

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular

William Antonio Gonçalves

**A EXPRESSÃO DE TNF NO GÂNGLIO DA RAIZ DORSAL ESTÁ ASSOCIADA À
MANUTENÇÃO DA HIPERALGESIA ARTICULAR APÓS A RESOLUÇÃO DA
RESPOSTA INFLAMATÓRIA NA ARTRITE INDUZIDA POR ANTÍGENO**

Belo Horizonte

2019

William Antonio Gonçalves

**A EXPRESSÃO DE TNF NO GÂNGLIO DA RAIZ DORSAL ESTÁ ASSOCIADA À
MANUTENÇÃO DA HIPERALGESIA ARTICULAR APÓS A RESOLUÇÃO DA
RESPOSTA INFLAMATÓRIA NA ARTRITE INDUZIDA POR ANTÍGENO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biologia Celular.

Orientadora: Profa. Dra. Vanessa Pinho da Silva

Co-Orientador: Prof. Dr. Flávio Almeida Amaral

Co-Orientador: Prof. Dr. Thiago Mattar Cunha

Belo Horizonte
2019

043

Gonçalves, William Antonio.

A expressão de TNF no gânglio da raiz dorsal está associada à manutenção da hiperalgesia articular após a resolução da resposta inflamatória na artrite induzida por antígeno [manuscrito] / William Antonio Gonçalves. – 2019.

126 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Vanessa Pinho da Silva. Coorientador: Prof. Dr. Flávio Almeida Amaral. Coorientador: Prof. Dr. Thiago Mattar Cunha.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular.

1. Biologia Celular. 2. Inflamação. 3. Artrite. 4. Dor. I. Silva, Vanessa Pinho da. II. Amaral, Flávio Almeida. III. Cunha, Thiago Mattar. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. V. Título.

CDU: 576



ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DE
WILLIAM ANTONIO GONÇALVES

217/2019
entrada
2º/2015
2015744945

Às treze horas do dia 30 de setembro de 2019, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Tese, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "A EXPRESSÃO DE TNF NO GÂNGLIO DA RAIZ DORSAL ESTÁ ASSOCIADA À MANUTENÇÃO DA HIPERALGESIA ARTICULAR APÓS A RESOLUÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA NA ARTRITE INDUZIDA POR ANTÍGENO", requisito final para obtenção do grau de Doutor em Biologia Celular. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, **Dra. Vanessa Pinho da Silva**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dra. Vanessa Pinho da Silva	UFMG	APROVADO
Dr. Flávio Almeida Amaral	UFMG	APROVADO
Dr. Thiago Mattar Cunha	USP	ausente
Dr. Fernando Lopes	McGill University	FL
Dr. Francisco Airton Castro da Rocha	UFC	Imarado
Dra. Gilda Aparecida Ferreira	UFMG	Aprovado
Dra. Michelle Adriane Amantéa Sugimoto	UFMG	Aprovado

Pelas indicações, o candidato foi considerado: APROVADO
O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 30 de setembro de 2019.**

Dra. Vanessa Pinho da Silva (Orientadora) Vanessa Pinho da Silva
Dr. Flávio Almeida Amaral (Coorientador) Flávio Almeida Amaral
Dr. Thiago Mattar Cunha (Coorientador) ausente
Dr. Fernando Lopes FL
Dr. Francisco Airton Castro da Rocha FR
Dra. Gilda Aparecida Ferreira Gilda Ferreira
Dra. Michelle Adriane Amantéa Sugimoto Michelle Amantéa Sugimoto

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador

Prof. Erika Cristina Jorge
Coordenadora do Programa de Pós Graduação
em Biologia Celular ICB/UFMG

Erika Cristina Jorge

Dedico este trabalho aos meus queridos pais,

que me amam verdadeiramente.

À minha sobrinha incrível, que alega minha

vida.

À Barbara, minha admirável esposa e infalível

amiga.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por entrar comigo aonde ninguém mais parece acreditar nele.

Agradeço à minha esposa Barbara Maximino Rezende Gonçalves, pelas horas de compreensão e ajuda que foram essenciais para que eu pudesse concluir meus trabalhos. Tão caridosa, me permitiu compartilhar as alegrias que senti, e as dificuldades que passei.

Aos meus queridos pais, pelo exemplo, investimento, horas de aconselhamento e apoio incondicional.

Meu Amigo Célio e Amiga Tânia, pelo carinho e pelos ensinamentos, que sempre me ajudaram profissionalmente.

Agradeço ao nobre Marcos Paulo Esteves de Oliveira, pelo bom ânimo, amizade e as lições de humildade e pureza.

Agradeço ao grande amigo Luiz Barcelos, por ter tido a paciência e carinho que só bons amigos podem oferecer.

Agradeço aos queridos colegas do LARRI (Laboratório de resolução da resposta inflamatória) e do labE RITMO (Laboratório de estudo da resposta inflamatória associada ao transplante de medula óssea), que sempre foram bons companheiros de bancada e estudos. Obrigado, Winy, Walyson, Débora, Franciel, Layara e Carol.

Agradeço ao colega Lucas Secchim Ribeiro, que foi o primeiro par que acreditou em meu trabalho.

Agradeço aos colegas e professores que contribuíram para a produção do presente trabalho. Obrigado, Walison Nunes da Silva, Pedro Henrique Dias Moura Prazeres, Celso Martins Queiroz-Junior, Prof.^a Vivian Vasconcelos Costa, Thaianne Pinto Moreira, Prof. Alexander Birbrair, Victor Fatorri, Prof. Waldiceu Verri Jr., Frederico Marianetti Soriani, Karine Talita de Oliveira Santana Jorge e Danuza Montijo Diniz.

Agradeço ao corpo de profissionais técnicos do laboratório, que sempre geraram boas condições para que eu pudesse realizar o meu trabalho. Obrigado, Grande Hermes, Rose, Ilda, Ilma, Frank e Gil.

Agradeço ao colegas Guilherme, Ricardo e Isac, da USP de Ribeirão Preto, por me ajudarem e receberem de braços abertos todas as vezes que eu tive o prazer de trabalhar no laboratório do Prof. Thiago Cunha.

Agradeço a querida Ieda, da USP de Ribeirão Preto, uma das mais excelentes profissionais com a qual eu tive o privilégio de trabalhar.

Agradeço ao Notável Professor Mauro Martins Teixeira, pela valiosa contribuição, disponibilidade e atenção.

Agradeço ao Prof. Thiago Mattar Cunha, da USP de Ribeirão Preto, por sua colaboração intelectual, pelo apoio técnico oferecido em seu laboratório, pela confiança e oportunidades que me permitiram ser “um pouco mais cientista”.

Agradeço ao Prof. Flávio Almeida Amaral, pela imensa contribuição, e por alguns dos mais apreciáveis momentos de discussão científica que eu tive durante esses últimos quatro anos. Obrigado Prof. Flávio, pela disponibilidade, paciência e confiança!

Agradeço minha Orientadora Prof.^a Vanessa Pinho, por me aceitar em seu Grupo, e oferecer todas as condições necessárias para que eu pudesse concretizar o nosso trabalho com tranquilidade e dignidade.

Incipit vita nova.

RESUMO

A dor articular é um sintoma comum entre os paciente com artrite reumatoide (AR). Seu desenvolvimento depende da ação de alguns fatores algogênicos que são continuamente produzidos e ativam os nociceptores presentes nas estruturas articulares. Tal dinâmica contribui para a sensibilização de componentes do sistema nociceptivo e desencadeia o estabelecimento da dor crônica, da qual a reversão medicamentosa representa uma difícil e desafiante condição. Uma importante citocina relacionada à patogênese de diversas doenças reumáticas é o TNF. Sua neutralização contribui para a melhora dos sintomas articulares, incluindo a dor. Nesse sentido, o presente trabalho investigou as alterações inflamatórias e o papel de TNF no gânglio da raiz dorsal durante a hiperalgesia persistente observada após a resolução da resposta inflamatória em camundongos. Para tal, nós usamos o modelo de artrite induzida por antígeno (AIA). Nesse modelo, o pico da inflamação articular ocorreu nos tempos de 12 e 24 horas após a indução da AIA, e foi caracterizado por um influxo intenso de neutrófilos, aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias e lesão tecidual. O retorno desses parâmetros para a condição basal ocorreu entre 6 e 8 dias após a AIA, caracterizando a fase resolutiva no joelho acometido. A hiperalgesia mecânica, porém, persistiu por até 14 dias após a indução da inflamação articular. Esse fenômeno foi associado ao aumento na expressão de TNF e TNFR2 no DRG (gânglio da raiz dorsal- do inglês, *dorsal root ganglia*) nos dias 6 e 8 seguidos da indução do modelo. Em contrapartida, não houve alteração do TNF ou seus receptores no corno dorsal da medula espinhal (CDME). Além disso, verificamos uma neuroinflamação marcada pelo aumento na expressão gênica de IL-6, IL-1 β , CXCL2, COX2 e iNOS no DRG, acompanhado de um aumento na adesão de leucócitos nos vasos da intumescência lombar. Observamos ainda um aumento na quantidade de macrófagos positivos para Iba1 (macrófagos Iba1⁺) no DRG. Finalmente, a administração intratecal ou sistêmica de etanercept, uma droga utilizada na clínica para neutralizar o TNF, atuou especificamente no DRG, revertendo a hiperalgesia articular persistente. Nossos resultados , portanto, ampliam a compreensão sobre como o TNF atua no processo de estabelecimento da hiperalgesia articular após a resolução da resposta inflamatória.

Palavras-chave: Inflamação; resolução da resposta inflamatória; artrite; dor.

ABSTRACT

Joint pain is a devastating symptom experienced by arthritic patients and it is frequently persistent even under treatment that reduce signs of local inflammation. Continuous production of algogenic factors activate nociceptors in articular structures and contribute to chronic pain, a challenging and difficult condition to treat. TNF is a crucial cytokine to the pathogenesis of several rheumatic diseases and its inhibition is a hallmark for controlling joint symptoms, including pain. Here, we sought to investigate the inflammatory changes and the role of TNF into dorsal root ganglia (DRG) during persistent hypernociception after the resolution of joint inflammation in mice. Using an acute model of antigen-induced arthritis, the peak of joint inflammation occurred at 12-24 hours after local antigen injection, characterized by intense influx of neutrophil, pro-inflammatory cytokine production and joint damage. However, the inflammatory parameters in the joint returned to basal levels between 6 and 8 days after antigen-challenge, characterizing the resolving phase of joint inflammation. Interestingly, mechanical hyperalgesia is persistent up to 14 days after joint insult. The persistent nociception was associated with overexpression of TNF and TNFR2 in DRG, mainly at days 6 and 8. However, there was no change of TNF and its receptors in ipsilateral dorsal horn of spinal cord. Consistently, the neuroinflammation state was evidenced by increased IL-6, IL-1 β , CXCL2, COX2 and iNOS gene expression in lumbar DRG (L3-L5) and leukocyte adhesion in the lumbar intumescence vessels. Moreover, there was signs of macrophage activation in DRG by increase in Iba1 cells. Intrathecal or systemic injection of etanercept, an agent clinically utilized for TNF neutralization, at day 7 post arthritis reverted joint hyperalgesia by specific action in DRG. Our results provide a better understanding about how early events of joint inflammation could sensitizes nociceptors that trigger persistent TNF-dependent nociception even in moments of resolved joint inflammation.

Keywords: Inflammation; resolution of the inflammatory response; arthritis; pain.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Processo de migração celular durante inflamação	16
Figura 2. Influência dos mediadores pró-resolutivos sobre os eventos associados à diminuição da resposta inflamatória.....	17
Figura 3. Figura esquemática do aparato sensorial nociceptivo	21
Figura 4. Vasos da articulação expostos sob a superfície do tecido adiposo infrapatelar30	
Figura 5. Procedimento cirúrgico para exposição da medula espinhal para subsequente exposição ao intravital	31
Figura 6. Cinética do recrutamento de leucócitos na AIA	39
Figura 7 Avaliação histopatológica da articulação do joelho no modelo de AIA.....	40
Figura 8. Avaliação histopatológica e recuperação da articulação do joelho no modelo de AIA	41
Figura 9. Cinética da concentração de citocinas presentes no tecido articular após indução da AIA	42
Figura 10. Cinética da resposta nociceptiva na AIA	43
Figura 11. Aumento na expressão de c-fos no DRG após a resolução da resposta inflamatória no joelho	44
Figura 12. Avaliação do infiltrado celular e da resposta nociceptiva após o tratamento com dexametasona.....	46
Figura 13. Avaliação do infiltrado celular e da resposta nociceptiva após o tratamento com AS605240	47
Figura 14. Aumento no número de células positivas para Iba 1 no DRG após a resolução da resposta inflamatória no joelho.....	48
Figura 15. Aumento na expressão de moléculas inflamatórias no DRG após a resolução da resposta inflamatória periférica na AIA	49
Figura 16. Aumento na expressão gênica de TNF e de seu receptor TNFR2 no DRG após a resolução da resposta inflamatória periférica na AIA	50
Figura 17. A expressão gênica de TNFR1 e TRPV1 no DRG não se altera no modelo de AIA	51
Figura 18. Expressão de TNF no DRG após a resolução da resposta inflamatória na articulação acometida pela AIA	52
Figura 19. Reversão da hipernocicepção persistente após neutralização do TNF	53

Figura 20. Expressão de TNF na medula espinhal após a resolução da resposta inflamatória na articulação acometida pela AIA	54
Figura 21. Expressão de Iba1, GFAP, TNF, TNFR1 e TNFR2 no corno dorsal da medula espinhal após a resolução da resposta inflamatória na articulação acometida pela AIA.	55
Figura 22. Aumento na adesão de leucócitos na microvasculatura da medula espinhal	56
Figura 23. Reversão da hipernocicepção provocada pela ação de TNF no DRG após administração sistêmica de etanercept e permeabilidade do gânglio durante período não inflamatório da AIA.....	58

LISTA DE ABREVIATURA

ACPA: *anti-citrullinated protein antibodies* ou anticorpos antiproteínas citrulinadas

AIA: artrite induzida por antígeno

AR: artrite reumatoide

CAIA: *collagen antibody- induced arthritis* ou artrite experimental induzida por anticorpos contra colágeno

CDME: corno dorsal da medula espinhal

CGRP: *calcitonin gene-related peptide* ou peptídeo relacionado ao gene da calcitonina

DMARD: *disease- modifying anti-rheumatic drug* ou drogas modificadoras do curso da

DRG: *dorsal root ganglia* ou gânglio sensitivo da raiz dorsal

i.a.: intra articular

i.t.: intratecal

i.v.: intravenosa

IL-1R1: receptor de IL-1 β do tipo 1

JAK: *janus associated kinases* ou janus quinase

MHC: complexo de histocompatibilidade maior

Minf.: macrófago inflamatório

Mres.: macrófago resolutivo

NET.: *neutrophil extracellular traps*

PFA: Paraformaldeído

PSGL-1: *P-selectin glycoprotein ligand-1* ou ligante-1 de glicoproteína P-selectina

ROS: *reactive oxygen species* ou espécies reativas de oxigênio

s.c.: subcutâneo

TNFR1: receptor de TNF do tipo 1

TNFR2: receptor de TNF do tipo 2

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Inflamação	15
1.2. Resolução da resposta inflamatória	17
1.3. Artrite reumatoide	18
1.4. Aparato sensorial nociceptivo	20
1.5. Nociceptores articulares	21
1.6. Modelos experimentais de artrite e hiperalgesia articular	22
2. JUSTIFICATIVA	25
3. OBJETIVO	26
3.1. Geral	26
3.2. Específicos	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1. Animais	28
4.2. Artrite induzida por antígeno (AIA)	28
4.3. Lavado articular e quantificação de leucócitos na articulação do joelho	28
4.4. Histologia	29
4.5. Análise do recrutamento celular por microscopia intravital	30
4.5.1. Cirurgia para exposição dos vasos da articulação do joelho	30
4.5.2. Cirurgia para exposição dos vasos presentes na região posterior da intumescência lombar	30
4.5.3. Intravital	31
4.6. Registro da resposta nociceptiva	32
4.7. Injeção intratecal	33
4.8. Extração de tecidos	33
4.8.1. Gânglio da raiz dorsal (DRG)	33
4.8.2. Medula espinhal e corno dorsal da medula espinhal (CDME)	33
4.9. ELISA	34
4.10. Western blot	34
4.11. PCR quantitativo em tempo real (qPCR RT)	35
4.12. Permeabilidade vascular do DRG	36
4.13. Imunofluorescência	36
4.14. Análise estatística	37
5. RESULTADOS	38

5.1.	Inflamação na artrite induzida por antígeno (AIA) e manutenção da hiperalgesia articular após a resolução da resposta inflamatória no sítio periférico.....	38
5.2.	Resposta inflamatória e nociceptiva após o tratamento com dexametasona ou AS605240	45
5.3.	O gânglio da raiz dorsal (DRG) apresenta um status inflamatório transiente após a resolução da resposta inflamatória no sítio periférico	48
5.4.	A hiperalgesia mecânica residual no modelo de AIA está associada ao aumento na expressão de TNF e de seu receptor TNFR2 no DRG.	50
5.5.	A hiperalgesia mecânica residual no modelo de AIA está associada à ação de TNF no DRG, mas não no corno dorsal da medula espinhal (CDME).....	53
5.6.	A administração sistêmica de etanercept alcança o DRG e reverte a hiperalgesia articular após a resolução da inflamação.....	56
6.	DISCUSSÃO	59
7.	CONCLUSÃO	66
8.	REFERÊNCIAS	67
9.	APÊNDICE	81
10.	ANEXO	125

1. INTRODUÇÃO

1.1. Inflamação

A inflamação consiste em um conjunto de reações que garantem a proteção do organismo contra estímulos nocivos, sejam eles de natureza infecciosa ou estéril. Seu objetivo é extirpar o agente indutor que atua sobre o órgão ou tecido, restabelecendo a homeostase no sítio acometido ^{1,2}

A primeira descrição dos sinais clínicos da inflamação foi compilada por Cornélio Celsus em seu tratado *De medicina*, no século 1 A.D.. Suas observações conceberam os quatro sinais cardinais da inflamação, *rubor et tumor cum calore et dolore* (**rubor e tumor com calor e dor**). O quinto sinal cardinal, a **perda da função**, foi proposto por Rudolph Virchow em seu livro *Cellularpathologie*, publicado durante a segunda metade do século XIX ³. As bases fisiológicas que explicam a precipitação dos sinais cardinais também foram estabelecidas durante o século XIX, por Augustus Waller e Julius Cohnheim. Seus trabalhos destacavam a migração de leucócitos circulantes e as alterações vasculares como características da inflamação. Dentre os leucócitos, o neutrófilo é um importante tipo celular recrutado durante o início da inflamação, responsável pela eliminação do agente indutor ⁴⁻⁶.

O neutrófilo inicia o percurso entre o lúmen vascular e o sítio inflamatório após a ativação de uma cascata de eventos que inclui o rolamento, a adesão e a transmigração (figura 1) ⁴. O **rolamento** é caracterizado pela interação transiente entre as moléculas de selectinas e seus ligantes presentes na membrana celular dos neutrófilos e das células endoteliais ^{7,8}. A **adesão**, por sua vez, é mediada pela ação das integrinas permitindo forte interação do leucócito com endotélio ⁹. A ativação de vias dependentes de quimiocinas e seus receptores aumenta a disponibilidade e a afinidade de interação das integrinas que ancoram o neutrófilo ao endotélio vascular ^{4,10,11}. Por fim, o neutrófilo atravessa ativamente o vaso e ganha o parênquima do tecido inflamado por um processo denominado **transmigração** ¹².

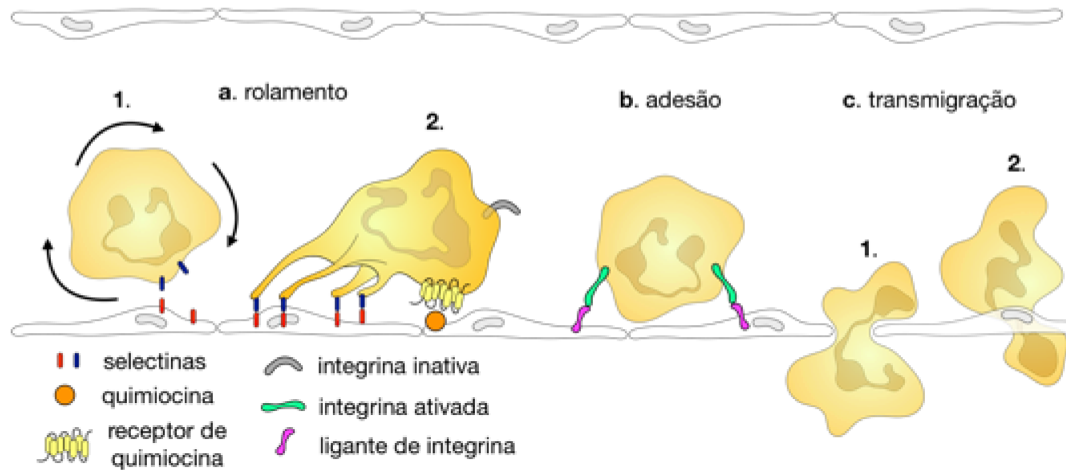


Figura 1. Processo de migração celular durante inflamação. As interações transitentes entre neutrófilos e células do endotélio induz o **rolamento** celular. Essa etapa é um reflexo da interação entre a L- selectina e o ligante-1 de glicoproteína P-selectina (PSGL-1, do inglês *P-selectin glycoprotein ligand-1*) ancorados à membrana celular do neutrófilo com a E- selectina e a P- selectina presentes nas células endoteliais (**a. 1.**). Durante essa etapa, quimiocinas na superfície do endotélio se ligam em seus receptores presentes no neutrófilo (**a. 2.**). Esse processo ativa vias de sinalização responsáveis pelo aumento da afinidade e disponibilidade das integrinas que induzem a **adesão** celular (**b.**). Em seguida, o neutrófilo atravessa o vaso em um processo denominado **transmigração**, que pode ser paracelular (**c. 1.**) ou transcelular (**c. 2.**). Essa figura foi baseada na revisão de Kolaczowska & Kubers (2013)⁴.

Uma vez no sítio inflamatório, os neutrófilos contribuem para a eliminação do agente indutor e consequente restabelecimento da homeostase tecidual. Sua ação efetora está associada com a ativação de mecanismos diversificados, como por exemplo a fagocitose, a degranulação de proteínas proteolíticas no meio extracelular ou pela extrusão de redes complexas formadas por componentes nucleares e enzimáticos (essas redes são denominadas de NETs, do inglês *neutrophil extracellular traps*) que capturam e degradam o patógeno¹³⁻¹⁵. Após a remoção do agente indutor que desencadeou a reação imune, um processo de resolução da resposta inflamatória é ativado¹⁶. Esse processo estimula vias de sinalização extra e intracelular que induzem a morte dos neutrófilos por apoptose, os quais são eferocitados por macrófagos que, a partir de então, sofrem reprogramação fenotípica e assumem um fenótipo resolutivo¹⁷. O desfecho do processo de resolução se resume no reparo do tecido lesado e seu retorno às condições basais¹⁸.

