, 2008). Xu et al. recently reported that peripheral (intraplantar) or spinal (intrathecal) administration of RvE1 or RvD1, at very low doses (0.3-20 ng), potentially reduced inflammatory pain behaviors in acute and persistent mouse models of inflammation. RvE1 also reduced neutrophil infiltration and proinflammatory cytokine levels in the inflamed hindpaw. In this setting, RvE1 abolished TNF- α - and TRPV1-induced synaptic plasticity in the spinal cord (Xu *et al.*, 2010). A subsequent study showed that intraplantar administration of RvD1 reduced inflammatory pain by inhibiting the activities of several TRP channels such as TRPA1, TRPV3 and TRPV4 but not TRPV1 (Bang *et al.*, 2010). Intrathecal pre-treatment of RvD1 (20-40 ng) also elicited enduring prevention of postoperative pain, whereas post-treatment of RvD1 produced a transient reduction of postoperative pain (Huang *et al.*, 2011).

In this study, Lima-Garcia et al (Lima-Garcia JF, 2011) demonstrate that a precursor of resolvin D series, 17(R)HDoHE and its leukocyte product aspirin-triggered resolvin D1

(AT-RvD1), elicited potent anti-hyperalgesic role in adjuvant-induced arthritis in rats. Unlike earlier recent studies using local administration via intraplantar or intrathecal route, Lima-Garcia used systemic injection(s) via i.p. route for drug administration. Both pre-treatment of 17(R)HDoHE (1 µg/kg) and post-treatment of 17(R)HDoHE on day 3 (1 µg/kg) and day 14 (2 µg/kg) significantly attenuated adjuvant-induced mechanical hyperalgesia for more than 6 h, although 17(R)HDoHE appeared to produce the best anti-hyperalgesic effect in the early phase of inflammation (day 3). AT-RvD1 was also able to attenuate mechanical hyperalgesia at a very low dose (0.3 µg/kg). Repeated injections of 17(R)HDoHE and AT-RvD1 could reduce mechanical hyperalgesia for many days. Notably, the authors compared the antinociceptive efficacy of 17(R)HDoHE with that of current pain medicine, including indomethacin (COX inhibitor), morphine (opioid analgesic), gabapentin (anti-epileptic), and dexamethasone (anti-inflammatory steroid) in the same adjuvant model. It is very striking that the effective dose of 17(R)HDoHE is ~500 times lower than morphine and ~5000 times lower than other currently used drugs.

Lima-Garcia et al also investigated the underlying anti-hyperalgesic mechanisms of 17(R)HDoHE and AT-RvD1, as illustrated in **Figure 1**. First, repeated injections of 17(R)HDoHE and AT-RvD1 substantially reduced TNF- α and IL-1 β levels in inflamed paw tissue. Second, a single treatment with 17(R)HDoHE inhibited the increase of NF- κ B and COX-2 in the spinal cord and DRG. All these mechanisms have been strongly implicated in the pathogenesis of inflammatory pain via peripheral and central sensitization (Cheng & Ji, 2008; Kawasaki *et al.*, 2008; Samad *et al.*, 2001). The authors did not find significant increases of TNF- α and IL-1 β levels in DRG and spinal cord tissues at a time point after adjuvant-induced inflammation. However, the importance of these cytokines in regulating central sensitization and spinal cord-mediated hyperalgesia should not be underestimated. TNF- α and IL-1 β levels may increase at different times after inflammation (Samad *et al.*, 2001). Second, these cytokines could be released to CSF, therefore undetected in spinal cord tissue. Third, the receptors for these cytokines could be up-regulated after inflammation. Indeed, TNF- α and IL-1 β can powerfully and rapidly regulate synaptic transmission in the spinal cord (Kawasaki *et al.*, 2008). 17(R)HDoHE and AT-RvD1 may not only reduce the

synthesis of TNF- α and IL-1 β , but also inhibit TNF- α and IL-1 β -induced enhancement of synaptic transmission, as RvE1 does (Xu *et al.*, 2010).

An important finding in the paper by Lima-Garcia *et al* is that repeated treatment with 17(R)HDoHE for 6 days reduced arthritis pain and joint stiffness but not paw and joint oedema. Since arthritis pain is the major problem causing patient's suffering, future studies on arthritis should be focused on pain reduction. Consistently, a recent study showed that TNF- α neutralization rapidly inhibited pain responses in the central nervous system before directly affecting joint inflammation in patients with rheumatoid arthritis (Hess *et al.*, 2011). Indeed, after anti-TNF- α treatment, arthritis pain is reduced within 24 hours, whereas sign of joint inflammation (swollen joint count) is reduced after 14 days (Hess *et al.*, 2011). It is likely that continuous treatment of 17(R)HDoHE for two weeks would reduce joint oedema, by decreasing TNF- α levels.

It is interesting to notice that 17(R)HDoHE and (AT-RvD1) as well as RvD1 are very effective in inhibiting mechanical hyperalgesia but not heat hyperalgesia after inflammation. In contrast, RvE1 is highly efficacious in reducing heat hyperalgesia (Xu *et al.*, 2010). Thus, different resolvins may regulate different modalities of pain by targeting different pain receptors such as thermal and mechanical receptors (e.g., different TRP channels). AT-RvD1 and RvD1 activate the same receptors, GPR32 (human) and ALX/FPR2 (murine), recently identified GPCRs (Krishnamoorthy *et al.*, 2010). Whether 17-HDoHE also acts at these GPCRs remains to be investigated. In addition to AT-RD1, 17(R)-HDoHE is also converted to other aspirin-triggered D series resolvins, including AT-RvD2, AT-RvD3, AT-RvD4 and AT-RvD5 (Serhan *et al.*, 2002; Serhan, 2007). The analgesic actions of the other D-series resolvins needs further investigations.