1.2. Resolução da resposta inflamatória

A resolução da resposta inflamatória é um processo ativo de restabelecimento da homeostase tecidual, coordenado pela ação de moléculas pró-resolutivas. Esses mediadores resolutivos regulam a diminuição gradual e controlada dos eventos inflamatórios. Eles estimulam processos relacionados com o catabolismo de moléculas inflamatórias, redução da migração de neutrófilos para o sítio inflamatório, apoptose de neutrófilos, alteração do fenótipo de macrófagos inflamatórios para macrófagos resolutivos, eferocitose e, conseqüentemente, contribuem para a recuperação do tecido lesado ¹⁶⁻¹⁸ (figura 2). Falhas no funcionamento desse processo podem prolongar e exacerbar a inflamação. Infelizmente, essa situação caracteriza o desenvolvimento de diversas doenças inflamatórias, incluindo a artrite reumatoide (AR) ¹⁸.

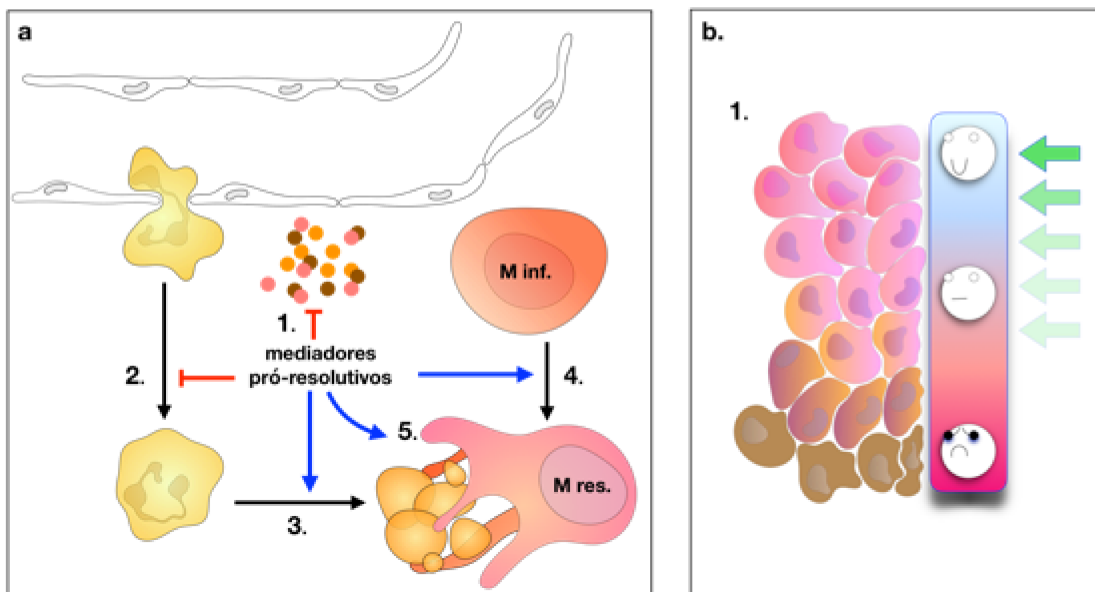


Figura 2.

Influência dos mediadores pró-resolutivos sobre os eventos associados à diminuição da resposta inflamatória. Os mediadores pró-resolutivos controlam a inflamação diminuindo a liberação de mediadores pró-inflamatórios (a. 1.), reduzindo a migração de neutrófilos (a. 2.), estimulando a apoptose (a. 3.), contribuindo para a alteração do fenótipo de macrófagos inflamatórios (M inf.) para resolutivos (M res.) (a. 4.) e induzindo a eferocitose (fagocitose de corpos apoptóticos) (a. 5.). Como efeito do desenvolvimento do processo resolutivo, observa-se a recuperação da integridade tecidual (b.) e restabelecimento da homeostase. Na figura a. as indicações em vermelho representam inibição e as setas azuis representam estimulação dos processos indicados. Em b. as setas verdes representam o progresso nos eventos pró-resolutivos em paralelo com a melhora da lesão tecidual.

Aqui, proponho que o aprofundamento do tema dessa seção seja realizado pela leitura do documento no APÊNDICE. Este documento contempla um capítulo intitulado “*Pro-*

resolving mediators” que foi publicado no livro *Imunopharmacology and Inflammation*, no ano de 2018, do qual tive a oportunidade de ser primeiro autor.

1.3. Artrite reumatoide

Artrite reumatoide (AR) é uma doença inflamatória que compromete a integridade e função das articulações sinoviais. Estima-se que essa doença acometa aproximadamente 1% da população mundial¹⁹, sendo que sua prevalência é maior em indivíduos do sexo feminino²⁰. Diversos trabalhos apontam o tabagismo e a susceptibilidade genética como importantes fatores de risco para o desenvolvimento da AR²¹. Em fumantes, por exemplo, há um aumento nos processos pós-translacionais relacionados à citrulinização de proteínas^{22,23} que estimulam a produção de anticorpos (anticorpos antiproteínas citrulinadas, ACPAs, do inglês *anti-citrullinated protein antibodies*)^{24,25} importantes para a patogênese da AR^{26,27}. A susceptibilidade genética está relacionada com o gene que codifica o complexo de histocompatibilidade maior (MHC), principalmente os alelos HLA-DRB1 com epítomos compartilhados²⁸. Mecanismos epigenéticos como a metilação do DNA e a acetilação das histonas também contribuem para a gênese da AR²⁹⁻³². Além disso, a exposição a agentes suspensos no ar, como a sílica^{33,34}, características relacionadas à microbiota intestinal³⁵ e oral³⁶, doenças periodontais^{36,37} e a obesidade³⁸ também constituem fatores de risco para a AR.

As consequências associadas à progressão da AR são extremamente agressivas. Além da degeneração do tecido ósseo e cartilaginoso, os pacientes artríticos sofrem com a precipitação de dores articulares persistentes e com a diminuição da mobilidade articular. Essa condição gera perda da capacidade produtiva³⁹, prejuízo social e familiar^{40,41} e consequente diminuição da qualidade de vida⁴². Não obstante, o indivíduo acometido pela AR ainda pode evoluir para um quadro de depressão⁴³⁻⁴⁵.

O desenvolvimento da AR inclui uma fase autoimune assintomática^{46,47}, sucedida por uma fase inflamatória, onde a doença se manifesta clinicamente^{47,48}. Durante a fase pré-clínica, frequentemente anos antes do aparecimento dos sintomas, níveis circulantes de ACPA e fatores reumatoides podem ser detectados^{49,50}. A presença desses componentes reflete uma ativação do sistema imune, mas não desencadeia, geralmente, qualquer tipo de reação⁴⁷. Já na fase inflamatória da AR, as reações imunológicas responsáveis pelo estabelecimento da doença são desencadeadas. A promoção dessas reações ocorre em virtude do aumento na atividade de células do sistema imune adaptativo que infiltram para o tecido sinovial⁵¹. Adicionalmente,

durante esse período há um aumento na produção de IL-1 β , TNF e IL-6 por macrófagos e ativação de fibroblastos sinoviais que podem liberar metaloproteinasas, mediadores inflamatórios lipídicos como prostaglandinas e os leucotrienos, ⁵² além de adquirirem um fenótipo responsável pela propagação da doença e pela destruição da cartilagem ⁵³. Justamente nessa fase, a enfermidade se manifesta clinicamente, apresentando uma inflamação sinovial que se caracteriza pelo aumento no influxo de leucócitos para a articulação acometida pela AR ⁴⁸.

O infiltrado celular observado na fase aguda da AR é constituído predominantemente por neutrófilos. A partir do momento que essas células migram da microvasculatura sinovial para as articulações, elas exibem um papel fundamental na patogênese da AR. Já nas articulações comprometidas, os neutrófilos são responsáveis pela degeneração do tecido articular através da liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) e enzimas que degradam a cartilagem ^{54,55} e pela estimulação de vias que ativam os osteoclastos ⁵⁶, que são células que provocam degradação da matriz óssea mineralizada ⁵⁷. Além disso, os neutrófilos liberam uma gama de moléculas inflamatórias que estimulam diretamente as células sensoriais nociceptivas ⁵⁸⁻⁶¹ no curso da artrite ⁵⁹. Como efeito, há uma diminuição do limiar de excitação do neurônio nociceptivo, provocando um aumento na sensibilidade na articulação afetada ⁶¹. Em resumo, a degeneração articular e constante estimulação do sistema nociceptivo proporcionam aos pacientes artríticos uma desagradável experiência relacionada à perda da mobilidade e ao desenvolvimento de dor nas articulações acometidas.

O tratamento da AR pode objetivar a remissão ou a diminuição da atividade da doença ⁶². As classes de fármacos mais amplamente utilizadas em pacientes artríticos são os anti-inflamatórios não esteroidais, glicocorticoides (como a prednisona) e as drogas modificadoras do curso da doença (DMARD, do inglês *disease-modifying anti-rheumatic drug*) de origem sintética, como o metotrexato ou inibidores da janus quinase (JAK, do inglês *janus associated kinases*). Uma vez que o uso desses fármacos não provoque uma melhora considerável nos parâmetros priorizados e estabelecidos entre o profissional da saúde e paciente, o uso de DMARD de origem biológica (inibidores de TNF, como o etanercept, inibidores de IL-6, e drogas que depletam células B, por exemplo) pode implementar o tratamento da AR ⁶³⁻⁶⁵. Entretanto, a dor articular pode se manifestar mesmo em pacientes submetidos aos tratamentos tradicionalmente utilizados ⁶⁶.

Os pacientes com AR consideram a dor articular como um dos principais problemas relacionados à doença ⁶⁶⁻⁶⁸. Alguns indivíduos que apresentam risco de desenvolver a AR relatam que a artralgia provoca irritação e incômodo em função de sua natureza intermitente e

pela perda da qualidade do sono. Em estágios mais avançados da doença, esse sintoma foi descrito como excruciante ⁶⁹. Apesar da dor articular ser intuitivamente relacionada com algumas lesões frequentemente observadas na AR, poucos trabalhos mostram fraca ou nenhuma associação entre esses dois parâmetros ^{70,71}. Porém, a literatura reconhece a inflamação ⁷² e as alterações plásticas que aumentam a sensibilidade central ^{73,74} como causas da dor articular na AR.

1.4. Aparato sensorial nociceptivo

O aparato sensorial nociceptivo é responsável pelo processamento de estímulos de natureza física, térmica ou química potencialmente nocivos (estímulos nociceptivos), que são interpretados como dolorosos por estratos superiores do sistema nervoso central ⁷⁵⁻⁷⁹. Entre os componentes que o integram, destacam-se os nociceptores (fibras aferentes primárias do tipo C e A δ), o gânglio da raiz dorsal (DRG) (órgão sensorial onde o corpo neuronal dos nociceptores se alojam) e o corno dorsal da medula espinhal (CDME), aonde se alojam algumas projeções descendentes, interneurônios (inibitórios ou excitatórios), os terminais centrais das fibras aferentes primárias e os neurônios de segunda ordem ⁷⁵ (figura 3).

Os corpos celulares dos nociceptores se aglomeram no DRG ^{80,81}. Esse órgão sensorial se localiza de ambos os lados ao longo da coluna vertebral, próximo ao forame intervertebral ⁸⁰, e possui um nervo e uma raiz ⁸². O nervo contém axônios que culminam em terminais periféricos e inervam vários tecidos, e a raiz é composta por axônios que penetram a medula espinhal e alcançam as lâminas mais superficiais do CDME com seus terminais centrais. Os terminais periféricos dos nociceptores são responsáveis pela transdução dos estímulos potencialmente nocivos que incidem sobre o organismo, e os axônios que compõem o nervo e a raiz transmitem essa informação até o terminal central localizado no CDME ^{75,82,83}.

Na medula espinhal, os terminais centrais dos nociceptores transmitem a informação nociceptiva proveniente da periferia para neurônios de segunda ordem ⁷⁹. O CDME é uma região dotada de extensa diversidade de elementos neuronais, entre os quais os interneurônios excitatórios e inibitórios bem como projeções da via descendente ^{75,76}. Esses elementos são capazes de amplificar ou diminuir o sinal eletroquímico que ascende aos estratos superiores do sistema nervoso central, sendo, portanto, agentes que modulam a intensidade da informação nociceptiva ^{84,85}.

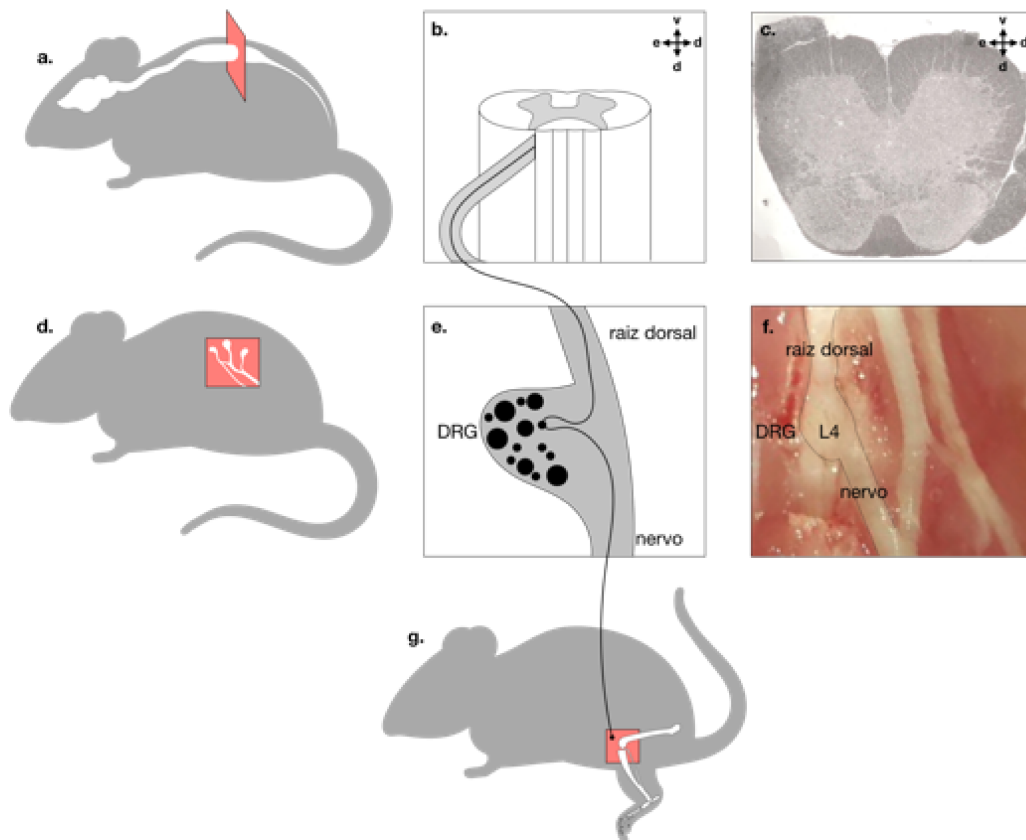


Figura 3. Figura esquemática do aparato sensorial nociceptivo. A figura **a.** mostra a medula espinhal de um camundongo que foi representada em **b.** e **c.** A figura **b.** exemplifica o local por onde a raiz dorsal do DRG penetra a região posterior da medula espinhal para ganhar acesso ao CDME. Em **c.** temos uma vista anterior de um corte transversal na medula espinhal no local designado pelo destaque vermelho em **a.** A figura **d.** mostra alguns gânglios lombares (L3-L5) representados genericamente em **e.** Na figura **e.** destacamos os corpos neuronais de nociceptores (círculos pretos médios representando as fibras do tipo A δ , e círculos pequenos representando as fibras do tipo C) que possuem uma projeção central, que acompanha a raiz dorsal em direção ao CDME, e uma projeção periférica, que segue o nervo em direção ao tecido periférico (joelho). Em **f.** observa-se a fotografia do DRG abaixo na quarta vértebra lombar (L4) com suas projeções central (raiz dorsal) e periférica (nervo). A fibra aferente primária possui um terminal periférico que pode ser observado em tecidos articulares (destaque em vermelho na figura **g.**) e cruza o DRG para alcançar o CDME.

1.5. Nociceptores articulares

As fibras aferentes primárias podem ser encontradas em diversas estruturas presentes na articulação sinovial⁸⁶⁻⁸⁸. Os terminais periféricos desses nociceptores, chamados nociceptores articulares, inervam a sinóvia, estruturas fibrosas como os ligamentos e a cápsula articular, menisco, periósteo e o tecido adiposo observado nas articulações⁸⁸⁻⁹⁰. A ativação dessas células conduz à sensação de dor articular e podem ser estimuladas por movimentos que geram tensão

contra a resistência de estruturas articulares ou pela aplicação de uma intensa força compressiva⁸⁸. Vale ressaltar que, como qualquer outro nociceptor, os nociceptores articulares possuem um limiar de excitação elevado, e por isso somente estímulos suficientemente intensos (estímulos nociceptivos) são capazes de produzir um potencial de ação nessas fibras⁸⁸. Porém em condições inflamatórias, há uma diminuição do limiar nociceptivo dessas células^{91,92}. Esse fenômeno, relacionado ao aumento da sensibilidade do aparato sensorial, pode provocar dor em virtude da incidência de um estímulo que normalmente não provocaria dor (alodinia) ou intensificar a dor induzida por um estímulo doloroso (hiperalgesia).

1.6. Modelos experimentais de artrite e hiperalgesia articular.

Alguns modelos experimentais exibem condições semelhantes às aquelas observadas em pacientes artríticos. A artrite induzida por antígeno (AIA), a artrite experimental induzida por anticorpos contra colágeno (CAIA - do inglês, *collagen antibody- induced arthritis*) e a artrite induzida por transferência sérica de camundongos K/BxN (K/BxN), por exemplo, apresentam infiltrado de células imunes, inflamação sinovial e destruição do tecido articular que são todas características também evidentes em indivíduos acometidos pela AR⁹³. Não obstante, as conclusões alcançadas após a realização de experimentos com animais são frequentemente extrapoladas para a doença em humanos.

Na AIA, as alterações histopatológicas observadas na articulação acometida são produtos de uma resposta inflamatória, induzida pela injeção intra-articular de mBSA em animais previamente imunizados com esse mesmo antígeno⁹⁴. Uma vez que o mBSA (substância catiônica) é injetado, ele fica retido na cartilagem (negativamente carregada)^{95,96}. Esse evento estimula a constante produção de anticorpos e formação de complexos imunes que contribuem para o desenvolvimento das reações subsequentes que desencadeiam a inflamação articular⁹⁵. Trabalhos realizados por nosso grupo demonstram que essa inflamação é autolimitada, ou seja, se resolve naturalmente⁹⁷⁻¹⁰⁰. Por exemplo, Lopes *et al.* (2011) evidenciou que o retorno no número de neutrófilos para valores basais na AIA ocorre 48 horas após o desafio com mBSA⁹⁷. Entretanto, mesmo após a resolução da resposta inflamatória, a hiperalgesia articular continua se manifestando nesse modelo⁹⁸. Essa sensibilidade na articulação acometida também é passível de ser investigada nos modelos experimentais de indução da artrite^{93,101,102}, incluindo na AIA¹⁰². O desenvolvimento da hiperalgesia neste modelo está associada a mecanismos de sensibilização periférica (aumento da sensibilidade do

nociceptor) e de sensibilização central (aumento da sensibilidade dos neurônios nociceptivos alojados no sistema nervoso central, especialmente no CDME)⁹³. Os dois processos podem ser estimulados pela ação de agentes inflamatórios^{103,104}.

Periféricamente, diversos trabalhos demonstram que citocinas como o TNF, o IL6 e a IL1 β são liberadas por células do sistema imune, e ativam seus respectivos receptores presentes no nociceptor articular^{61,98,104}. Esse evento desencadeia vias de sinalização que diminuem a excitabilidade dos nociceptores⁵⁸. Na AIA, o uso do antagonista do receptor de IL1- β do tipo 1 (IL-1R1) reverteu a hiperalgesia térmica gerada no modelo. Além disso, Ebbinghaus *et al.* (2012) mostraram que a administração intra-articular de IL-1 β foi capaz de elevar a sensibilidade ao estímulo mecânica de fibras aferentes primárias do tipo C presentes no joelho de camundongos¹⁰⁵. Outra importante citocina para o desenvolvimento da hiperalgesia na AIA é a IL-6. A evidência de que essa citocina pode estimular os nociceptores é proveniente de experimentos que mostram que a sua ação induz a liberação de peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP - do inglês *calcitonin gene-related peptide*) pela fibras nociceptivas¹⁰⁶. O papel de TNF é amplamente explorado na AIA. Diversos trabalhos mostram que a neutralização dessa citocina pode diminuir a hiperalgesia articular após a indução da AIA^{98,107}. Sachs *et al.* (2010) mostrou que a hiperalgesia associada ao aumento da expressão de TNF no tecido articular foi revertida pela administração sistêmica de etanercept (forma dimérica e solúvel do receptor do tipo 2 para TNF (TNFR2)) no modelo de AIA. Neste modelo, outras citocinas, como a IL-22 e a IL-17, também são importantes para desenvolvimento da hiperalgesia mecânica articular^{108,109}.

A sensibilização central, por sua vez, pode ser associada à atividade de citocinas como a IL1- β e o TNF, que aumentam as correntes excitatórias e diminuem as correntes inibitórias na medula espinhal^{103,110,111}. Essas citocinas são sintetizadas e liberadas nesse estrato do sistema nervoso central por células da micróglia ativada^{112,113}. Corroborando esses dados, Quadros *et al.* (2015) mostram que o desenvolvimento da hiperalgesia articular no modelo de AIA foi relacionado à expressão de IL1- β e TNF na medula espinhal. Além disso, eles evidenciaram um aumento na expressão de Iba1 e GFAP, que são marcadores de ativação de micróglia e de astrócitos, respectivamente. Esses dados mostram que o aumento da sensibilidade central mediada pela neuroinflamação na medula espinhal pode ser uma via possível para o estabelecimento da sensibilidade articular na AIA.

Vários estudos descrevem diversificados mecanismos de indução da hiperalgia na AIA. Porém, evidências de processos que expliquem como essa hiperalgia articular pode persistir após a resolução da resposta inflamatória na AIA ainda são escassos na literatura.

2. JUSTIFICATIVA

Alguns medicamentos disponíveis para o tratamento da AR objetivam diminuir a atividade da doença ou provocar sua remissão ⁶² controlando a progressão da inflamação articular ¹¹⁴. Entretanto, a dor nas articulações acometidas pode se manifestar em alguns pacientes artríticos ainda que os mesmos estejam em regime de tratamento ⁶⁶. A possibilidade de que a dor articular se perpetue mesmo após a reversão dos parâmetros inflamatórios é um fenômeno observado não somente na clínica, mas também na experimentação animal.

Em nosso grupo temos verificado que após a indução da AIA, os animais desenvolvem uma hiperalgesia que se mantém por um período superior ao necessário para que a inflamação no joelho seja completamente resolvida. Acreditamos que esse fenômeno pode ser um reflexo da ativação de mecanismos de sensibilização subjacentes, isolados da influência da ação de agentes inflamatórios no joelho acometido. Mesmo que essa observação apresente potencial relevância do ponto de vista clínico, os processos relacionados ao desenvolvimento da dor articular após a resolução da resposta inflamatória permanecem inexplorados.

3. OBJETIVO

1.7. Geral

Investigar o mecanismo relacionado à manutenção da hiperalgesia articular após a resolução da resposta inflamatória natural na AIA.

1.8. Específicos

1. Avaliar a cinética de rolamento e adesão de leucócitos na microvasculatura presente na articulação do joelho de camundongos após a indução da AIA.
2. Avaliar a cinética do acúmulo de leucócitos na cavidade articular após a indução da AIA.
3. Avaliar os aspectos histopatológicos do joelho de animais acometidos pela AIA.
4. Avaliar a resposta nociceptiva no joelho de camundongos durante a fase inflamatória e após a resolução da resposta inflamatória no modelo de AIA.
5. Avaliar a resposta inflamatória e a cinética da resposta nociceptiva no modelo de AIA após o tratamento com dexametasona e AS605240.
6. Avaliar a expressão de moléculas inflamatórias no DRG após a resolução da resposta inflamatória no joelho de camundongos acometidos pela AIA.
7. Avaliar a expressão de TNF e a de seus receptores TNFR1 e TNFR2 no DRG após a resolução da resposta inflamatória no joelho de camundongos acometidos pela AIA.
8. Avaliar o efeito da injeção intratecal (i.t.) de etanercept após a resolução da resposta inflamatória no modelo de AIA, sob a resposta nociceptiva no joelho de camundongos

9. Avaliar a cinética da expressão de moléculas relacionadas com a ativação de células da micróglia e astrócitos na medula espinhal, especificamente no CDME.
10. Avaliar a expressão de TNF e de seus receptores TNFR1 e TNFR2 na medula espinhal, especificamente no CDME.
11. Avaliar o recrutamento de leucócitos para na região posterior da intumescência lombar da medula espinhal após a resolução da resposta inflamatória na AIA.
12. Avaliar o efeito da administração sistêmica de etanercept sob a resposta nociceptiva no joelho de camundongos após a resolução da resposta inflamatória no modelo de AIA.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

1.9. Animais

Para realização do trabalho foram utilizados camundongos isogênicos da linhagem C57Bl/6JUnib, machos, pesando entre 20 e 25 gramas (g) que foram submetidos aos procedimentos experimentais somente a partir da 7^o semana de vida. Eles foram adquiridos do Centro de Bioterismo (CEBIO) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), e transportados ao biotério do laboratório de Imunofarmacologia situado no Instituto de Ciências Biológicas (ICB) dessa mesma Universidade. Os camundongos foram acondicionados em caixas plásticas forradas com maravalha, dentro de uma estante ventilada, com livre acesso à água filtrada e ração, em ambiente com temperatura (20-25°C) e ciclo claro-escuro (12h- 12h) controlados. Todos os experimentos foram realizados em acordo com o guia da Associação Internacional para o Estudo da Dor (*International association for Study of Pain- IASP*) e aprovados pelo comitê de ética em experimentação animal da UFMG (51/2018) (ANEXO).

1.10. Artrite induzida por antígeno (AIA)

Inicialmente, todos os camundongos receberam uma injeção subcutânea (s.c.), contendo 100µl de emulsão para imunização (500µg de albumina de soro bovino metilado (mBSA - do inglês, *methylated bovine serum albumin*) / 50µl de PBS / 50µl de CFA (*complete Freud's adjuvant*)), que foi administrada na região dorsal, próximo à base da cauda dos animais. Para indução da artrite, 14 dias após serem sensibilizados os animais receberam uma injeção intra-articular (i.a.) contendo 10µl de uma solução para desafio (1mg de mBSA / ml de PBS) na articulação do joelho. Os animais controle, ou seja, que não desenvolveram a artrite experimental, receberam uma da injeção i.a. contendo 10µl de PBS. Tanto o procedimento de imunização quanto o de desafio foram realizados em animais anestesiados^{94,97,99}.

1.11. Lavado articular e quantificação de leucócitos na articulação do joelho

Para recuperação dos leucócitos presentes no sítio inflamatório, a articulação do joelho dos camundongos foi exposta cirurgicamente e subsequentemente lavada (por três vezes, um

volume de 3,33µl de BSA 3% foi aspirado e dispensado dez vezes sobre a superfície da articulação cirurgicamente exposta). Esse procedimento foi realizado horas ou dias (devidamente especificados nos gráficos) após a injeção i.a. de mBSA ou PBS. O volume de 10µl da solução de BSA 3% contendo as células coletadas foi subsequentemente ressuspensionado em 90µl da mesma solução. Do total de 100µl, portanto, 30µl da amostra foram homogeneizados em 30µl de líquido de Turk para contagem total de leucócitos em câmara de Neubauer. A contagem total foi realizada em um microscópio de luz. Os 70µl restantes foram homogeneizados em 100µl de BSA 3%, e centrifugados para confecção de lâminas citológicas, que foram coradas em Panótico para contagem diferencial de neutrófilos e células mononucleares.

1.12. Histologia

Para avaliação histopatológica nós coletamos a articulação do joelho dos animais desafiados com mBSA ou PBS. As amostras foram fixadas em formalina tamponada 10% (pH 7,4) e colocadas durante 4 semanas em uma solução de EDTA 14% para descalcificação. Em seguida, os joelhos foram embebidos em parafina e seccionados para confecção de lâminas histológicas. As amostras presentes nessas lâminas foram coradas com H&E ou com tricrômico de Masson. As amostras coradas com H&E foram avaliadas e pontuadas por um patologista, de maneira cega, para os seguintes parâmetros: infiltrado inflamatório, hiperplasia da membrana sinovial, presença de células inflamatórias no espaço sinovial e reabsorção óssea. As notas foram somadas para obter um escore histológico (variando de 0 a 12), conforme descrito por Queiroz-Junior *et al.* (2011)¹¹⁵. As amostras coradas com tricrômico de Masson foram submetidas à morfometria para avaliação da fibrose. As imagens do tecido sinovial foram digitalizadas e analisadas usando o software Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD). A fibrose no tecido sinovial foi considerada como sendo a porcentagem da área sinovial corada com tricrômico de Masson (que denota uma deposição de colágeno) em relação à superfície sinovial total.

1.13. Análise do recrutamento celular por microscopia intravital

1.13.1. Cirurgia para exposição dos vasos da articulação do joelho

Para exposição dos vasos do joelho a pele que revestia anteriormente essa articulação foi seccionada e rebatida, deixando aparente as estruturas que seriam manipuladas. Em seguida, o tendão do músculo quadríceps femoral foi seccionado em sua inserção no osso da tíbia, expondo, então, a região infrapatelar rica em tecido adiposo logo acima do tecido sinovial, onde foi possível visualizar os vasos que foram subsequentemente avaliados (figura 4). Todos os experimentos descritos acima neste tópico foram realizados em animais devidamente anestesiados com uma solução contendo quetamina e xilazina.



Figura 4. Vasos da articulação expostos sob a superfície do tecido adiposo infrapatelar.

1= tendão do músculo quadríceps femoral; 2= músculo tibial anterior; 3= tecido adiposo infrapatelar. As setas amarelas indicam os vasos presentes na superfície do tecido exposto.

1.13.2. Cirurgia para exposição dos vasos presentes na região posterior da intumescência lombar

Para exposição dos vasos presente na intumescência lombar (figura 5), inicialmente os músculos vertebrais foram gentilmente removidos, desde a região torácica até a região lombar,

de forma que as vértebras ficassem aparentes. Para exposição da medula espinal foi realizada uma laminectomia. Este procedimento se deu através de incisões nas regiões laterais direita e esquerda de cada vértebra, posteriormente aos processos transversos, começando em L1 e se estendendo até L5. Em seguida a vértebra era rebatida e removida, revelando os vasos da superfície dorsal da medula espinal. Para realização do procedimento cirúrgico descrito acima, os animais foram gentilmente posicionados em uma placa térmica, a 37°C, mantendo estável a temperatura dos camundongos. Todos os experimentos descritos acima neste tópico foram realizados em animais previamente anestesiados com uma solução contendo quetamina e xilazina. Essa anestesia foi mantida com isoflurano inalatório durante o procedimento.

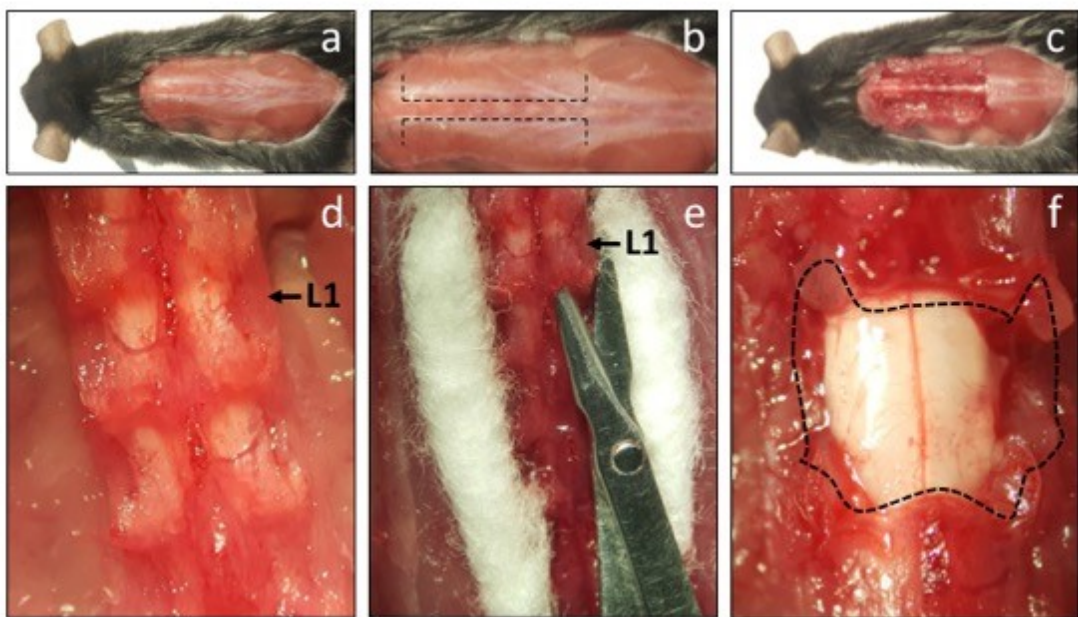


Figura 5. Procedimento cirúrgico para exposição da medula espinal para subsequente exposição ao intravital. Campo cirúrgico (a e b) e exposição da região lombar (c) onde as vértebras foram removidas por laminectomia. Identificação da primeira vértebra lombar (L1) (d) e posicionamento do instrumento cirúrgico para realização cuidadosa da laminectomia (e). Região logo abaixo de L1, onde é possível visualizar os vasos presentes na medula espinal (f).

1.13.3. Intravital

Após a cirurgia para exposição dos vasos do joelho ou da intumescência lombar, os animais receberam uma injeção intravenosa (i.v.) de Rhodamina 6G-Sigma (0.5mg /kg), marcando os leucócitos que foram identificados através da emissão de fluorescência. Em seguida os animais foram precisamente posicionados para avaliação do rolamento e adesão na microcirculação do joelho ¹¹⁶ ou da medula espinal em um microscópio intravital (Nikon C-SRS H550L; Japan ou ECLIPSE 50i; Nikon) por uma objetiva com aumento de 20X. Uma

câmera digital (Nikon DSQ1MC, Japan ou DS-Q11MC; Nikon) acoplada ao microscópio foi usada para projetar imagens a um monitor de computador. Essas imagens foram gravadas para posterior análise usando o programa Imaging software (NIS ELEMENTS-NIKON). O número de leucócitos rolando e aderentes foi determinado após análise das imagens gravadas. Leucócitos rolando foram definidos como células se movendo em uma velocidade menor que aquelas de eritrócitos dentro de um determinado vaso. O número de células rolando foi determinado pela contagem de células que cruzavam uma demarcação digital sobreposta ao vaso durante o período de 1 minuto. Esse procedimento foi realizado em vasos com espessura entre 15 e 30 μ m no joelho e entre 20 e 30 μ m na intumescência lombar. O número de leucócitos aderidos foi quantificado a partir da contagem de células que permaneciam imóveis (aderentes) pelo período de 30 segundos (seg.) dentro de um comprimento de 100 μ m de vaso. Esses dois parâmetros, rolamento e adesão, foram obtidos durante a realização de um mesmo experimento.

1.14. Registro da resposta nociceptiva

A resposta nociceptiva foi avaliada usando o método de Von Frey, como descrito previamente⁹⁹. Em uma sala protegida de ruídos externos, os camundongos foram acomodados em um compartimento com uma superfície inferior contendo aberturas e paredes acrílicas. Acomodados, os camundongos foram mantidos nesse espaço por um período entre 15 e 30 minutos para ambientalização. Uma vez que os animais não mais apresentaram movimentos exploratórios e mantendo o membro posterior em repouso, a estimulação para registro do limiar nociceptivo foi realizada utilizando um algosímetro eletrônico (Insigth - Ribeirão Preto, Brasil) composto por um transdutor de força, adaptado com uma ponteira de polipropileno (4,15mm²). Com esse transdutor, uma força horizontal foi aplicada na região central da superfície plantar da pata dos camundongos, com intuito de provocar uma diminuição do ângulo da articulação tíbio-femoral (flexão de joelho) nos animais artríticos e controles. Imediatamente após esse estímulo induzir uma resposta de retirada de pata, o algosímetro registrou automaticamente a intensidade da força aplicada em gramas (g). Esse procedimento foi realizado três vezes para confirmação consistente da resposta do animal. Os resultados foram expressos como limiar de retirada, e representado por valores absolutos.

1.15. Injeção intratecal

Com uma agulha de 30G, a injeção intratecal (i.t.) (etanercept 0,5µg, 5µg ou 50µg / 5µl veículo ou somente 5µl de veículo) foi aplicada no espaço entre a 5ª e a 6ª vertebrae lombares dos camundongos já anestesiados. Consideramos que a administração foi correta quando, ao inserirmos a agulha, o animal apresentou um reflexo de cauda ¹¹⁷.

1.16. Extração de tecidos

1.16.1. Gânglio da raiz dorsal (DRG)

Após receberem uma injeção de anestésico (dose letal contendo 180 mg/kg de quetamina e 24mg /kg de xilazina diluídas em 100 µl de PBS administradas intraperitonealmente), a cirurgia para a exposição do mediastino dos camundongos foi realizada. Tal procedimento permitiu a visualização do coração do animal. Em seguida, uma agulha acoplada a uma bomba peristáltica (Gilson Incorporated – Middleton, USA) foi inserida no ventrículo esquerdo do animal, ao passo que no átrio direito foi feita uma incisão delicada. Com isso, após a bomba peristáltica ser acionada, o sangue do animal escoou pela incisão feita no átrio direito, e a solução fisiológica (PBS) (4°C) foi introduzida pela agulha inserida no ventrículo esquerdo. Tal procedimento teve por finalidade evitar contaminação com sangue dos tecidos que foram subsequentemente coletados, o DRG e medula espinhal.

Após a perfusão intracardíaca, os DRG's localizados abaixo da terceira, quarta e da quinta vertebrae lombares (L3, L4 e L5) foram coletados. Para tal procedimento realizamos a dissecação dos músculos posteriores aderidos ou próximos à região lombar, seguido de uma laminectomia nas vertebrae lombares. Para a realização de técnicas biomoleculares, os DRG's foram delicadamente removidos com uma pinça e imediatamente congelados em nitrogênio. Em seguida o material foi armazenado em um freezer a -80°C. Para a realização de imunofluorescência, o DRG L4 foi coletado e armazenado em paraformaldeído (PFA) 4% por 24 horas.

1.16.2. Medula espinhal e corno dorsal da medula espinhal (CDME)

Após a perfusão intracardíaca, a intumescência lombar dos camundongos foi removida. O procedimento para coleta desta estrutura incluiu a dissecação dos músculos posteriores

aderidos e próximos à região lombar, seguido de uma laminectomia das vertebrae lombares e torácicas que protegem a medula espinhal dos animais. Em seguida, uma secção proximal e outra distal foram feitas na medula espinhal, entre onde é possível notar a intumescência lombar, que apresenta uma espessura visivelmente maior. Uma vez coletada, a intumescência lombar foi seccionada e separada em lado direito e esquerdo, e entre regiões anterior e posterior. Em sequência as amostras foram congeladas em nitrogênio e subsequentemente armazenados em um freezer a -80° C. O material coletado foi utilizado para realização de técnicas biomoleculares.

1.17. ELISA

As concentrações das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-22 e IL-17 foram quantificadas por ELISA a partir do homogenato de tecido articular obtido de animais desafiados com mBSA ou PBS, após eutanásia nos tempos de 12 horas, 1, 2, 4, 6 e 8 dias após o desafio. Os tecidos foram homogeneizados em PBS contendo antiproteases (0.1mM PMSF), 0.1 nM benzethonium chloride, 10 mM EDTA, 20 unidades de inibidor de calicreína, aprotinin A, e 0.05% Tween 20 (10 μ l de solução para cada 1mg de tecido). Em seguida as amostras foram centrifugadas por 10 min. a 10.000 rpm, na temperatura de 4°C. As diluições do sobrenadante em PBS (1:3) foram imediatamente analisadas pelo método de ELISA. As concentrações das citocinas foram mensuradas em acordo com as recomendações do fabricantes (R&D System). As reações colorimétricas foram analisadas com um espectrofotômetro em um comprimento de onda de 492 nm.

1.18. Western blot

O pool de dos DRG's L3, ou L4 ou L5 de três animais foi coletado e homogeneizados em solução de lise (50 μ l) contendo 1% Triton X-100, 100 mM Tris/ HCl, pH 8.0, 10% glicerol, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 2.5 l g/ml leupeptina, 5 l g/ml aprotinina, e 1 mM ortovanadato de sódio. Depois, as amostras foram incubadas no gelo por 15 minutos antes de serem centrifugados a 10.000 rpm durante 15 minutos a uma temperatura de 4 C°. Após a centrifugação, o sobrenadante das amostras foi retirado e a concentração de proteínas quantificada pelo método de Bradford¹¹⁸ utilizando um kit de reagente manufaturado (Bio-Rad - USA). Uma vez quantificadas, quantidades iguais das amostras (40 μ g) foram

empilhadas em gel de SDS-poliacrilamida 4%, separadas por eletroforese através do gel de SDS-poliacrilamida 12% e transferidas para uma membrana de nitrocelulose. Depois, as membranas foram bloqueadas por 24 horas a 4°C com PBS contendo 5% de leite desnatado e 0,1% de Tween 20, lavadas por 3 vezes com PBS 0,1% de Tween e incubados com anticorpo primário contra a proteína de interesse TNF (Santa Cruz, sc-1348) ou contra a proteína constitutiva GAPDH (HRP conjugated- Cell signaling, #3683) em PBS contendo 5% BSA e 0,1% de Tween por 24 horas. Em seguida, as membranas foram novamente lavadas por 3 vezes com PBS 0,1% de Tween e incubadas com anticorpo secundário (Santa Cruz, sc-2768) por 24 horas. As bandas imunorreativas foram visualizadas usando o sistema de detecção por ECL segundo as recomendações do fabricante (Amersham Biosciences). Para determinação do nível de expressão das proteínas avaliadas, essas bandas imunorreativas foram quantificadas por densitometria, utilizando o software Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD). O nível de expressão da proteína de interesse foi normalizado em relação ao nível de expressão da proteína constitutiva gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e expressos em unidades arbitrárias (UA).

1.19. PCR quantitativo em tempo real (qPCR RT)

O RNA das amostras de DRG (L3-L5) e medula espinhal foram extraídos com o reagente de Trizol (Invitrogen Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA), segundo as recomendações do fabricante. A quantificação e avaliação do RNA obtido foram feitas utilizando um espectrofotômetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific - Waltham, MA, USA). A concentração foi obtida em ng/ µl, e somente as relações de absorvância (para os comprimentos de onda de 260nm / 230nm e 280nm / 260nm) que variavam entre 1,8 e 2,0 foram utilizadas. Foram adicionados OligoDT (5'-(TTT)5-3') às amostras que, em seguida, foram aquecidas por 5 min. a 70°C. Seguindo, foi adicionado às amostras uma mistura contendo a enzima transcriptase reversa SuperScript III, inibidor recombinante de ribonuclease (RNase Out) (Life Technologies – Carlsband, CA, EUA), um agente redutor para proteção da reação (ditiotretol, DTT, 1mM) e tampão concentrado da mesma enzima. No termociclador, as amostras foram mantidas por 5 min. a 25°C, 90 min. a 50°C, 15 min. a 70°C e em seguida a 4°C. Para realização das análises pela qPCR em tempo real, uma solução contendo o reagente Power SYBR[®] Master Mix (life Technologies- Carlsband, CA, USA) e os pares de iniciadores (Integrated DNA-Coralville, IA, USA) em um volume final de 0,5 µl foram adicionados às amostras de cDNA

diluídas. A reação aconteceu com o auxílio do instrumento 7500 Fast (Applied Biosystems, Waltham, MA, EUA), com programa de reação de 10 min. a 95°C, seguido de 40 ciclos a 95°C por 60 seg. e 60°C por 60 seg., seguidos por curva de dissociação. Os resultados dados pelo ciclo limitante (*threshold cycle*, CT), foram calculados através do método de 2- Δ CT ou 2- $\Delta\Delta$ CT (Schmittgen & Livak, 2008), normalizados pela expressão do gene da enzima GAPDH.

1.20. Permeabilidade vascular do DRG

O extravasamento do corante Azul de Ivans foi utilizado para avaliação da permeabilidade vascular do DRG. 8 dias após o desafio com mBSA, nós realizamos uma injeção subcutânea contendo o volume de 100 μ l de solução de azul de Ivans (dose de 20mg/kg). 30 minutos depois da administração do corante, o gânglio sensorial abaixo da quarta vertebra lombar (L4) foi cuidadosamente removido e imediatamente incluído em solução crioprotetora (meio tissue-tek OCT). O tecido foi cortado em criostato na espessura de 20 μ m, e preparado para análise em microscópio confocal. Os núcleos presentes no corte histológico foram marcados com DAPI e a permeabilidade dos vasos do DRG foi mensurado pela quantidade de fluorescência emitida pelo azul de Evans neste órgão.

1.21. Imunofluorescência

Imediatamente após a dissecação, o DRG (L4) foi imerso em uma solução de paraformaldeído a 4% tamponado pelo período de 1 hora. Em seguida, o DRG foi transferido para uma solução fisiológica (PBS) aonde permaneceu por 30 minutos. Após essa lavagem do tecido, o DRG ficou por 1 hora em solução de sacarose 10%, 1 hora em solução de sacarose 20% e 24 horas na solução de sacarose de 30%. Depois, realizamos a inclusão do tecido em solução crioprotetora (meio tissue-tek OCT). O tecido foi cortado em criostato na espessura de 20 μ m, e preparado para análise em microscópio confocal. Nós utilizamos os anticorpos para cfos (1:500, cat #MA1-21190, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) e Iba1 (1:100, cat #PA5-21274, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Os anticorpos secundários foram o Alexa Fluor 647 (1:1000, cat #A-21240, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) e o Alexa Fluor 488 (1:1000, cat #A-11008, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) Os núcleos presentes no corte histológico foram marcados com DAPI (1:1000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). As imagens foram obtidas usando um microscópio

confocal (Leica TCS SP8, Leica Microsystems, Mannheim, Germany). A intensidade de fluorescência relativa à detecção de c-Fos foi quantificada usando o software LAS X (Leica Microsystems, Mannheim, Germany). O número de macrófagos presentes no DRG foi quantificado com base em uma contagem simples do número total de todas as células marcadas para Iba1 (Iba1⁺) presentes em um corte histológico de DRG.