Inflammatory pain, such as arthritis pain, is a growing health problem worldwide. Rheumatoid arthritis (RA) alone affects up to 1% of the population, and pain is the initial and prevailing symptom of RA. Current treatments for inflammatory pain are limited by side effects. For example, acute opioid treatment produces respiratory depression, sedation, nausea, vomiting, and constipation, whereas chronic opioid treatment may cause addiction.

Long-term treatment of COX-2 inhibitors produces unwanted cardiovascular defects. Anti-TNF- α treatment may also cause infection problem by suppressing immune reaction (Sommer & Birklein, 2010; Xu *et al.*, 2010). Given the remarkable anti-hyperalgesic efficacy of resolvins and safety profiles associated with these endogenous lipid mediators and dietary supplements, resolvins and their metabolically stable analogues may represent a novel class of analgesics for the management of inflammation-associated pain such as arthritic pain, low back pain, inflammatory bowel syndrome, and postoperative pain.

Acknowledgements

We thank Dr. Charles N. Serhan for valuable discussion. The work was supported in part by the NIH R01 grant NS67686.

Statement of Conflicts of Interest

The authors declare they have no conflicts of interest.

Reference List

1. Bang, S, Yoo, S, Yang, TJ, Cho, H, Kim, YG & Hwang, SW. (2010). Resolvin D1 attenuates activation of sensory transient receptor potential channels leading to multiple anti-nociception. *Br J Pharmacol*, **161**, 707-720.
2. Cheng, JK & Ji, RR. (2008). Intracellular Signaling in Primary Sensory Neurons and Persistent Pain. *Neurochem Res*.
3. Gilroy, DW, Colville-Nash, PR, Willis, D, Chivers, J, Paul-Clark, MJ & Willoughby, DA. (1999). Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. *Nat Med*, **5**, 698-701.
4. Hess, A, Axmann, R, Rech, J, Finzel, S, Heindl, C, Kreitz, S, Sergeeva, M, Saake, M, Garcia, M, Kollias, G, Straub, RH, Sporns, O, Doerfler, A, Brune, K & Schett, G. (2011). Blockade of TNF- α rapidly inhibits pain responses in the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
5. Huang, L, Wang, CF, Serhan, CN & Strichartz, G. (2011). Enduring prevention and transient reduction of postoperative pain by intrathecal resolvin D1. *Pain*, **152**, 557-565.
6. Kawasaki, Y, Zhang, L, Cheng, JK & Ji, RR. (2008). Cytokine mechanisms of central sensitization: distinct and overlapping role of interleukin-1 β , interleukin-6, and tumor necrosis factor- α in regulating synaptic and neuronal activity in the superficial spinal cord. *J Neurosci*, **28**, 5189-5194.
7. Krishnamoorthy, S, Recchiuti, A, Chiang, N, Yacoubian, S, Lee, CH, Yang, R, Petasis, NA & Serhan, CN. (2010). Resolvin D1 binds human phagocytes with evidence for proresolving receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**, 1660-1665.
8. Lima-Garcia JF, DRdSKMECMaCJ. (2011). The precursor of resolvin D series and aspirin-triggered resolvin D1 display anti-hyperalgesic properties in adjuvant-induced arthritis in rats.
9. Samad, TA, Moore, KA, Sapirstein, A, Billet, S, Allchorne, A, Poole, S, Bonventre, JV & Woolf, CJ. (2001). Interleukin-1 β -mediated induction of Cox-2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *Nature*, **410**, 471-475.
10. Serhan, CN. (2007). Resolution phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways. *Annu Rev Immunol*, **25**, 101-137.
11. Serhan, CN, Chiang, N & Van Dyke, TE. (2008). Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol*, **8**, 349-361.

12. Serhan, CN, Hong, S, Gronert, K, Colgan, SP, Devchand, PR, Mirick, G & Moussignac, RL. (2002). Resolvins: a family of bioactive products of omega-3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter proinflammation signals. *J Exp Med*, **196**, 1025-1037.
13. Sommer, C & Birklein, F. (2010). Fighting off pain with resolvins. *Nat Med*, **16**, 518-520.
14. Xu, ZZ, Zhang, L, Liu, T, Park, JY, Berta, T, Yang, R, Serhan, CN & Ji, RR. (2010). Resolvins RvE1 and RvD1 attenuate inflammatory pain via central and peripheral actions. *Nat Med*, **16**, 592-7, 1p.

Figure legends

Figure 1. Schematic illustrating how 17(R)HDoHE and its product aspirin-triggered resolvin D1 (AT-RvD1) attenuate arthritis-associated inflammatory pain. 17(R)HDoHE is the precursor of resolving D series and biosynthesized from the omega-3 polyunsaturated fatty acid, docosahexaenoic acid (DHA), in the presence of cyclooxygenase-2 (COX-2) and Aspirin. Aspirin-triggered resolvin D1 (AT-RvD1) is the product of 17(R)HDoHE. Adjuvant-induced hindpaw inflammation results in increased levels of proinflammatory cytokines TNF- α and IL-1 β in the inflamed paw, as well as increased expression of NK- κ B or/and COX-2 in the dorsal root ganglion (DRG) and spinal cord. Up-regulation of these molecules has been implicated in the generation of inflammatory pain. 17(R)HDoHE and AT-RvD1 inhibit inflammatory pain by reducing the levels of TNF- α and IL-1 β at the site of inflammation and also inhibiting the expression of NK- κ B or/and COX-2 in the DRG and spinal cord.