1.22. Análise estatística

Os gráficos em nosso trabalho foram confeccionados e analisados pelo Graph- Pad Software's Prism version 6. Os dados foram expressos como a média \pm SEM. A comparação entre dois grupos foi realizada pelo teste t de Student (two-tailed). A comparação entre três ou mais grupos foi realizada pelo one-way ANOVA, seguida pelo pós teste de Dunnett. O Two-way ANOVA foi adotado para comparar a resposta nociceptiva entre os grupos ou doses em diferentes tempos, e o pós teste foi determinado de acordo com a recomendação do software de análise utilizado. O valor de significância adotado foi de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

1.23. Inflamação na artrite induzida por antígeno (AIA) e manutenção da hiperalgesia articular após a resolução da resposta inflamatória no sítio periférico

Inicialmente, realizamos a avaliação da interação dos leucócitos com o endotélio de vênulas presentes na articulação do joelho após indução da AIA (figura 6a e b). Nós verificamos um aumento no número de células rolando na microvasculatura de animais artríticos nos tempos de 12 horas e de 2 dias após o desafio. O retorno para valores basais foi registrado 4 dias após a indução da artrite (figura 6a). Um aumento na quantidade de células aderidas foi observado nos tempos de 6 horas, 12 horas e de 2 dias (figura 6b). Assim como para o rolamento, 4 dias após o desafio a adesão havia retornado para valores semelhantes aos observados no grupo controle (figura 6b).

Após verificarmos o aumento no rolamento e na adesão de leucócitos, nós avaliamos a cinética do infiltrado de leucócitos recrutados para a articulação do joelho de camundongos acometidos pela AIA (figura 6c). Observamos um aumento no número de neutrófilos presentes na cavidade do joelho de animais artríticos nos tempos de 12 horas e de 1 dia após o desafio. O recrutamento celular nos tempos supracitados representou o pico da resposta inflamatória no modelo utilizado. Já no tempo de 2 dias nós percebemos uma queda no número de neutrófilos, que diminuiu até alcançar valores semelhantes aos do grupo não artrítico 8 dias após a indução da AIA. Além disso, houve um aumento no número de células mononucleares nos tempos de 1 e 2 dias, sendo que o maior aumento ocorreu 2 dias após o desafio, coincidindo com a queda no número de neutrófilos. O número de células mononucleares somente retornou aos valores basais 8 dias após o desafio.

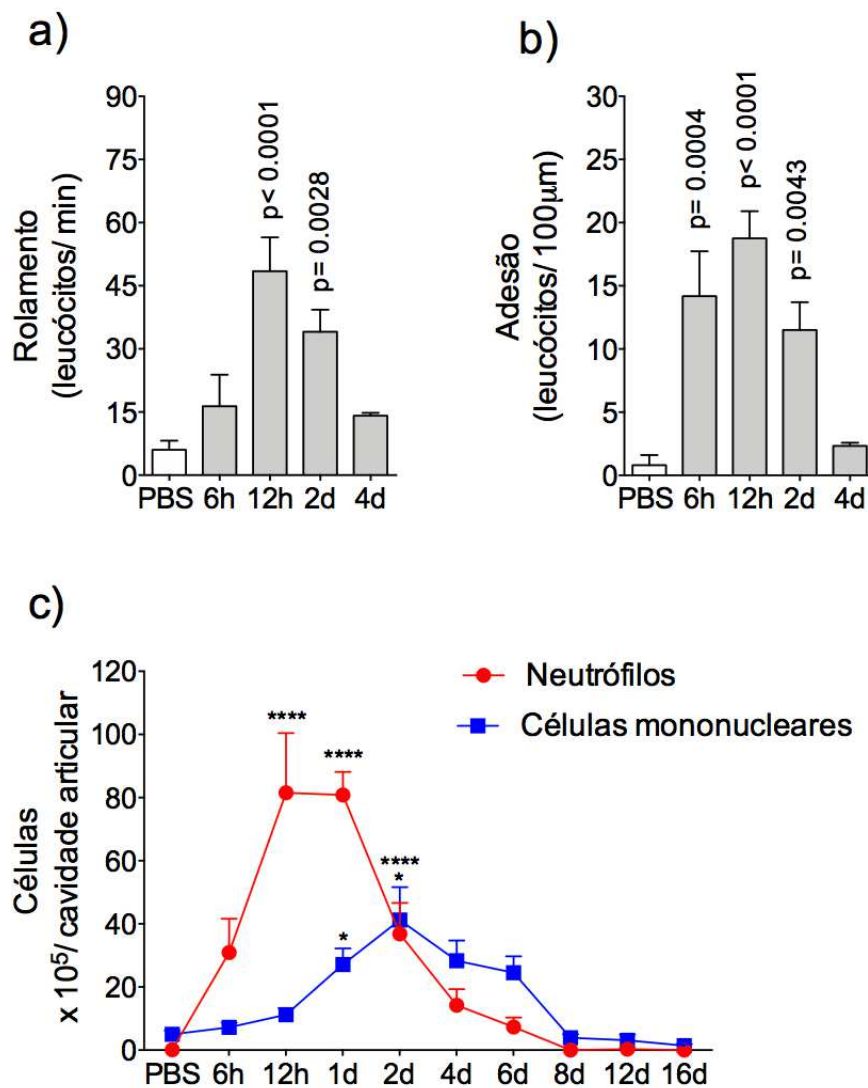


Figura 6. Cinética do recrutamento de leucócitos na AIA. Para a indução da AIA, os animais previamente imunizados (injeção s.c. contendo 500µg mBSA dissolvidos em 50µl de PBS e emulsionados com 50µl CFA) foram desafiados com uma injeção i.a. contendo 10µg de mBSA dissolvidos em 10µl de PBS. Os animais controles, que não desenvolveram a AIA, foram desafiados com uma injeção i.a. contendo somente 10µl de PBS. O rolamento (a) e a adesão (b) foram avaliados em diferentes tempos após a indução da AIA (n= 5). O rolamento foi mensurado como sendo o número de células que cruzava um ponto específico do vaso ao longo de 1 minuto. Um leucócito foi considerado aderido ao vaso quando permaneceu estático por 30 segundos. O total de leucócitos aderidos foi quantificado como sendo o número de células estáticas na vênula dentro de um comprimento de 100µm. O número de leucócitos que migraram para a articulação do joelho foi mensurado em diferentes tempos após a AIA (c) (n= 4-6). Para quantificação do infiltrado celular a cavidade articular foi lavada e as células totais recuperadas foram contadas na câmara de Neubauer e diferenciadas em neutrófilos ou células mononucleares por microscopia de luz. Os resultados foram expressos como média ± SEM; * p < 0,05, **** p < 0,0001 (c) ou p = ao valor especificado no gráfico (a, b) quando comparado ao grupo controle PBS.

A avaliação histopatológica do joelho mostrou um intenso infiltrado inflamatório no tecido articular 1 e 2 dias após o desafio com mBSA (figura 7a). Detectamos, ainda, uma hiperplasia focal da membrana sinovial e pontos de reabsorção óssea. Oito dias após a indução da AIA, o infiltrado inflamatório foi substituído por tecido fibrótico, caracterizado por uma grande deposição de colágeno (figura 8 a e b).

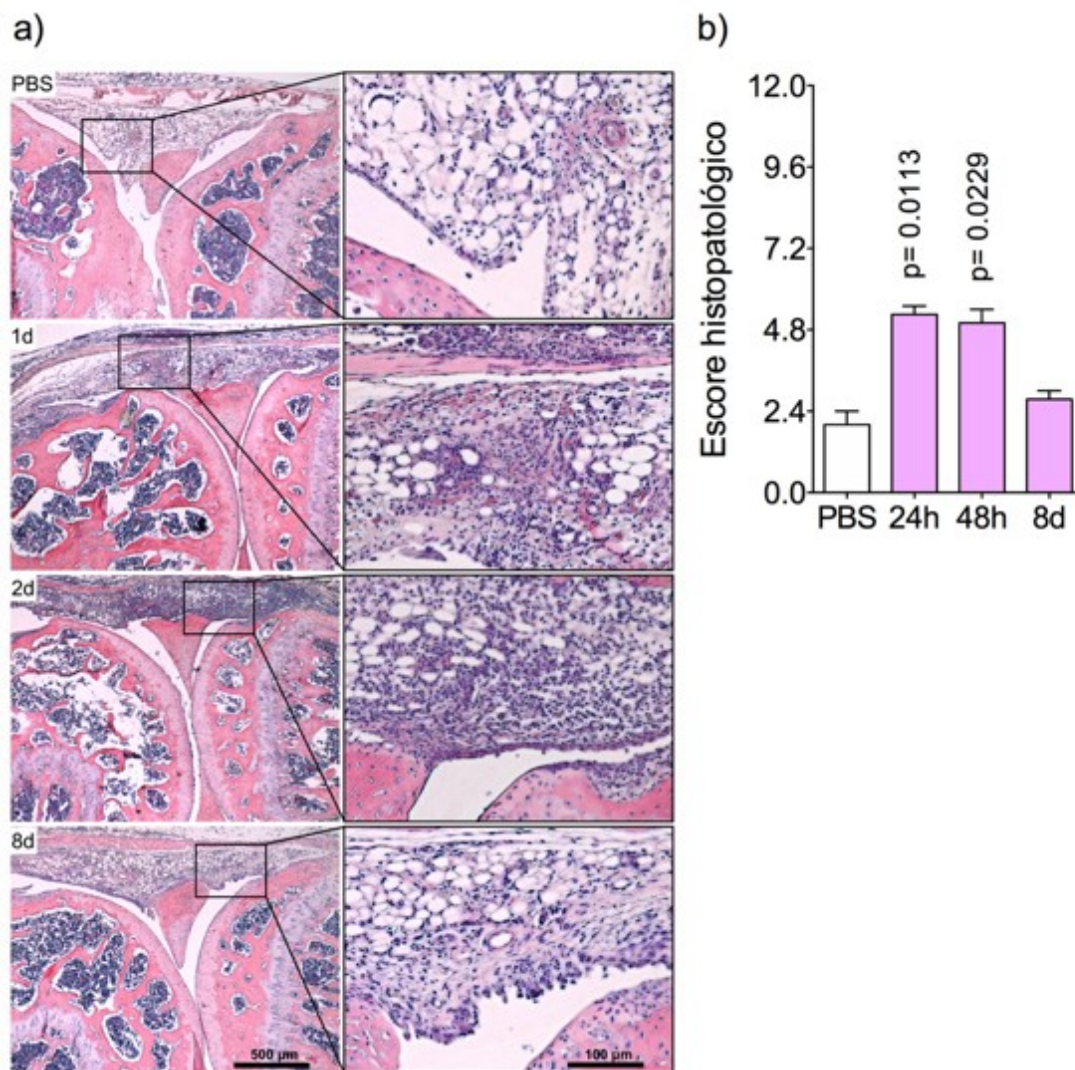


Figura 7 Avaliação histopatológica da articulação do joelho no modelo de AIA. Para a indução da AIA, os animais previamente imunizados (injeção s.c. contendo 500μg mBSA dissolvidos em 50μl de PBS e emulsionados com 50μl CFA) foram desafiados com uma injeção i.a. contendo 10μg de mBSA dissolvidos em 10μl de PBS. Os animais controles, que não desenvolveram a AIA, foram desafiados com uma injeção i.a. contendo somente 10μl de PBS. Prancha histológica representativa da articulação do joelho (corte sagital) corada com H&E (a) e respectiva quantificação do escore histopatológico (b) (n= 4-5). Os resultados foram expressos como média ± SEM; p = ao valor especificado no gráfico quando comparado ao grupo controle PBS.

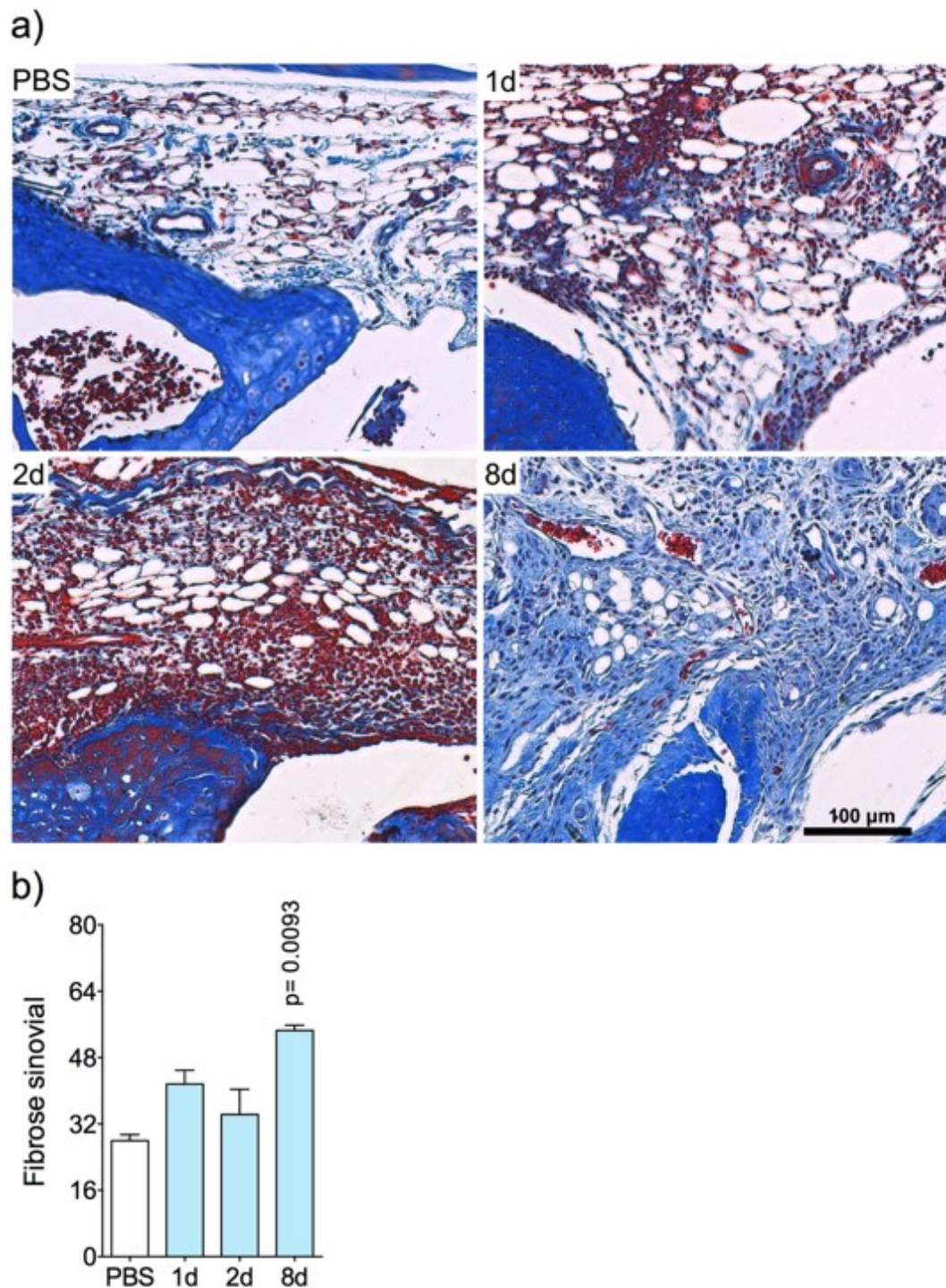


Figura 8. Avaliação histopatológica e recuperação da articulação do joelho no modelo de AIA. Para a indução da AIA, os animais previamente imunizados (injeção s.c. contendo 500µg mBSA dissolvidos em 50µl de PBS e emulsionados com 50µl CFA) foram desafiados com uma injeção i.a. contendo 10µg de mBSA dissolvidos em 10µl de PBS. Os animais controles, que não desenvolveram a AIA, foram desafiados com uma injeção i.a. contendo somente 10µl de PBS. Prancha histológica representativa da articulação do joelho (corte sagital) corada com Tricômico de Masson (a) e respectiva quantificação da fibrose sinovial (b) (n= 4-5). Os resultados foram expressos como média ± SEM; p = ao valor especificado no gráfico quando comparado ao grupo controle PBS.

Após o desafio, detectamos elevadas concentrações de IL-1 β e IL-6 no tecido articular de animais artríticos nos tempos de 12 horas e 1 dia após AIA (figura 9a e b). O retorno da concentração dessas duas citocinas para valores basais ocorreu no tempo de 2 dias após o desafio com mBSA. Não observamos aumento nos níveis de IL-17 ou IL-22. Ao contrário, 8 dias após a indução da AIA as concentrações de IL-17 no tecido articular de animais artríticos foi menor que a observada nos animais controles (figura 9c). Os níveis de IL-22 foram menores que a do grupo controle em todos os tempos avaliados a partir do segundo dia após a indução da AIA (figura 9d).

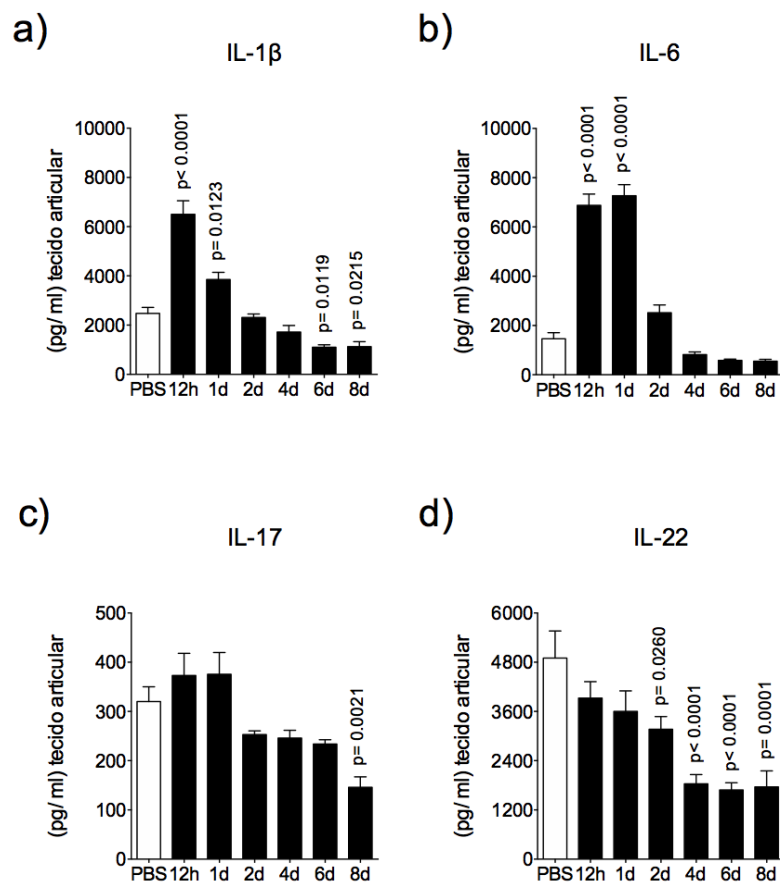


Figura 9. Cinética da concentração de citocinas presentes no tecido articular após indução da AIA. Para a indução da AIA, os animais previamente imunizados (injeção s.c. contendo 500 μ g mBSA dissolvidos em 50 μ l de PBS e emulsionados com 50 μ l CFA) foram desafiados com uma injeção i.a. contendo 10 μ g de mBSA dissolvidos em 10 μ l de PBS. Os animais controles, que não desenvolveram a AIA, foram desafiados com uma injeção i.a. contendo somente 10 μ l de PBS. A concentração de IL-1 β (a), IL-6 (b), IL-17 (c) e IL-22 (d) presentes no homogenato do tecido articular foi mensurada pelo método de ELISA (n= 5). O tecido articular dos animais foram coletados em diferentes tempos após o desafio. Os resultados foram expressos como média \pm SEM; p = ao valor especificado no gráfico quando comparado ao grupo controle PBS.

Em seguida, nós avaliamos a cinética da resposta nociceptiva no modelo de AIA (figura 10). Já no 1º dia após o desafio, nós registramos um aumento da sensibilidade articular no grupo de animais artríticos. Essa hiperalgesia mecânica, que foi precipitada pela movimentação passiva na articulação dos animais doentes durante o teste de von Frey, persistiu por um período de 6 dias após a resposta inflamatória na cavidade articular ter sido completamente resolvida.

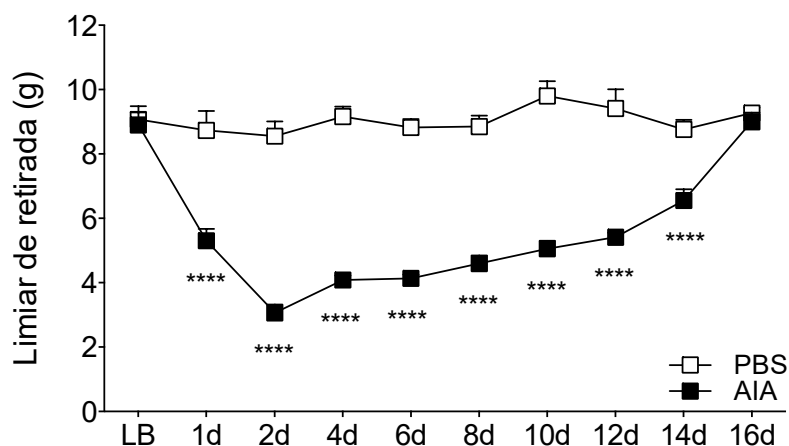
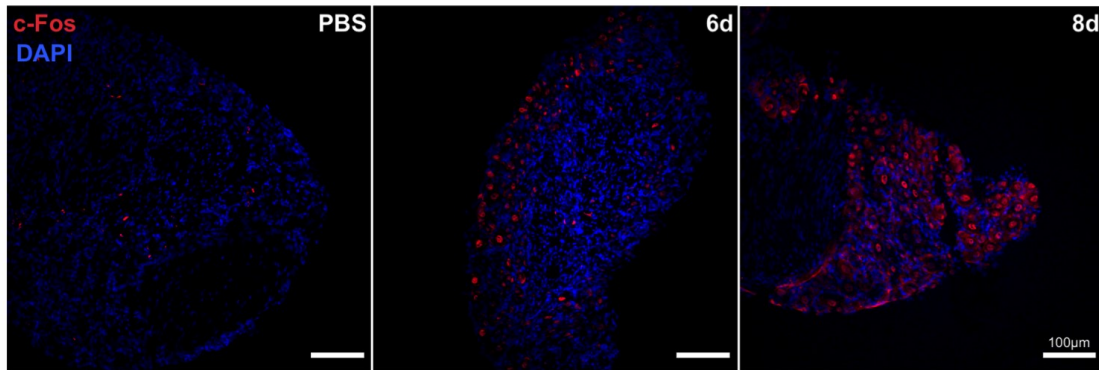


Figura 10. Cinética da resposta nociceptiva na AIA. Para a indução da AIA, os animais previamente imunizados (injeção s.c. contendo 500µg mBSA dissolvidos em 50µl de PBS e emulsionados com 50µl CFA) foram desafiados com uma injeção i.a. contendo 10µg de mBSA dissolvidos em 10 µl de PBS (■). Os animais controles, que não desenvolveram a AIA, foram desafiados com uma injeção i.a. contendo somente 10µl de PBS (□). A resposta nociceptiva dos animais foi aferida pelo método de von Frey (n= 6). O registro do limiar de retirada foi realizado em diferentes tempos após o desafio. O registro do limiar de retirada basal (LB) foi realizado 24 horas antes do desafio. Os resultados foram expressos como média ± SEM; **** p< 0,0001 quando comparado ao grupo controle PBS.

Uma imunofluorescência realizada 8 dias após o desafio revelou um aumento na expressão de c-Fos no DRG de animais artríticos (figura 11). Esse resultado indica que houve um intensificação da atividade nociceptiva no DRG, confirmando os registros obtidos pelo experimento comportamental. Portanto, nossos dados certificam que a hiperalgesia mecânica no modelo de AIA foi persistente mesmo após a resolução da resposta inflamatória.

a)



b)

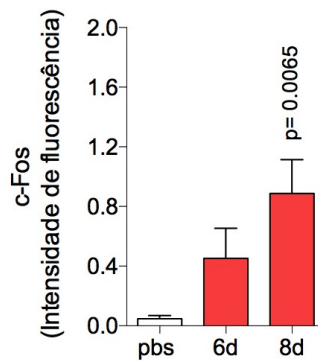


Figura 11. Aumento na expressão de c-fos no DRG após a resolução da resposta inflamatória no joelho. Para a indução da AIA, os animais previamente imunizados (injeção s.c. contendo 500µg mBSA dissolvidos em 50µl de PBS e emulsionados com 50µl CFA) foram desafiados com uma injeção i.a. contendo 10µg de mBSA dissolvidos em 10µl de PBS. Os animais controles, que não desenvolveram a AIA, foram desafiados com uma injeção i.a. contendo somente 10µl de PBS Imagem representativa de uma microscopia confocal mostrando células marcadas com anticorpo anti-c-Fos (vermelho) no DRG após a resolução da resposta inflamatória no joelho (a). Quantificação da intensidade de fluorescência no DRG para c-Fos (b) (n= 5-6). Os resultados foram expressos como média ± SEM; p = ao valor especificado no gráfico quando comparado ao grupo controle PBS.

Em resumo, a manutenção da hiperalgesia após a resolução da inflamação na AIA não ocorre pela ação de qualquer agente inflamatório sobre os terminais periféricos de nociceptores presentes na articulação afetada. Nossos resultados sugerem, portanto, que a hiperalgesia persistente na AIA é dependente de mecanismos subjacentes à ação de mediadores inflamatórios na articulação.

1.24. Resposta inflamatória e nociceptiva após o tratamento com dexametasona ou AS605240

Para verificarmos se a antecipação da resposta resolutive por agentes exógenos é capaz de reverter a hiperalgesia persistente na AIA, nós tratamos os animais com dexametasona ou AS605240 (inibidor seletivo para PI3K γ), dois agentes que apresentam propriedade anti-inflamatória, e que podem contribuir para a indução da resolução^{119,120}. O tratamento com essas drogas e o lavado articular foram realizados 12 e 24 horas após a indução da AIA, respectivamente. Esses tempos corresponderam ao maior aumento do infiltrado inflamatório observado em nosso modelo (figura 1c)

O tratamento com dexametazona provocou uma queda na quantidade total de células presentes no joelho desafiado com mBSA (figura 12a). Essa diminuição se deu pela redução do número de neutrófilos (figura 12b) e de células mononucleares (figura 12c) na cavidade articular dos animais artríticos. Além disso, a melhora na inflamação foi acompanhada de uma diminuição da hiperalgesia entre 2 e 6 dias após a indução da AIA. Porém, esse efeito foi transitório. Já no 8º dia, o valor absoluto do limiar de retirada retornou para valores semelhantes aos valores apresentados pelos animais artríticos não tratados (figura 12d e e).

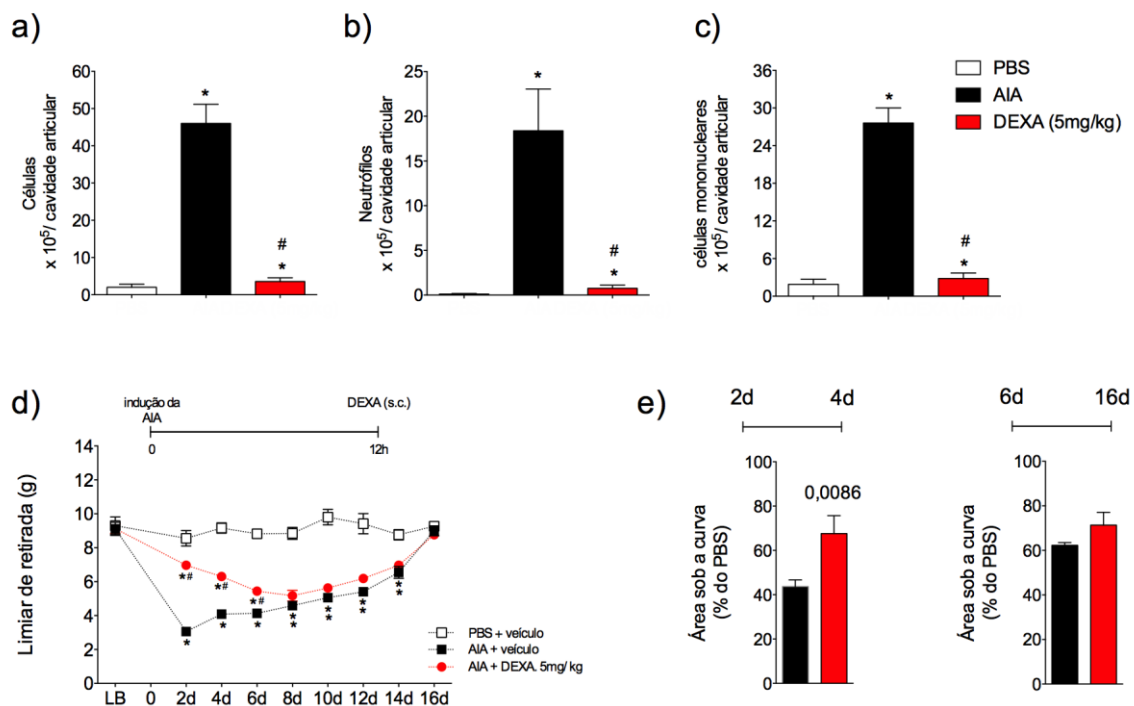


Figura 12. Avaliação do infiltrado celular e da resposta nociceptiva após o tratamento com dexametasona.

Para a indução da AIA, os animais previamente imunizados (injeção s.c. contendo 500µg mBSA dissolvidos em 50µl de PBS e emulsionados com 50µl CFA) foram desafiados com uma injeção i.a. contendo 10µg de mBSA dissolvidos em 10µl de PBS. Os animais controles, que não desenvolveram a AIA, foram desafiados com uma injeção i.a. contendo somente 10µl de PBS. Doze horas após a indução da AIA, os animais receberam uma injeção subcutânea (s.c.) contendo uma dose de 5mg/kg de dexametasona (DEXA). O número de leucócitos que migraram para a articulação do joelho foi mensurado 12 horas após o tratamento (**a**, **b** e **c**) (n= 5). Para quantificação do infiltrado celular a cavidade articular foi lavada e as células totais recuperadas foram contadas na câmara de Neubauer e diferenciadas em neutrófilos ou células mononucleares por microscopia de luz. Os resultados foram expressos como média ± SEM; * p < 0,05 quando comparado ao grupo controle PBS. Para a avaliação do limiar de retirada, a resposta nociceptiva dos animais foi aferida pelo método de von Frey (**d**) (gráfico representativo de 3 experimentos independentes com n= 6). O registro do limiar de retirada foi realizado em diferentes tempos após o tratamento. O registro do limiar de retirada basal (LB) foi realizado 24 horas antes do desafio. Quantificação da área sob a curva entre os tempos de 2 e 4 dias após o desafio (24 horas e 72 horas depois do tratamento com DEXA respectivamente) e entre 6 e 16 dias após o desafio (5 dias e 15 dias depois do tratamento com DEXA, respectivamente) (**e**) (n= 3). Os resultados foram expressos como média ± SEM; * p < 0,05 quando comparado ao grupo controle (PBS + veículo). # p < 0,05 quando comparado ao grupo artrítico não tratado (AIA + veículo).

A inibição da PI3Kγ também induziu uma diminuição da inflamação no joelho dos animais doentes. Houve uma queda da quantidade total de leucócitos na cavidade articular dos camundongos artríticos (figura 13a), que pôde ser atribuída à redução do número de neutrófilos (figura 13b). Entretanto, o tratamento com AS605240 preservou a quantidade de células mononucleares presentes na articulação desafiada com mBSA (figura 13c). A diminuição da inflamação neutrofilica, porém, não foi suficiente para induzir uma perda da resposta hiperalgésica observada durante a AIA (figura 13d).

De forma geral, nossos resultados mostram que a manutenção da hiperalgésia articular ocorre de forma independente da resolução da resposta inflamatória induzida pelas drogas utilizadas neste trabalho.

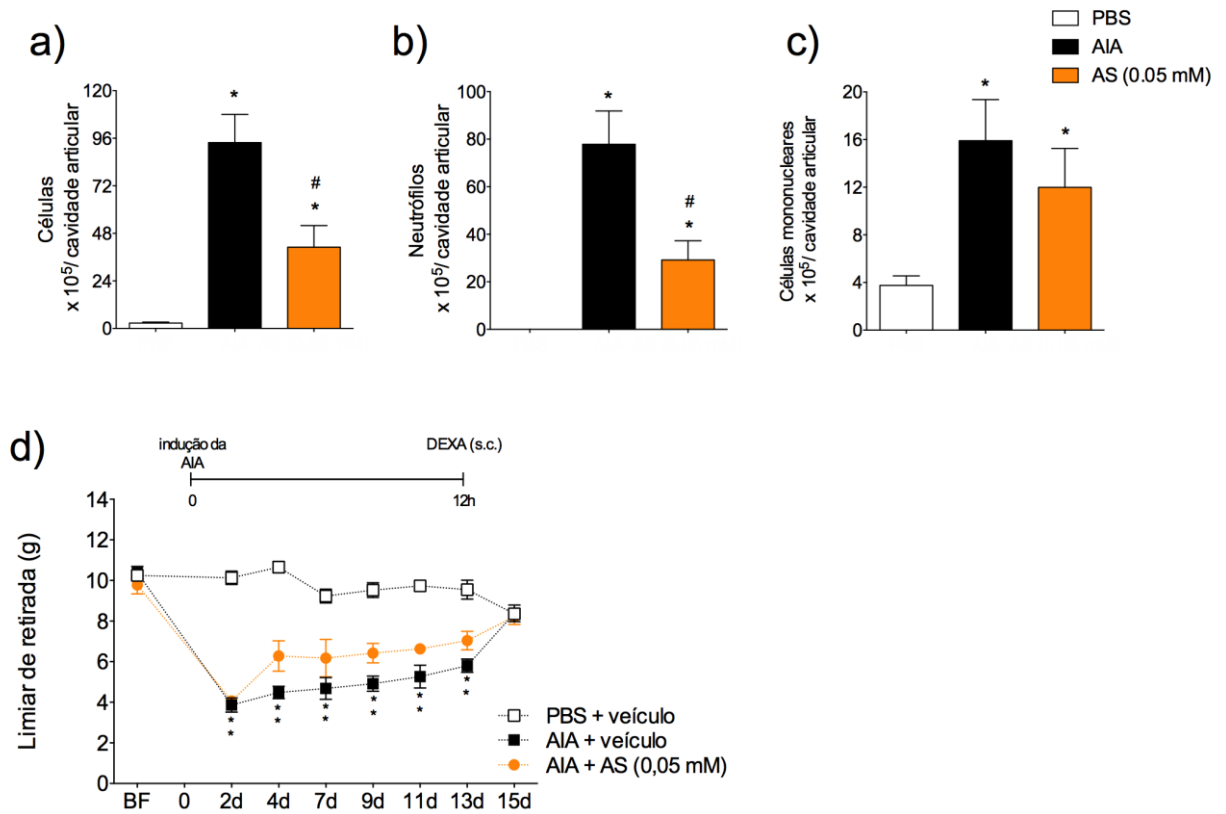
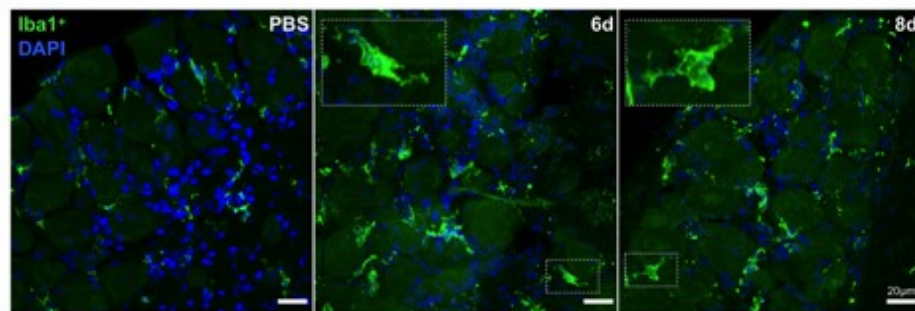


Figura 13. Avaliação do infiltrado celular e da resposta nociceptiva após o tratamento com AS605240. Para a indução da AIA, os animais previamente imunizados (injeção s.c. contendo 500µg mBSA dissolvidos em 50µl de PBS e emulsionados com 50µl CFA) foram desafiados com uma injeção i.a. contendo 10µg de mBSA dissolvidos em 10µl de PBS. Os animais controles, que não desenvolveram a AIA, foram desafiados com uma injeção i.a. contendo somente 10µl de PBS. Doze horas após a indução da AIA, os animais receberam uma injeção intra-articular (i.a.) contendo uma dose de 0.05Mm de AS605240. O número de leucócitos que migraram para a articulação do joelho foi mensurado 12 horas após o tratamento (**a**, **b** e **c**) (n= 9-10). Para quantificação do infiltrado celular a cavidade articular foi lavada e as células totais recuperadas foram contadas na câmara de Neubauer e diferenciadas em neutrófilos ou células mononucleares por microscopia de luz. Os resultados foram expressos como média ± SEM; * p < 0,05 quando comparado ao grupo controle PBS. Para a avaliação do limiar de retirada, a resposta nociceptiva dos animais foi aferida pelo método de von Frey (**d**) (n= 5). O registro do limiar de retirada basal (LB) foi realizado 24 horas antes do desafio. Os resultados foram expressos como média ± SEM; * p < 0,05 quando comparado ao grupo controle (PBS + veículo). # p < 0,05 quando comparado ao grupo artrítico não tratado (AIA + veículo).

1.25. O gânglio da raiz dorsal (DRG) apresenta um status inflamatório transitente após a resolução da resposta inflamatória no sítio periférico

Diversas condições dolorosas podem se desenvolver em função da ação de mediadores inflamatórios em estruturas do sistema nociceptivo¹²¹. Portanto, uma vez que a persistência da sensibilidade articular na AIA não poderia ser explicada pela ação de agentes inflamatórios no joelho, nós avaliamos se o microambiente do DRG estava comprometido por uma neuroinflamação. Nos tempos de 6 e 8 dias após a indução da AIA, nossos experimentos revelaram um aumento no número de células Iba1⁺, (figura 14a e b) no DRG.

a)



b)

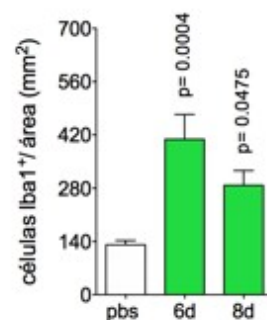


Figura 14. Aumento no número de células positivas para Iba 1 no DRG após a resolução da resposta inflamatória no joelho. Para a indução da AIA, os animais previamente imunizados (injeção s.c. contendo 500µg mBSA dissolvidos em 50µl de PBS e emulsionados com 50µl CFA) foram desafiados com uma injeção i.a. contendo 10µg de mBSA dissolvidos em 10µl de PBS. Os animais controles, que não desenvolveram a AIA, foram desafiados com uma injeção i.a. contendo somente 10µl de PBS. Imagem representativa de uma microscopia confocal mostrando células marcadas com anticorpo Iba1 (verde) dentro do DRG após a resolução da resposta inflamatória no joelho (a). Quantificação das células Iba1⁺ (b) (n= 5). Os resultados foram expressos como média ± SEM; p = ao valor especificado no gráfico quando comparado ao grupo controle PBS.

Concomitante ao aumento de células Iba1⁺, houve um aumento na expressão gênica de IL-6 (figura 15b), CXCL1 (figura 15c), COX2 (figura 15d), iNOS (figura 15e) e IL-10 (figura 15f) no DRG. O aumento na expressão gênica de IL-1 β foi observado somente 8 dias após a indução da AIA (figura 15a). Esses resultados demonstram que a resolução da resposta inflamatória na AIA é inicialmente restrita ao sítio periférico, ou seja, na articulação comprometida, preservando um status inflamatório tardio no DRG.

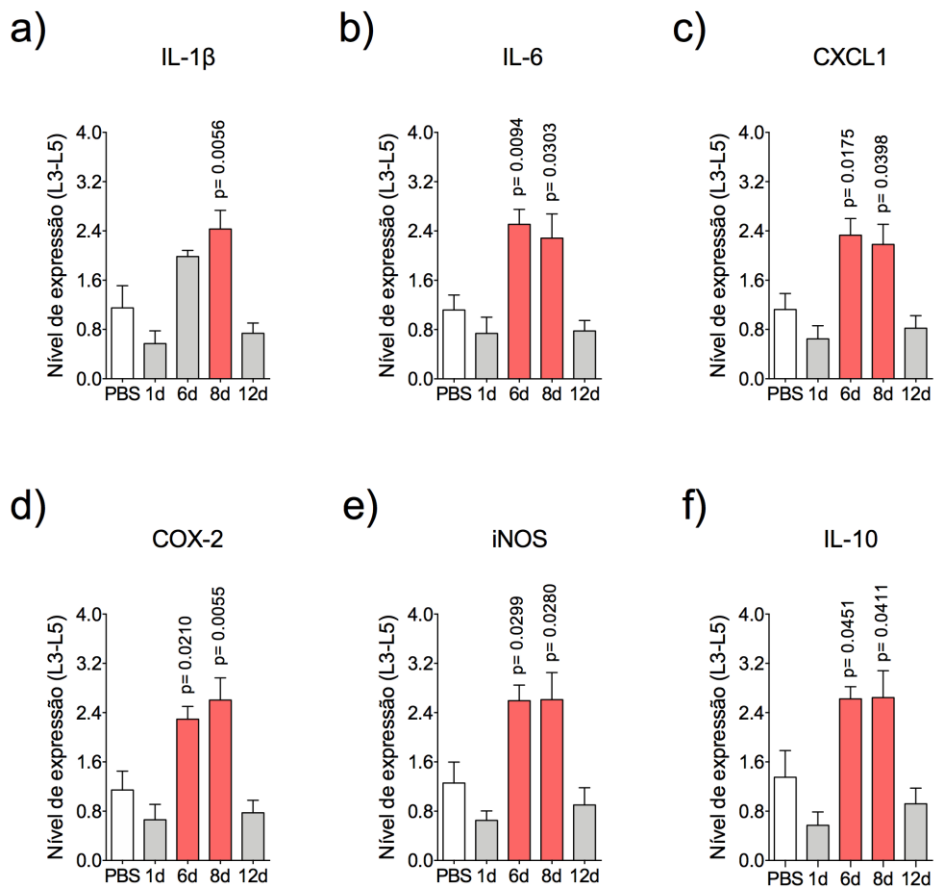


Figura 15. Aumento na expressão de moléculas inflamatórias no DRG após a resolução da resposta inflamatória periférica na AIA. Para a indução da AIA, os animais previamente imunizados (injeção s.c. contendo 500 μ g mBSA dissolvidos em 50 μ l de PBS e emulsionados com 50 μ l CFA) foram desafiados com uma injeção i.a. contendo 10 μ g de mBSA dissolvidos em 10 μ l de PBS. Os animais controles, que não desenvolveram a AIA, foram desafiados com uma injeção i.a. contendo somente 10 μ l de PBS. O nível de expressão do mRNA de IL-1 β (a), IL-6 (b), CXCL1 (c) COX-2 (d), iNOS (e), IL-10 (f) foram mensurados no gânglio da raiz dorsal (DRG) pelo método de PCR quantitativo em tempo real (n= 5). As amostras foram constituídas pelo pool de DRG's (L3, L4 e L5/ animal) coletados em diferentes tempos após o desafio. Os resultados foram expressos como média \pm SEM; p = ao valor especificado no gráfico quando comparado ao grupo controle PBS.

Sumarizando, após a resolução da resposta inflamatória na cavidade do joelho de animais artríticos, o DRG desenvolveu temporariamente um ambiente inflamatório. Essa condição pode ter fornecido ao aparato sensorial moléculas com potencial de sensibilizar o sistema nociceptivo e manter a hiperalgesia articular após a remissão da AIA.

1.26. A hiperalgesia mecânica residual no modelo de AIA está associada ao aumento na expressão de TNF e de seu receptor TNFR2 no DRG.

A cinética da expressão do mRNA de TNF e de seus receptores do tipo 1 e 2 (TNFR1 e TNFR2 respectivamente) foi avaliada no *pool* de gânglios sensoriais (L3- L5) que inervam a articulação do joelho (figura 16a) pela técnica de PCR quantitativo em tempo real. Nós observamos que, além de um aumento na expressão de TNF no 6° e 8° dias após o desafio com mBSA (figura 16b), houve um aumento na expressão gênica de TNFR2 (fig. 8d), e uma concomitante redução na expressão do mRNA de TNFR1 (figura 17a). Nos tempos avaliados em nosso trabalho, também não encontramos aumento na expressão do canal TRPV1 do DRG (figura 17b), que é hiperexpresso em neurônios expostos ao TNF de forma dependente de TNFR1¹²².

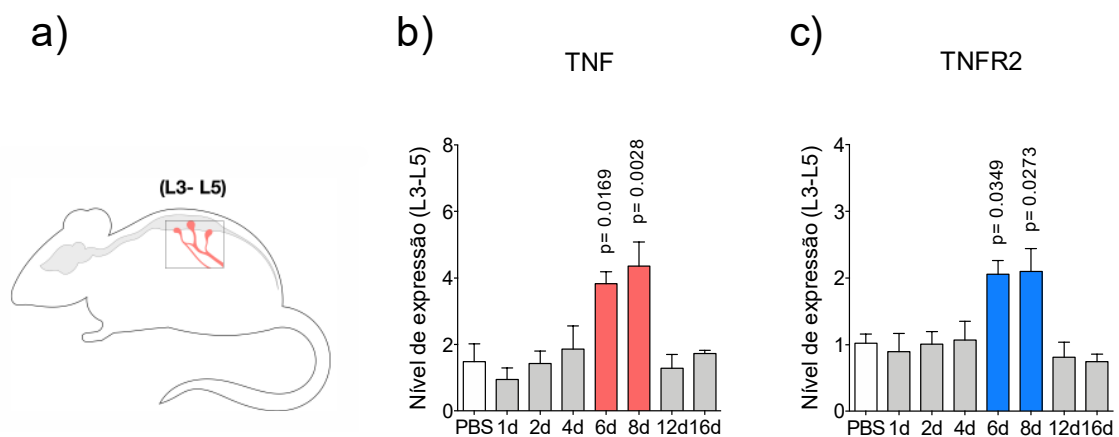


Figura 16. Aumento na expressão gênica de TNF e de seu receptor TNFR2 no DRG após a resolução da resposta inflamatória periférica na AIA. Para a indução da AIA, os animais previamente imunizados (injeção

s.c. contendo 500µg mBSA dissolvidos em 50µl de PBS e emulsionados com 50µl CFA) foram desafiados com uma injeção i.a. contendo 10µg de mBSA dissolvidos em 10µl de PBS. Os animais controles, que não desenvolveram a AIA, foram desafiados com uma injeção i.a. contendo somente 10 µl de PBS. Os DRG's foram coletados em diferentes tempos após o desafio. Cada amostra foi constituída do pool de DRG contendo L3, L4 e L5 de um único animal (a). O nível de expressão do mRNA de TNF (b) e TNFR2 (c) foram mensurados pelo método de PCR quantitativo em tempo real (n= 5). Os resultados foram expressos como média ± SEM; p = ao valor especificado no gráfico quando comparado ao grupo controle PBS.

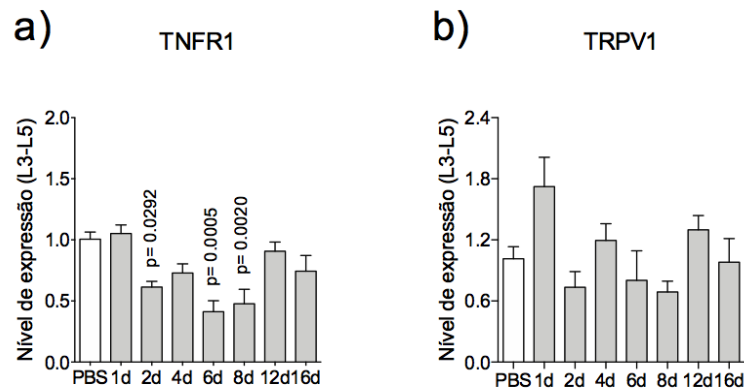


Figura 17. A expressão gênica de TNFR1 e TRPV1 no DRG não se altera no modelo de AIA. Para a indução da AIA, os animais previamente imunizados (injeção s.c. contendo 500µg mBSA dissolvidos em 50µl de PBS e emulsionados com 50µl CFA) foram desafiados com uma injeção i.a. contendo 10µg de mBSA dissolvidos em 10µl de PBS. Os animais controles, que não desenvolveram a AIA, foram desafiados com uma injeção i.a. contendo somente 10µl de PBS. Os DRG's foram coletados em diferentes tempos após o desafio. Cada amostra foi constituída do pool de DRG contendo L3, L4 e L5 de um único animal. O nível de expressão do mRNA de TNFR1 (a) e TRPV1 (b) foram mensurados pelo método de PCR quantitativo em tempo real (n= 5). Os resultados foram expressos como média ± SEM; p = ao valor especificado no gráfico quando comparado ao grupo controle PBS.

Utilizando a técnica de western blot, nós observamos que 8 dia após o desafio com mBSA a expressão de TNF permaneceu basal nos gânglios sensoriais localizados abaixo da terceira e quinta vertebra lombares (L3 e L5 respectivamente) (figura 18a). Porém, um aumento na expressão dessa citocina foi identificado no DRG abaixo da quarta vertebra lombar (L4) (figura 18a, b e c).

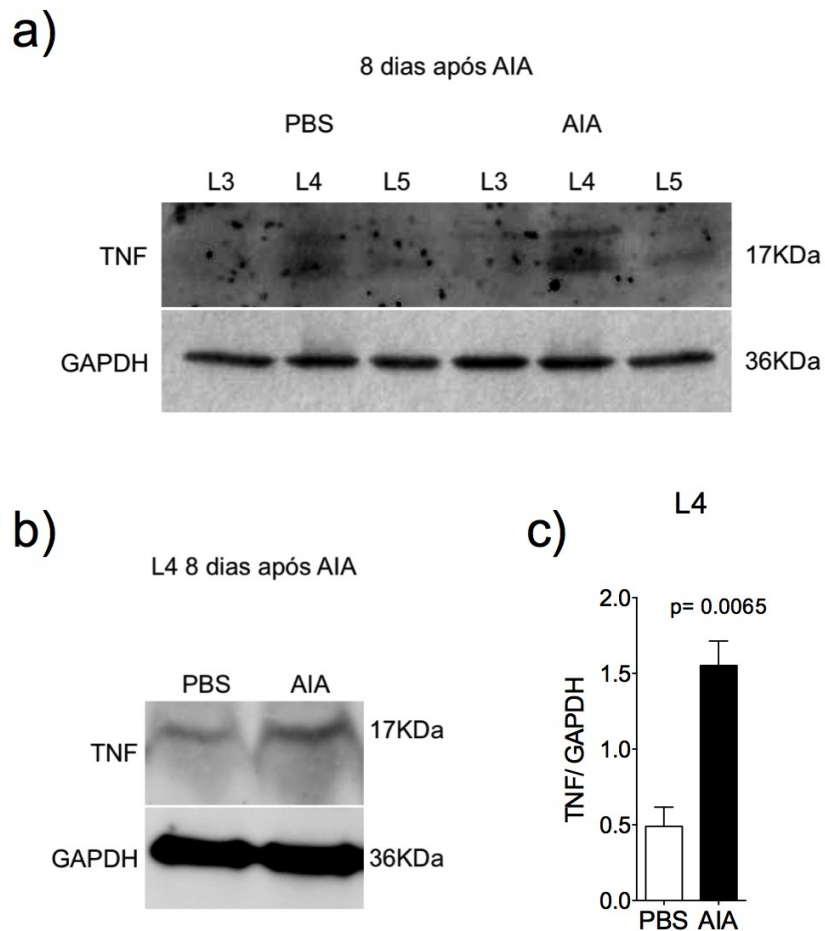


Figura 18. Expressão de TNF no DRG após a resolução da resposta inflamatória na articulação acometida pela AIA. Para a indução da AIA, os animais previamente imunizados (injeção s.c. contendo 500µg mBSA dissolvidos em 50µl de PBS e emulsionados com 50µl CFA) foram desafiados com uma injeção i.a. contendo 10µg de mBSA dissolvidos em 10µl de PBS. Os animais controles, que não desenvolveram a AIA, foram desafiados com uma injeção i.a. contendo somente 10µl de PBS. Cada amostra foi constituída pelo pool de 3 DRG's, que foram coletados de animais diferentes, 8 dias após o desafio. A expressão de TNF em L3, L4 ou L5 (a), ou somente em L4 (b), foi avaliada pelo método de Western Blot. A quantificação da expressão de TNF foi realizada somente para L4 (c) (n= 3). Os resultados foram expressos como média ± SEM; p = ao valor especificado no gráfico quando comparado ao grupo controle PBS.

Para confirmar se o TNF presente no DRG apresentava influência sobre a hiperalgesia articular verificada após a resolução da resposta inflamatória no joelho, sua ação foi neutralizada pela injeção intratecal de etanercept (forma solúvel e dimérica do receptor para TNF do tipo 2 TNFR2). O tratamento com etanercept nas doses de 5 µg e de 50µg no 7º dia após o desafio com mBSA reverteu permanentemente a hiperalgesia articular (figura 19).

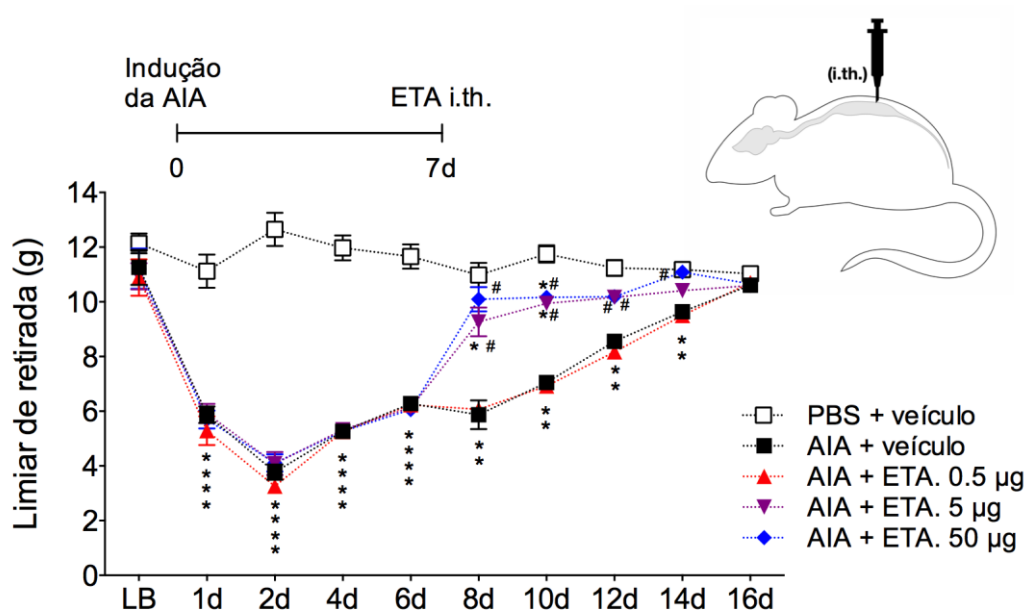


Figura 19. Reversão da hipernociceção persistente após neutralização do TNF. Para a indução da AIA, os animais previamente imunizados (injeção s.c. contendo 500µg mBSA dissolvidos em 50µl de PBS e emulsionados com 50µl CFA) foram desafiados com uma injeção i.a. contendo 10µg de mBSA dissolvidos em 10µl de PBS (■). Os animais controles, que não desenvolveram a AIA, foram desafiados com uma injeção i.a. contendo somente 10µl de PBS (□). Os grupos tratados receberam uma injeção intratecal (i.t.) contendo 0,5µg (▲), 5µg (▼) ou 50µg (◆) de etanercept (Eta.), 7 dias após o desafio. A resposta nociceptiva dos animais foi aferida pelo método de von Frey (n=7). O registro do limiar de retirada foi realizado em diferentes tempos após o desafio. O registro do limiar de retirada basal (LB) foi realizado 24 horas antes do desafio. Os resultados foram expressos como média ± SEM; * p< 0,05 quando comparado ao grupo controle (PBS + veículo). # p< 0,05 quando comparado ao grupo artroítico não tratado (AIA + veículo).

1.27. A hiperalgesia mecânica residual no modelo de AIA está associada à ação de TNF no DRG, mas não no corno dorsal da medula espinal (CDME).

No intuito de confirmar se o desenvolvimento da hiperalgesia articular persistente foi dependente da influência de TNF especificamente no DGR, nós avaliamos a expressão dessa citocina na medula espinal dos animais desafiados com mBSA ou PBS. Após 8 dias da indução da AIA, a intumescência lombar da medula espinal foi coletada e seccionada no plano sagital em partes contra- lateral (CL) e ipsi-lateral (IL) (figura 20a) em relação ao joelho que foi desafiado. Essas partes foram processadas e analisadas pela técnica de PCR quantitativo em

tempo real. A porção IL da medula espinal dos animais artríticos não apresentou alterações significativas na expressão do mRNA de TNF em relação à porção IL dos animais controle não artríticos (figura 20b). Diferenças entre as porções IL e CL no grupo AIA também não foram detectadas (colunas pretas da figura 20b).

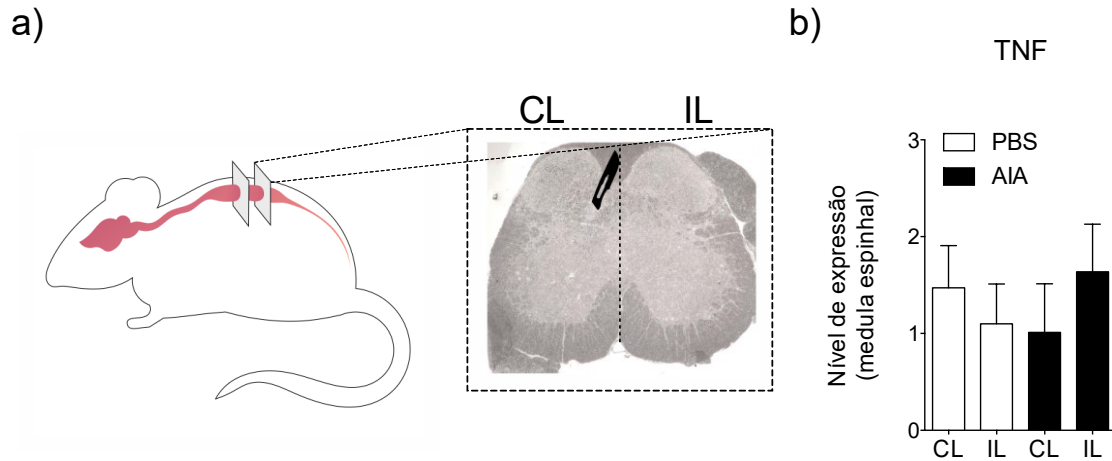


Figura 20. Expressão de TNF na medula espinal após a resolução da resposta inflamatória na articulação acometida pela AIA. Para a indução da AIA, os animais previamente imunizados (injeção s.c. contendo 500µg mBSA dissolvidos em 50µl de PBS e emulsionados com 50µl CFA) foram desafiados com uma injeção i.a. contendo 10µg de mBSA dissolvidos em 10µl de PBS. Os animais controles, que não desenvolveram a AIA, foram desafiados com uma injeção i.a. contendo somente 10µl de PBS. As amostras de medula espinal foram coletadas 8 dias após desafio, especificamente na altura da intumescência lombar (a, lado esquerdo), e segmentadas em contra-lateral (CL) e ipsi-lateral (IL) (a, lado direito) em relação ao joelho desafiado. O nível de expressão do mRNA de TNF foi mensurado pelo método de PCR quantitativo em tempo real (b) (n= 5). Os resultados foram expressos como média ± SEM; p = ao valor especificado no gráfico quando comparado ao grupo controle PBS.

Considerando que a expressão gênica de TNF poderia ter sido mascarada pelo excesso de tecido coletado nas amostras de medula, nós avaliamos somente o CDME (figura 21a), região onde os impulsos nociceptivos provenientes da periferia são processados⁷⁵. Assim como na amostra contendo a porção IL da intumescência lombar, não detectamos alterações significativas na expressão do mRNA de TNF no CDME dos animais artríticos em nenhum dos tempos verificados (figura 21d). A expressão do mRNA de TNFR1 (figura 12e) ou de TNFR2 (figura 21f) no CDME dos animais submetidos à AIA também não sofreu alteração. Esses resultados indicam que, no modelo adotado no presente estudo, a reversão da hiperalgesia articular residual induzida pela administração i.t. de etanercept (figura 19) se deu pela neutralização da ação de TNF no DRG, e não no CDME. Além disso, nós não detectamos no CDME mudanças na expressão gênica de Iba-1 e GFAP, que são marcadores de ativação de

células gliais¹²³ (figura 21b e c). Portanto, a hiperalgesia persistente observada na AIA ocorre em função do aumento da expressão de TNF e de TNFR2 no DRG 6 e 8 dias após o desafio, em um período posterior à resolução natural da resposta inflamatória no joelho.

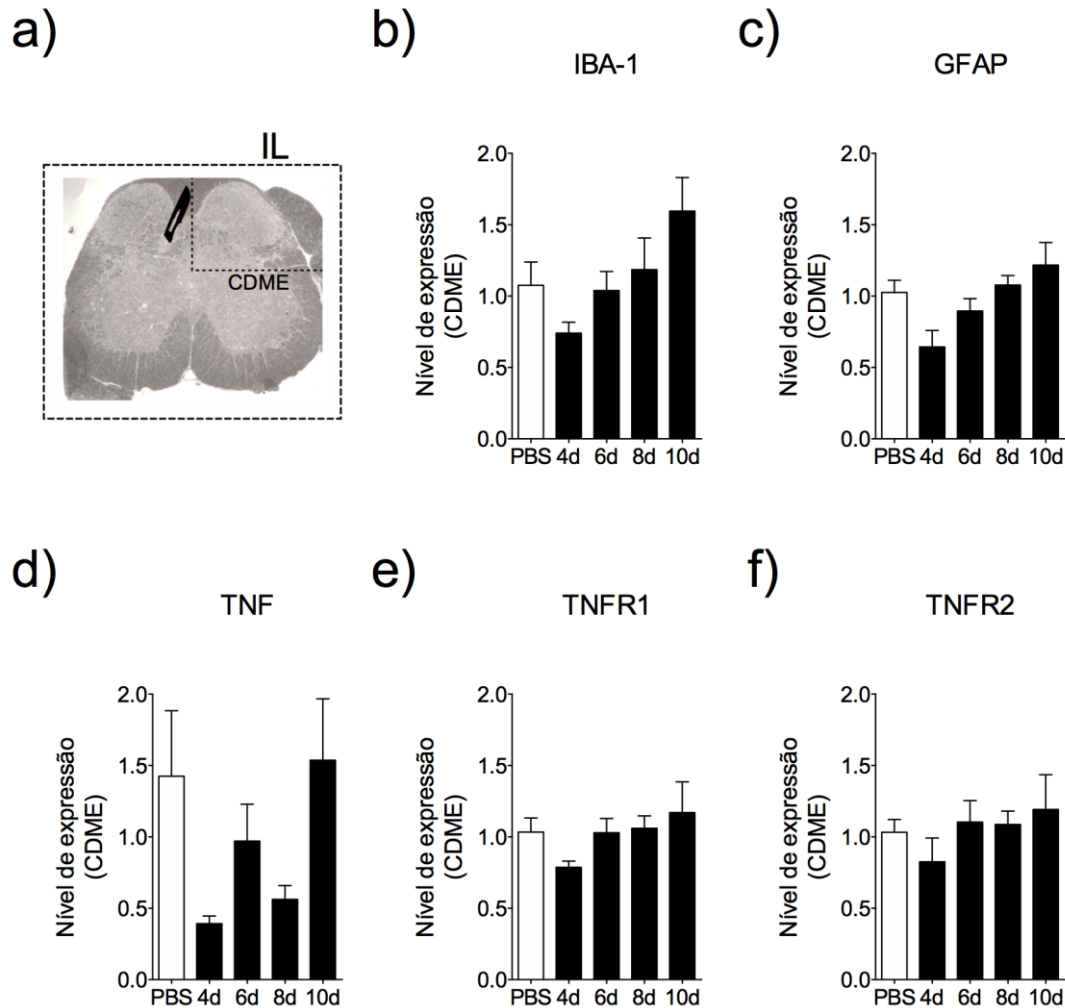


Figura 21. Expressão de Iba1, GFAP, TNF, TNFR1 e TNFR2 no corno dorsal da medula espinhal após a resolução da resposta inflamatória na articulação acometida pela AIA. Para a indução da AIA, os animais previamente imunizados (injeção s.c. contendo 500µg mBSA dissolvidos em 50µl de PBS e emulsionados com 50µl CFA) foram desafiados com uma injeção i.a. contendo 10µg de mBSA dissolvidos em 10µl de PBS. Os animais controles, que não desenvolveram a AIA, foram desafiados com uma injeção i.a. contendo somente 10µl de PBS. As amostras do corno dorsal da medula espinhal (ipisi-lateral (IL) em relação ao joelho desafiado) (a) foram coletadas 8 dias após desafio, especificamente na altura da intumescência lombar. O nível de expressão do mRNA de Iba 1 (b), GFAP (c), TNF (d), TNFR1 (e) e TNFR2 (f) foram mensurados pelo método de PCR quantitativo em tempo real (n= 8). Os resultados foram expressos como média ± SEM; p = ao valor especificado no gráfico quando comparado ao grupo controle PBS.

Apesar de não ter ocorrido qualquer alteração no nível de expressão gênica de TNF, Iba1 ou de GFAP no CDME, nós observamos que houve um modesto aumento na adesão de leucócitos nos vasos da região posterior da intumescência lombar (figura 22). Esse fenômeno parece ter sido um efeito do desenvolvimento de um status inflamatório no DRG (figura 15). Vale ressaltar que a vasculatura analisada pela microscopia intravital se localizava próxima do local onde a raiz dorsal de cada DRG lombar penetravam a medula espinal.

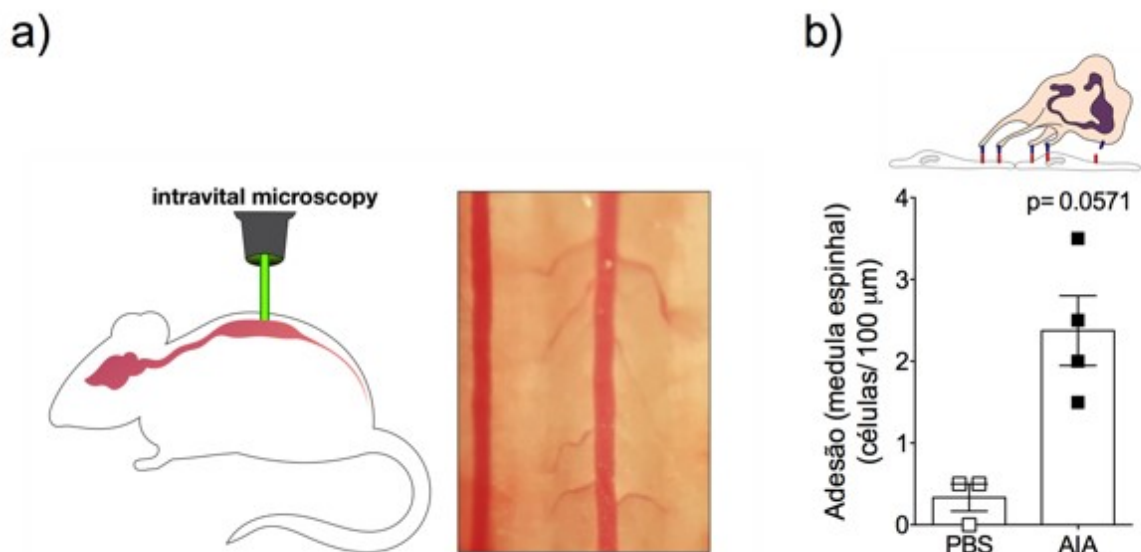


Figura 22. Aumento na adesão de leucócitos na microvasculatura da medula espinal. Para a indução da AIA, os animais previamente imunizados (injeção s.c. contendo 500μg mBSA dissolvidos em 50μl de PBS e emulsionados com 50μl CFA) foram desafiados com uma injeção i.a. contendo 10μg de mBSA dissolvidos em 10μl de PBS. Oito dias após o desafio, a avaliação por microscopia intravital (a, lado esquerdo) foi realizada nos vasos presentes na região posterior da intumescência lombar (a, lado direito) para avaliação da adesão de leucócitos (b) (n= 4). Cada animal recebeu uma injeção intravenosa contendo Rhodamina 6G-Sigma (0.5 mg/ kg) imediatamente após a cirurgia para exposição da medula. Os resultados foram expressos como média ± SEM; p = ao valor especificado no gráfico quando comparado ao grupo controle PBS

1.28. A administração sistêmica de etanercept alcança o DRG e reverte a hiperalgesia articular após a resolução da inflamação.

O DRG pode ser um potencial alvo farmacológico para drogas que são sistemicamente injetadas^{124,125}. Essa estratégia de administração pode ser facilmente executada¹²⁴ e apresenta

baixo risco para o indivíduo que dela depende. Aqui, nós demonstramos que a administração sistêmica de uma única dose subcutânea de etanercept (10mg/ Kg) 7 dias após a indução da AIA diminuiu, gradualmente, a hiperalgesia articular verificada após a fase resolutive. Essa melhora pode ser observada já com 1 e 3 dias depois da neutralização do TNF (dias 8 e 10 após indução da AIA). O retorno do limiar de retirada dos camundongos tratados para valores basais ocorre permanentemente a partir do 5º após o tratamento (12 dias após indução da AIA) (figura 23a).

Em seguida, nós realizamos um teste de permeabilidade vascular com Azul de Evans para confirmação de que os vasos presentes no DRG permitiriam a passagem de moléculas presentes na circulação para o interior do órgão em questão. Verificamos que, após a administração sistêmica, o azul de Evans alcançou e se compartimentalizou ao redor do DRG L4 (figura 23b à esquerda), e acessou o interior do órgão, se impregnando na região rica em corpos celulares (figura 23b à direita). Essa evidência confirma a possibilidade de que drogas sistemicamente injetadas poderiam atuar em componentes no interior do DRG.

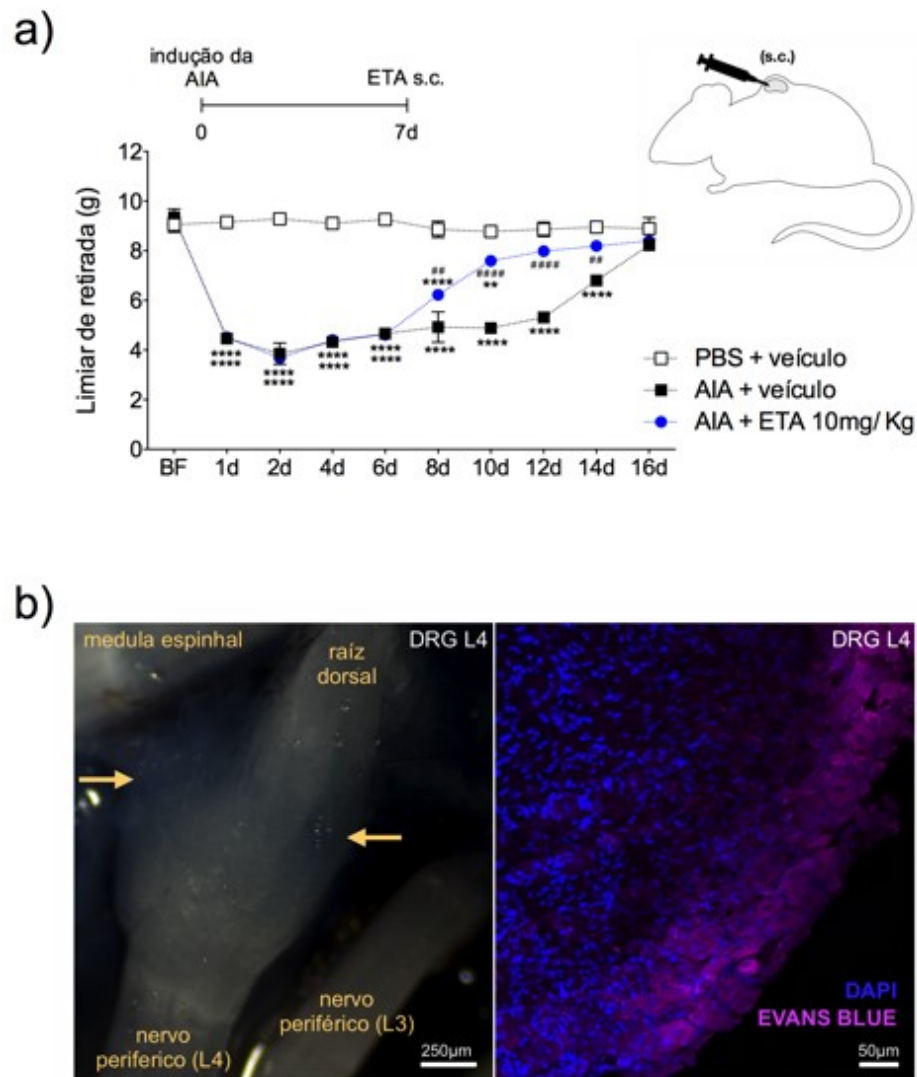


Figura 23. Reversão da hipernocicepção provocada pela ação de TNF no DRG após administração sistêmica de etanercept e permeabilidade do gânglio durante período não inflamatório da AIA. Para a indução da AIA, os animais previamente imunizados (injeção s.c. contendo 500µg mBSA dissolvidos em 50µl de PBS e emulsionados com 50µl CFA) foram desafiados com uma injeção i.a. contendo 10µg de mBSA dissolvidos em 10µl de PBS (■). Os animais controles, que não desenvolveram a AIA, foram desafiados com uma injeção i.a. contendo somente 10µl de PBS (□). Registro da resposta nociceptiva (a). O grupo tratado recebeu uma injeção subcutânea (s.c.) na dose de 10mg/ kg µg (●) de etanercept (Eta.), 7 dias após o desafio (a). A resposta nociceptiva dos animais foi aferida pelo método de von Frey (n= 5). O registro do limiar de retirada foi realizado em diferentes tempos após o desafio. O registro do limiar de retirada basal (LB) foi realizado 24 horas antes do desafio. Avaliação da permeabilidade dos vasos do DRG (b). O animal recebeu uma injeção intravenosa (i.v.) contendo de Azul de Evan 8 dias após o desafio. As setas amarelas indicam acúmulo de Azul de Evans em uma região próxima ao DRG em L4 (lado esquerdo). Imagem representativa de uma microscopia confocal mostrando impregnação do Azul de Ivan (roxo) na região rica em corpos celulares do DRG (lado direito). Os resultados foram expressos como média ± SEM; * p< 0,05 quando comparado ao grupo controle PBS. # p< 0,05 quando comparado ao grupo artrítico não tratado (AIA + veículo).

6. DISCUSSÃO

Os processos relacionados ao desenvolvimento da hiperalgesia articular na artrite reumatoide são estudados principalmente durante a fase em que os eventos inflamatórios se manifestam com maior intensidade^{107,126-129}. Alguns trabalhos, no entanto, procuram compreender o desenvolvimento da dor articular que persiste após a diminuição da atividade ou remissão da doença, que é um fenômeno clínico frequentemente reportado pelos pacientes^{73,74,130,131}. Todavia, a literatura é escassa de estudos que explicam como esse fenômeno se desenvolve a partir de alterações nos diversos estratos do sistema nociceptivo, especialmente no gânglio da raiz dorsal. Dentro dessa perspectiva, nós exploramos as alterações neste órgão sensorial que podem contribuir para a identificação de mecanismos que desencadeiam a dor articular após a resolução da resposta inflamatória na artrite. Nossos resultados mostram que o DRG, a despeito da resolução que ocorre no sítio articular, desenvolve um ambiente inflamatório, caracterizado pelo aumento de células Iba1⁺ e pelo aumento na expressão de moléculas inflamatórias. Além disso, verificamos que a hiperalgesia articular persistente no modelo de AIA está associada com o aumento da expressão de TNF e seu receptor TNFR2 no DRG, e que ela pode ser revertida pela administração intratecal ou sistêmica de etanercept. Portanto, nossos resultados reforçam a idéia de que algumas alterações moleculares e celulares no gânglio sensorial podem desencadear processos relacionados à manutenção da dor articular após a resolução da resposta inflamatória na artrite.

Nós utilizamos neste estudo o modelo de AIA, que apresenta uma resposta inflamatória autolimitada, e se caracteriza principalmente pelo recrutamento de neutrófilos para a cavidade articular^{97,100}. Após realizarmos o desafio com mBSA, nós observamos um aumento no rolamento e na adesão de leucócitos na microvasculatura do joelho, com subsequente aumento da presença de neutrófilos na cavidade acometida. Além disso, nossos experimentos demonstraram que a permanência desses neutrófilos no sítio inflamatório teve um limite próprio, associado a um retorno dos níveis de IL-1 β e IL-6 para valores basais e aumento de células mononucleares. Esse limite pode ser relacionado ao desencadeamento do processo de resolução da resposta inflamatória. Diversos trabalhos mostram que durante essa etapa há uma diminuição do recrutamento de neutrófilos para o sítio inflamatório, bem como aumento da apoptose dessas células, acompanhado de uma diminuição da liberação de moléculas inflamatórias e aumento do influxo de macrófagos (ver referência 18). Por fim, esses macrófago adquirem um fenótipo resolutivo e contribuem com o processo de remoção dos neutrófilos e

cessação da resposta inflamatória. Esse conjunto de eventos é dependente da liberação de moléculas pró-resolutivas que orquestram todo o processo de reestabelecimento da homeostase tecidual¹³²⁻¹³⁴. As observações realizadas neste presente trabalho mostram que a AIA é um modelo em que a resolução da resposta inflamatória ocorre de forma natural, respeitando processos celulares e moleculares amplamente discutidos na literatura^{16,18}. A análise dos processos de resolução em uma inflamação autolimitada precisam ainda ser melhor detalhados, uma vez que eles são rápidos e de difícil identificação nos tempos estudados neste trabalho.

Diferentemente de Qu e Caterina (2016), que evidenciaram uma cessação conjunta de inflamação e hiperalgesia no modelo de AIA¹³⁵, nós mostramos que a resposta nociceptiva não diminui junto com a cinética de resolução e retorno da homeostasia do tecido afetado. Acreditamos que a diferença entre a hiperalgesia registrada em nosso estudo e aquela observada no trabalho de Qu e Catarina (2016) possa ser explicado em função do método utilizado para mensuração da resposta nociceptiva. Diferentemente desses autores, que comprimiram a região articular dos animais, nós aplicamos um estímulo capaz de alterar o ângulo na articulação do joelho dos camundongos. Portanto, nós estimulamos terminais de fibras nociceptivas presentes em estruturas mais profundas, como os ligamentos⁸⁸, que são comprometidos no modelo de AIA¹³⁶. Além disso, os resultados dos experimentos comportamentais, que mostraram uma manutenção da hiperalgesia após a resolução da inflamação, foram confirmados pela forte expressão de c-Fos nos neurônios do DRG. O aumento na expressão de c-Fos está relacionada com a ativação de componentes neuronais em diversos estratos do sistema nociceptivo¹³⁷⁻¹⁴⁰, incluindo o DRG¹⁴¹. Nossos dados podem ser confirmados pelo conjunto de resultados expostos pelos trabalho de Sachs *et al.* (2010) e Lopes *et al.* (2009), que demonstraram que a hiperalgesia persiste após a remissão da inflamação articular no modelo de AIA^{97,98}. Entretanto, os mecanismos associado a esse evento não foram abordado por esses autores.

Nossos achados indicam a existência de um mecanismo subjacente à influência dos estímulos inflamatórios no joelho desafiado, que é capaz de conservar a hiperalgesia articular após a resolução da resposta inflamatória no modelo de AIA. Essa hipótese pode ser justificada por dois motivos. Primeiro, o tratamento com dexametasona ou PI3K γ foram capazes de diminuir a inflamação articular, porém não reverteram a hiperalgesia. Segundo, a hiperalgesia articular persistiu a despeito da diminuição de citocinas capazes de induzir um aumento da excitabilidade de nociceptores articulares.

Em nosso estudo, o tratamento com dexametasona foi capaz de abolir completamente a inflamação na articulação dos animais artríticos. Na AIA, esse efeito está associado com a

regulação na expressão gênica de citocinas inflamatórias pela atividade da Anexina 1¹⁴². Vago *et al.* (2012) sugerem ainda que o tratamento com dexametasona é capaz de reduzir a resposta inflamatória relacionada ao aumento na expressão de anexina A1 intacta e da apoptose de neutrófilos¹⁴³. Além disso, macrófagos estimulados com dexametasona aumentaram sua capacidade de eferocitar neutrófilos apoptóticos¹⁴⁴, que é mais um efeito associado às propriedades pró-resolutivas dessa droga. Contudo, apesar de termos confirmado que a dexametazona exerce um efeito pró-resolutivo no modelo de AIA, a reversão da hiperalgisia observada após o tratamento com essa droga não foi permanente.

Nós mostramos, ainda, que a administração i.a. do inibidor de PI3k γ , AS605240, induziu uma diminuição do número de neutrófilos e manteve a quantidade de células mononucleares na cavidade articular desafiada com mBSA. Esse resultado está em acordo com os dados de Galvão *et al.* (2019). Utilizando um modelo de indução de gota experimental pela administração i.a. de cristais de urato monossódico (MSU, do inglês, *monosodium urate crystals*), esses autores evidenciaram uma indução da resolução da inflamação após o tratamento com AS605240. Eles mostraram que essa droga foi capaz de diminuir o número de neutrófilos, manter as células mononucleares, aumentar a eferocitose e diminuir os níveis de IL-1 β e TNF na cavidade articular acometida. No entanto, diferentemente desses autores, nós não observamos uma melhora na hiperalgisia articular. Essa inconsistência sobre a ação analgésica do AS605240 pode ser explicada pela diferença na intensidade da hiperalgisia, que pode ser produzida de forma específica entre os modelos utilizados. Outra possibilidade que pode explicar essa diferença é a dose adotada em nosso trabalho, que foi 10 vezes menor que aquela utilizada no referido estudo. De forma geral, o mecanismo que preserva a hiperalgisia na AIA é estimulado mesmo que a eficiência dos processos de resolução da resposta inflamatória seja amplificada pelo tratamento com dexametasona ou AS605240.

Durante a resolução natural da inflamação, foi observado que houve uma diminuição nas concentrações de IL-1 β , IL-6, IL-22, IL-17 no joelho de camundongos artríticos até o segundo dia após o desafio com mBSA. Apesar dessas citocinas participarem periféricamente no desenvolvimento da hipersensibilidade articular^{106,108,109,145-147}, em nossos experimentos suas concentrações na articulação já eram insuficientes para justificar a hiperalgisia residual verificada após a resolução da resposta inflamatória. Portanto, como os eventos periféricos não foram capazes de justificar a manutenção da sensibilidade articular, nós direcionamos nossa atenção para diferentes regiões moduladoras da nocicepção. Com isso, objetivamos responder

sobre como a essa hiperalgesia persistiu após a resolução da resposta inflamatória no modelo de AIA.

Alguns mecanismos relacionados à interação entre o sistema imune e os componentes do sistema nociceptivo oferecem uma perspectiva para a compreensão dos processos que aumentam a sensibilidade sensorial^{58,121}. Muitos desses mecanismos podem ocorrer no DRG como efeito da alteração no perfil de moléculas inflamatórias em seu microambiente e pela ativação de componentes celulares presentes nesse órgão¹²¹. Vários trabalhos apontam a participação de TNF, IL1 β , IL6, COX, iNOS e CXCL1 durante o evento de sensibilização do neurônio nociceptivo presente no DRG, ou no desenvolvimento da hiperalgesia¹⁴⁸⁻¹⁵⁴. Porém, poucos estudos exploram as mudanças no ambiente inflamatório desse órgão ou relacionam essas mudanças à dor articular observada em condições não inflamatórias em modelos de indução de artrite. Em nosso estudo, então, nós avaliamos se o DRG apresentou alterações no perfil de expressão de moléculas inflamatórias após a resolução da inflamação no sítio articular. Nós mostramos que, além do aumento na ativação de células Iba1⁺ no DRG, houve também um aumento na expressão de TNF, IL-1 β , IL-6, COX2, iNOS e CXCL1 nesse órgão sensorial.

Em seguida, nós demonstramos que houve um aumento na expressão de TNF no DRG após a fase de resolução da resposta inflamatória no joelho de animais submetidos à AIA. De fato, a ação de TNF no DRG pode gerar um efeito pro-nociceptivo¹²¹, e a hiperexpressão dessa molécula nesse órgão está relacionada com o aumento da sensibilidade à dor em diversas condições patológicas como por exemplo na dor neuropática¹⁵⁵, na neuralgia herpética aguda¹⁵⁶ e na diabetes neuropática¹⁵⁷. Além disso, o TNF é produzido por macrófagos no DRG¹²¹. Dessa forma, é possível que em nosso trabalho a fonte de TNF tenha sido oriunda de macrófagos Iba1⁺ presentes no DRG. No entanto, vale ressaltar que o aumento nos níveis de TNF foram verificados somente no DRG L4. Esse é um dado que caracteriza a importância que especificamente esse DRG apresenta para o desenvolvimento da hiperalgesia no joelho de camundongos. Possivelmente, uma grande densidade de terminais periféricos de fibras aferentes primárias cujos corpos celulares estão alojados no DRG L4, constituem o maior campo receptivo nessa articulação.

Em condições inflamatórias, o aumento na expressão de TNFR1 no DRG pode ser observado tanto em células neuronais quanto em células não neuronais¹⁵⁸. O aumento na expressão do receptor TNFR2, no entanto, fica restrito às células não neuronais¹⁵⁸. Na artrite, as alterações no perfil de expressão desses receptores no DRG não apresenta consenso na literatura. Em um modelo de artrite induzida por CFA, Inglis *et al.* (2005) evidenciou um

aumento em TNFR1 nas células neurais e TNFR2 em macrófagos infiltrados no DRG ¹²⁷. No entanto, Borttger *et al.* (2008) mostrou que, apesar de células de médio e pequeno calibre no DRG expressarem TNFR1 e TNFR2, a proporção desses receptores não se altera durante a AIA ¹⁰⁷. Em nossos experimentos, a expressão do gene de TNFR1 no DRG diminuiu nos tempos de 6 e 8 dias após a indução da AIA. A ativação desse receptor está relacionada ao aumento da excitabilidade neuronal dependente da expressão de TRPV1 ¹²², e à disponibilidade desse canal na superfície neuronal de nociceptores ¹⁵⁹. Entretanto, além da diminuição da expressão de TNFR1 no DRG, não observamos qualquer alteração nos níveis de TRPV1 no DRG ao longo da AIA. Esses resultados, portanto, demonstram que a manutenção da hiperalgesia após a resolução da resposta inflamatória na AIA não pode ser explicada pela ativação de TNFR1. Por outro lado, em nossos experimentos demonstramos que houve um aumento na expressão de TNFR2 8 dias após a indução da AIA. Já foi demonstrado, que a expressão desse receptor pode ser evidenciada em macrófagos que migram para o DRG de animais artríticos e que são associados à dor articular ^{127,128}. Esses macrófagos que expressam TNFR2 representam uma via alternativa pela qual o TNF poderia modular a função neuronal no DRG ¹²⁷. Apesar de podermos afirmar que o aumento na expressão de TNFR2 está associado com a manutenção da hipernocicepção no modelo de AIA, nós não verificamos em qual tipo celular esse receptor está exercendo sua influência.

A inflamação em regiões específicas da medula espinhal, como por exemplo no CDME, está associada ao desenvolvimento da dor em uma série de condições patológicas ^{58,121}. Na AIA, a expressão de TNF na medula espinhal está relacionada com o aumento da resposta hipernociceptiva em camundongos ^{102,160}. Quadros *et al.* (2015) demonstraram que, em animais previamente imunizados, o desafio com uma dose elevada de mBSA (100µg/ joelho) foi capaz de produzir uma intensa resposta hipernociceptiva associada ao aumento da expressão de TNF e à ativação de células da micróglia na medula espinhal ¹⁰². Esses mesmos autores ainda demonstraram que a administração intratecal de drogas que neutralizam o TNF ou que evitam a ativação de células da micróglia melhoram a hipernocicepção induzida pela AIA ¹⁰². Corroborando esses resultados, em um modelo de artrite induzida por colágeno, a reversão da hipernocicepção persistente foi produzida pela inibição da ativação da micróglia e de astrócitos após a administração intratecal de minociclina ou pentoxifenilina, respectivamente ¹⁶¹. Em contraste, nós verificamos que o desafio intra-articular com uma dose de 10µg de mBSA no joelho de animais previamente imunizados foi insuficiente para produzir um aumento na expressão gênica de TNF, Iba1 ou GFAP no CDME após a fase resolutive na AIA. Porém,

durante esse mesmo período, a injeção intratecal de etanercept provocou uma diminuição da resposta nociceptiva. Então, consideramos a possibilidade de que os receptores para TNF estariam sendo ativados no corno dorsal por ligantes provenientes de fontes não medulares. Isso justificaria a redução da resposta nociceptiva induzida pela injeção intratecal de etanercept, que estaria neutralizando o TNF de fontes secundárias e, conseqüentemente, impedindo a ligação dessa citocina a seus receptores na medula espinhal. No entanto, ainda que os receptores de TNF possam influenciar o grau de excitabilidade de células sensoriais presentes no CDME durante a dor inflamatória ¹⁶², não observamos qualquer alteração no nível de expressão de TNFR1 ou TNFR2 nessa região. Dessa forma, uma vez que o etanercept injetado pela via intratecal não poderia ter exercido seus efeitos antinociceptivos no CDME, nós acreditamos que ele tenha neutralizado o TNF observado no DRG após a resolução da inflamação. Apesar da rota de administração intratecal ser tradicionalmente usada para dar acesso à medula espinhal ¹¹⁷, moléculas injetadas por esse via se espalham pelo espaço subaracnóideo e alcançam as estruturas do gânglio sensorial ^{163,164}. Logo, o TNF produzido no DRG parece ter sido de fato o responsável pelo desenvolvimento da hiperalgesia articular persistente nos animais submetidos à AIA.

A região rica em corpos celulares do DRG é extensivamente vascularizada ¹²⁵. Os vasos dessa região são fenestrados e expressam um padrão de proteínas de oclusão que conferem ao DRG uma grande permeabilidade para diferentes compostos, de baixo ou alto peso molecular ¹⁶⁵⁻¹⁶⁷. Essa propriedade vascular do DRG foi confirmada por nossos experimentos. Nós constatamos que o azul de Ivan sistemicamente administrado alcança a região rica em corpos celulares do DRG 8 dias após a indução da AIA. A manutenção dessa permeabilidade durante o período em que o TNF está elevado no DRG pode oferecer uma vantagem importante para o tratamento da dor persistente, que é frequentemente observada em pacientes artríticos. De fato, drogas que são administradas sistemicamente podem penetrar e se acumular no DRG ¹²⁵, transformando esse órgão sensorial em um potencial alvo farmacológico ¹²⁴. Nessa perspectiva, nossos experimentos sugerem que a administração sistêmica de etanercept, um fármaco amplamente utilizado na clínica, foi capaz de neutralizar o TNF presente no DRG após a resolução da resposta inflamatória no joelho. Essa suposição é proveniente da observação de que a injeção subcutânea de etanercept diminuiu gradualmente a intensidade da resposta nociceptiva nos animais acometidos pela AIA. Além disso é possível afirmar que o efeito antinociceptivo do etanercept não foi um produto de sua atividade na articulação afetada. Isso

se deve ao fato de que a droga foi administrada 7 dias após a indução da AIA, quando já não havia qualquer sinal de inflamação no joelho desafiado com mBSA.

Apesar do CDME não ter apresentado qualquer mudança na expressão de Iba1, GFAP ou TNF, nós observamos um aumento na adesão de leucócitos na microvasculatura da região posterior da intumescência lombar. Considerando que a raiz dorsal do DRG penetra na medula espinhal em uma região próxima àquela que foi analisada por microscopia intravital, acreditamos que a neuroinflamação que se desenvolveu no gânglio sensorial possa ter exercido alguma influência sob a ativação vascular na medula espinhal. Esse achado pode ascender algumas hipóteses sobre a sequência de eventos neuroimunes que geram o desenvolvimento da sensibilidade espinhal. Porém, a caracterização desse fenômeno deve ser melhor investigada.

Sumarizando, nós mostramos que o DRG desenvolve em seu microambiente uma condição inflamatória transiente, com aumento da expressão gênica de diversas citocinas. Aparentemente, esse status inflamatório no DRG parece influenciar no aumento sutil da atividade na microvasculatura presente na medula espinhal. Além disso, nosso principal achado demonstra que a sensibilidade articular persistente observada na AIA é associada ao aumento da expressão de TNF e da expressão gênica do seu receptor TNFR2 no DRG. Essas alterações representam um mecanismo intrínseco do DRG, capaz de induzir a manutenção da hiperalgesia articular sem que haja qualquer sinal de inflamação no joelho acometido. Esse evento se desencadeia de forma independente da ativação de células da micróglia e da participação do TNF no CDME.

7. CONCLUSÃO

O TNF expresso do DRG-L4 atua no processo de manutenção da hiperalgesia articular após a resolução da resposta inflamatória no modelo de AIA.

8. REFERÊNCIAS

1. Medzhitov, R. Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. *Cell* (2010). doi:10.1016/j.cell.2010.03.006
2. Medzhitov, R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* (2008). doi:10.1038/nature07201
3. Scarborough, J. & Majno, G. The Healing Hand: Man and Wound in the Ancient World. *Am. Hist. Rev.* (1977). doi:10.2307/1857149
4. Kolaczkowska, E. & Kubes, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature Reviews Immunology* (2013). doi:10.1038/nri3399
5. Soehnlein, O., Steffens, S., Hidalgo, A. & Weber, C. Neutrophils as protagonists and targets in chronic inflammation. *Nature Reviews Immunology* (2017). doi:10.1038/nri.2017.10
6. Hyun, Y. M. *et al.* Uropod elongation is a common final step in leukocyte extravasation through inflamed vessels. *J. Exp. Med.* (2012). doi:10.1084/jem.20111426
7. Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M. I. & Nourshargh, S. Getting to the site of inflammation: The leukocyte adhesion cascade updated. *Nature Reviews Immunology* (2007). doi:10.1038/nri2156
8. Zarbock, A., Ley, K., McEver, R. P. & Hidalgo, A. Leukocyte ligands for endothelial selectins: Specialized glycoconjugates that mediate rolling and signaling under flow. *Blood* (2011). doi:10.1182/blood-2011-07-343566
9. van Oostrom, A. J., van Wijk, J. P., Sijmonsma, T. P., Rabelink, T. J. & Castro Cabezas, M. Increased expression of activation markers on monocytes and neutrophils in type 2 diabetes. *Neth. J. Med.* (2004).
10. Bazzoni, G. & Hemler, M. E. Are changes in integrin affinity and conformation overemphasized? *Trends in Biochemical Sciences* (1998). doi:10.1016/S0968-0004(97)01141-9
11. Carman, C. V. & Springer, T. A. Integrin avidity regulation: Are changes in affinity and conformation underemphasized? *Current Opinion in Cell Biology* (2003). doi:10.1016/j.ceb.2003.08.003
12. Woodfin, A., Voisin, M. B. & Nourshargh, S. Recent developments and complexities in neutrophil transmigration. *Current Opinion in Hematology* (2010). doi:10.1097/MOH.0b013e3283333930

13. Brinkmann, V. *et al.* Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science* (80-.). (2004). doi:10.1126/science.1092385
14. Borregaard, N. Neutrophils, from Marrow to Microbes. *Immunity* (2010). doi:10.1016/j.immuni.2010.11.011
15. Häger, M., Cowland, J. B. & Borregaard, N. Neutrophil granules in health and disease. *Journal of Internal Medicine* (2010). doi:10.1111/j.1365-2796.2010.02237.x
16. Perez, D. A. *et al.* Switching Off Key Signaling Survival Molecules to Switch On the Resolution of Inflammation. *Mediators Inflamm.* (2014). doi:10.1155/2014/829851
17. Sugimoto, M. A., Sousa, L. P., Pinho, V., Perretti, M. & Teixeira, M. M. Resolution of inflammation: What controls its onset? *Frontiers in Immunology* (2016). doi:10.3389/fimmu.2016.00160
18. Gonçalves, W. A., Melão, A. C. R., Teixeira, M. M., Rezende, B. M. & Pinho, V. Pro-resolving mediators. in *Immunopharmacology and Inflammation* (2018). doi:10.1007/978-3-319-77658-3_6
19. Silman, A. J. & Pearson, J. E. Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. *Arthritis research* (2002).
20. Ngo, S. T., Steyn, F. J. & Mccombe, P. A. Frontiers in Neuroendocrinology Gender differences in autoimmune disease. *Front. Neuroendocrinol.* (2014). doi:10.1016/j.yfrne.2014.04.004
21. Viatte, S., Plant, D. & Raychaudhuri, S. Genetics and epigenetics of rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Rheumatology* (2013). doi:10.1038/nrrheum.2012.237
22. Makrygiannakis, D. *et al.* Smoking increases peptidylarginine deiminase 2 enzyme expression in human lungs and increases citrullination in BAL cells. *Ann. Rheum. Dis.* (2008). doi:10.1136/ard.2007.075192
23. Lugli, E. B. *et al.* Expression of citrulline and homocitrulline residues in the lungs of non-smokers and smokers: Implications for autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* (2015). doi:10.1186/s13075-015-0520-x
24. Snir, O. *et al.* Antibodies to several citrullinated antigens are enriched in the joints of rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum.* (2010). doi:10.1002/art.25036
25. Catrina, A. I., Jimmy Ytterberg, A., Reynisdottir, G., Malmström, V. & Klareskog, L. Lungs, joints and immunity against citrullinated proteins in rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Rheumatology* (2014). doi:10.1038/nrrheum.2014.115
26. Ge, C. *et al.* Anti-citrullinated protein antibodies cause arthritis by cross-reactivity to

- joint cartilage. *JCI insight* (2017). doi:10.1172/jci.insight.93688
27. Dong, X. *et al.* ACPAs promote IL-1 β production in rheumatoid arthritis by activating the NLRP3 inflammasome. *Cell. Mol. Immunol.* (2019). doi:10.1038/s41423-019-0201-9
 28. Gregersen, P. K., Silver, J. & Winchester, R. J. The shared epitope hypothesis. an approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* (1987). doi:10.1002/art.1780301102
 29. Liu, Y. *et al.* Epigenome-wide association data implicate DNA methylation as an intermediary of genetic risk in rheumatoid arthritis. *Nat. Biotechnol.* (2013). doi:10.1038/nbt.2487
 30. Gomez-Cabrero, D. *et al.* High-specificity bioinformatics framework for epigenomic profiling of discordant twins reveals specific and shared markers for ACPA and ACPA-positive rheumatoid arthritis. *Genome Med.* (2016). doi:10.1186/s13073-016-0374-0
 31. Meng, W. *et al.* DNA methylation mediates genotype and smoking interaction in the development of anti-citrullinated peptide antibody-positive rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* (2017). doi:10.1186/s13075-017-1276-2
 32. Frank-Bertoncelj, M. *et al.* Epigenetically-driven anatomical diversity of synovial fibroblasts guides joint-specific fibroblast functions. *Nat. Commun.* (2017). doi:10.1038/ncomms14852
 33. Stolt, P. *et al.* Silica exposure is associated with increased risk of developing rheumatoid arthritis: Results from the Swedish EIRA study. *Ann. Rheum. Dis.* (2005). doi:10.1136/ard.2004.022053
 34. Stolt, P. *et al.* Silica exposure among male current smokers is associated with a high risk of developing ACPA-positive rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* (2010). doi:10.1136/ard.2009.114694
 35. Chen, J. *et al.* An expansion of rare lineage intestinal microbes characterizes rheumatoid arthritis. *Genome Med.* (2016). doi:10.1186/s13073-016-0299-7
 36. Hajishengallis, G. Periodontitis: From microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nature Reviews Immunology* (2015). doi:10.1038/nri3785
 37. Konig, M. F. *et al.* Aggregatibacter actinomycetemcomitans-induced hypercitrullination links periodontal infection to autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Sci. Transl. Med.* (2016). doi:10.1126/scitranslmed.aaj1921
 38. Ljung, L. & Rantapää-Dahlqvist, S. Abdominal obesity, gender and the risk of

- rheumatoid arthritis - a nested case-control study. *Arthritis Res. Ther.* (2016). doi:10.1186/s13075-016-1171-2
39. Verstappen, S. M. M. Rheumatoid arthritis and work: The impact of rheumatoid arthritis on absenteeism and presenteeism. *Best Practice and Research: Clinical Rheumatology* (2015). doi:10.1016/j.berh.2015.06.001
 40. Lapsley, H. M. *et al.* Living with rheumatoid arthritis: Expenditures, health status, and social impact on patients. *Ann. Rheum. Dis.* (2002). doi:10.1136/ard.61.9.818
 41. Kłak, A., Raciborski, F. & Samel-Kowalik, P. Social implications of rheumatic diseases. *Reumatologia* (2016). doi:10.5114/reum.2016.60216
 42. Wanruchada Katchamart , Pongthorn Narongroeknawin, W. C. and P. T. Health-related quality of life in patients with rheumatoid arthritis. *BMC Rheumatol.* **3**, (2019).
 43. Sambamoorthi, U., Shah, D. & Zhao, X. Healthcare burden of depression in adults with arthritis. *Expert Review of Pharmacoeconomics and Outcomes Research* (2017). doi:10.1080/14737167.2017.1281744
 44. Dickens, C., McGowan, L., Clark-Carter, D. & Creed, F. Depression in rheumatoid arthritis: A systematic review of the literature with meta-analysis. *Psychosomatic Medicine* (2002). doi:10.1097/00006842-200201000-00008
 45. Nerurkar, L., Siebert, S., McInnes, I. B. & Cavanagh, J. Rheumatoid arthritis and depression: an inflammatory perspective. *The Lancet Psychiatry* (2019). doi:10.1016/S2215-0366(18)30255-4
 46. Masi, A. T. Articular patterns in the early course of rheumatoid arthritis. *Am. J. Med.* (1983). doi:10.1016/0002-9343(83)90471-0
 47. Smolen Josef, Aletaha Daniel, Barton Anne, Burmester Gerd, Emery Paul, Firestein Gary, Kavanaugh Arthur, Iain McInnes, Solomon Daniel, Strand Vibeke, Y. K. Rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **4**, (2018).
 48. Wright, H. L., Moots, R. J. & Edwards, S. W. The multifactorial role of neutrophils in rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Rheumatology* (2014). doi:10.1038/nrrheum.2014.80
 49. Nielen, M. M. J. *et al.* Specific Autoantibodies Precede the Symptoms of Rheumatoid Arthritis: A Study of Serial Measurements in Blood Donors. *Arthritis Rheum.* (2004). doi:10.1002/art.20018
 50. Rantapää-Dahlqvist, S. *et al.* Antibodies Against Cyclic Citrullinated Peptide and IgA Rheumatoid Factor Predict the Development of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum.*

- (2003). doi:10.1002/art.11223
51. Ziff, M. Relation of cellular infiltration of rheumatoid synovial membrane to its immune response. *Arthritis Rheum.* (1974). doi:10.1002/art.1780170317
 52. Bartok, B. & Firestein, G. S. Fibroblast-like synoviocytes: Key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunological Reviews* (2010). doi:10.1111/j.0105-2896.2009.00859.x
 53. Lefèvre, S. *et al.* Synovial fibroblasts spread rheumatoid arthritis to unaffected joints. *Nat. Med.* (2009). doi:10.1038/nm.2050
 54. Murphy, G. & Nagase, H. Reappraising metalloproteinases in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: Destruction or repair? *Nature Clinical Practice Rheumatology* (2008). doi:10.1038/ncprheum0727
 55. Hallett, M. B. & Lloyds, D. Neutrophil priming: the cellular signals that say ‘amber’ but not ‘green’. *Immunol. Today* (1995). doi:10.1016/0167-5699(95)80178-2
 56. Chakravarti, A., Raquil, M. A., Tessier, P. & Poubelle, P. E. Surface RANKL of Toll-like receptor 4-stimulated human neutrophils activates osteoclastic bone resorption. *Blood* (2009). doi:10.1182/blood-2008-09-178301
 57. Redlich, K. & Smolen, J. S. Inflammatory bone loss: Pathogenesis and therapeutic intervention. *Nature Reviews Drug Discovery* (2012). doi:10.1038/nrd3669
 58. Baral, P., Udit, S. & Chiu, I. M. Pain and immunity: implications for host defence. *Nature Reviews Immunology* (2019). doi:10.1038/s41577-019-0147-2
 59. Schaible, H. G. Nociceptive neurons detect cytokines in arthritis. *Arthritis Research and Therapy* (2014). doi:10.1186/s13075-014-0470-8
 60. Verri, W. A. *et al.* Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: Targets for analgesic drug development? *Pharmacology and Therapeutics* (2006). doi:10.1016/j.pharmthera.2006.04.001
 61. Cook, A. D., Christensen, A. D., Tewari, D., McMahon, S. B. & Hamilton, J. A. Immune Cytokines and Their Receptors in Inflammatory Pain. *Trends in Immunology* (2018). doi:10.1016/j.it.2017.12.003
 62. Smolen, J. S. *et al.* Treating rheumatoid arthritis to target: 2014 update of the recommendations of an international task force. *Ann. Rheum. Dis.* (2016). doi:10.1136/annrheumdis-2015-207524
 63. Chatzidionysiou, K. *et al.* Efficacy of glucocorticoids, conventional and targeted synthetic disease-modifying antirheumatic drugs: A systematic literature review

- informing the 2016 update of the EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* (2017). doi:10.1136/annrheumdis-2016-210711
64. Burmester, G. R. & Pope, J. E. Novel treatment strategies in rheumatoid arthritis. *The Lancet* (2017). doi:10.1016/S0140-6736(17)31491-5
 65. Guo, Q. *et al.* Rheumatoid arthritis: Pathological mechanisms and modern pharmacologic therapies. *Bone Research* (2018). doi:10.1038/s41413-018-0016-9
 66. Taylor, P. *et al.* Patient perceptions concerning pain management in the treatment of rheumatoid arthritis. *J. Int. Med. Res.* (2010). doi:10.1177/147323001003800402
 67. Heiberg, T. & Kvien, T. K. Preferences for improved health examined in 1,024 patients with rheumatoid arthritis: Pain has highest priority. *Arthritis Rheum.* (2002). doi:10.1002/art.10515
 68. Minnock, P., FitzGerald, O. & Bresnihan, B. Women with established rheumatoid arthritis perceive pain as the predominant impairment of health status. *Rheumatology* (2003). doi:10.1093/rheumatology/keg281
 69. Stack J., R. J. *et al.* Symptom complexes in patients with seropositive arthralgia and in patients newly diagnosed with rheumatoid arthritis: A qualitative exploration of symptom development. *Rheumatol. (United Kingdom)* (2014). doi:10.1093/rheumatology/keu159
 70. Sarzi-Puttini, P. *et al.* Correlation of the score for subjective pain with physical disability, clinical and radiographic scores in recent onset rheumatoid arthritis. *BMC Musculoskelet. Disord.* (2002). doi:10.1186/1471-2474-3-18
 71. Sokka, T., Kankainen, A. & Hannonen, P. Scores for functional disability in patients with rheumatoid arthritis are correlated at higher levels with pain scores than with radiographic scores. *Arthritis Rheum.* (2000). doi:10.1002/1529-0131(200002)43:2<386::AID-ANR19>3.0.CO;2-Z
 72. Kojima, M. *et al.* Depression, inflammation, and pain in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res.* (2009). doi:10.1002/art.24647
 73. Boyden, S. D., Hossain, I. N., Wohlfahrt, A. & Lee, Y. C. Non-inflammatory Causes of Pain in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Current Rheumatology Reports* (2016). doi:10.1007/s11926-016-0581-0
 74. Koop, S. M. W., ten Klooster, P. M., Vonkeman, H. E., Steunebrink, L. M. M. & van de Laar, M. A. F. J. Neuropathic-like pain features and cross-sectional associations in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* (2015). doi:10.1186/s13075-015-0761-8

75. Mark J. Millan. Descending control of pain. *Prog. Neurobiol.* **66**, 355–474 (2002).
76. Scholz, J. & Woolf, C. J. Can we conquer pain? *Nature Neuroscience* (2002). doi:10.1038/nn942
77. Dubin, A. E. & Patapoutian, A. Nociceptors: The sensors of the pain pathway. *Journal of Clinical Investigation* (2010). doi:10.1172/JCI42843
78. Julius, D. & Basbaum, A. I. Molecular mechanisms of nociception : Abstract : Nature. *Nature* **413**, 203–210 (2001).
79. Basbaum, A. I., Bautista, D. M., Scherrer, G. & Julius, D. Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. *Cell* (2009). doi:10.1016/j.cell.2009.09.028
80. Valtcheva, M. V. *et al.* Surgical extraction of human dorsal root ganglia from organ donors and preparation of primary sensory neuron cultures. *Nat. Protoc.* (2016). doi:10.1038/nprot.2016.111
81. Rush, A. M. & Waxman, S. G. Dorsal Root Ganglion Neurons. in *Encyclopedia of Neuroscience* (2009). doi:10.1016/B978-008045046-9.01660-0
82. Nascimento, A. I., Mar, F. M. & Sousa, M. M. The intriguing nature of dorsal root ganglion neurons: Linking structure with polarity and function. *Progress in Neurobiology* (2018). doi:10.1016/j.pneurobio.2018.05.002
83. Woolf, C. J. & Ma, Q. Nociceptors-Noxious Stimulus Detectors. *Neuron* (2007). doi:10.1016/j.neuron.2007.07.016
84. Kuner, R. Central mechanisms of pathological pain. *Nature Medicine* (2010). doi:10.1038/nm.2231
85. Mantyh, P. W. *et al.* Inhibition of hyperalgesia by ablation of lamina I spinal neurons expressing the substance P receptor. *Science* (80-.). (1997). doi:10.1126/science.278.5336.275
86. SKOGLUND, S. Anatomical and physiological studies of knee joint innervation in the cat. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* (1956).
87. SAMUEL, E. P. The autonomic and somatic innervation of the articular capsule. *Anat. Rec.* (1952). doi:10.1002/ar.1091130104
88. Schaible, H.-G. & Grubb, B. D. Afferent and spinal mechanisms of joint pain. *Pain* (1993). doi:10.1016/0304-3959(93)90183-p
89. Mapp, P. I. Innervation of the synovium. in *Annals of the Rheumatic Diseases* (1995). doi:10.1136/ard.54.5.398
90. Ossyssek, B., Anders, S., Grifka, J. & Straub, R. H. Surgical synovectomy decreases

- density of sensory nerve fibers in synovial tissue of non-inflamed controls and rheumatoid arthritis patients. *J. Orthop. Res.* (2011). doi:10.1002/jor.21233
91. Kelly, S. *et al.* Spontaneous firing in C-fibers and increased mechanical sensitivity in A-fibers of knee joint-associated mechanoreceptive primary afferent neurones during MIA-induced osteoarthritis in the rat. *Osteoarthr. Cartil.* (2012). doi:10.1016/j.joca.2012.01.002
 92. Schaible, H. G. & Schmidt, R. F. Effects of an experimental arthritis on the sensory properties of fine articular afferent units. *J. Neurophysiol.* (2017). doi:10.1152/jn.1985.54.5.1109
 93. Bas, D. B., Su, J., Wigerblad, G. & Svensson, C. I. Pain in rheumatoid arthritis: models and mechanisms. *Pain Manag.* (2016). doi:10.2217/pmt.16.4
 94. Brackertz, D., Mitchell, G. F. & Mackay, I. R. Antigen-induced arthritis in mice. I. Induction of arthritis in various strains of mice. *Arthritis Rheum.* (1977).
 95. Cooke, T. D. & Jasin, H. E. The pathogenesis of chronic inflammation in experimental antigen-induced arthritis. I. The role of antigen on the local immune response. *Arthritis Rheum.* (1972). doi:10.1002/art.1780150402
 96. Choudhary, N., Bhatt, L. K. & Prabhavalkar, K. S. Experimental animal models for rheumatoid arthritis. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* (2018). doi:10.1080/08923973.2018.1434793
 97. Lopes, F. *et al.* Resolution of neutrophilic inflammation by H₂O₂ in antigen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* (2011). doi:10.1002/art.30448
 98. Sachs, D. *et al.* Cooperative role of TNF- α , IL-1 β and neutrophils in a novel behavioural model that concomitantly demonstrates articular inflammation and hypernociception in mice. *Br J Pharmacol* (2010). doi:10.1111/j.1476-5381.2010.00895.x
 99. Coelho, F. M. *et al.* The chemokine receptors CXCR1/CXCR2 modulate antigen-induced arthritis by regulating adhesion of neutrophils to the synovial microvasculature. *Arthritis Rheum.* (2008). doi:10.1002/art.23622
 100. Costa, V. V. *et al.* Lithothamnion muelleri treatment ameliorates inflammatory and hypernociceptive responses in antigen-induced arthritis in mice. *PLoS One* (2015). doi:10.1371/journal.pone.0118356
 101. Kanashiro, A. *et al.* Neutrophil Recruitment and Articular Hyperalgesia in Antigen-Induced Arthritis are Modulated by the Cholinergic Anti-Inflammatory Pathway. *Basic*

- Clin. Pharmacol. Toxicol.* (2016). doi:10.1111/bcpt.12611
102. Quadros, A. U. *et al.* Dynamic weight bearing is an efficient and predictable method for evaluation of arthritic nociception and its pathophysiological mechanisms in mice. *Sci. Rep.* (2015). doi:10.1038/srep14648
 103. Latremoliere, A. & Woolf, C. J. Central Sensitization: A Generator of Pain Hypersensitivity by Central Neural Plasticity. *Journal of Pain* (2009). doi:10.1016/j.jpain.2009.06.012
 104. Schaible, H.-G. *et al.* The role of proinflammatory cytokines in the generation and maintenance of joint pain. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* (2010). doi:10.1111/j.1749-6632.2009.05301.x
 105. Ebbinghaus, M. *et al.* The role of interleukin-1 β in arthritic pain: Main involvement in thermal, but not mechanical, hyperalgesia in rat antigen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* (2012). doi:10.1002/art.34675
 106. M., E. *et al.* Interleukin-6-dependent influence of nociceptive sensory neurons on antigen-induced arthritis. *Arthritis Res. Ther.* (2015). doi:10.1186/s13075-015-0858-0
 107. Boettger, M. K. *et al.* Antinociceptive effects of tumor necrosis factor α neutralization in a rat model of antigen-induced arthritis: Evidence of a neuronal target. *Arthritis Rheum.* (2008). doi:10.1002/art.23608
 108. Pinto, L. G. *et al.* IL-17 mediates articular hypernociception in antigen-induced arthritis in mice. *Pain* (2010). doi:10.1016/j.pain.2009.11.006
 109. Pinto, L. G. *et al.* Joint production of IL-22 participates in the initial phase of antigen-induced arthritis through IL-1 β production. *Arthritis Res. Ther.* (2015). doi:10.1186/s13075-015-0759-2
 110. Kawasaki, Y., Zhang, L., Cheng, J. K. & Ji, R. R. 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.* (2008). doi:10.1523/JNEUROSCI.3338-07.2008
 111. Samad, T. A. *et al.* Interleukin-1 β -mediated induction of Cox-2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *Nature* (2001). doi:10.1038/35068566
 112. Honore, P. *et al.* Murine models of inflammatory, neuropathic and cancer pain each generates a unique set of neurochemical changes in the spinal cord and sensory neurons. *Neuroscience* (2000). doi:10.1016/S0306-4522(00)00110-X
 113. Raghavendra, V., Tanga, F. Y. & DeLeo, J. A. Complete Freund's adjuvant-induced

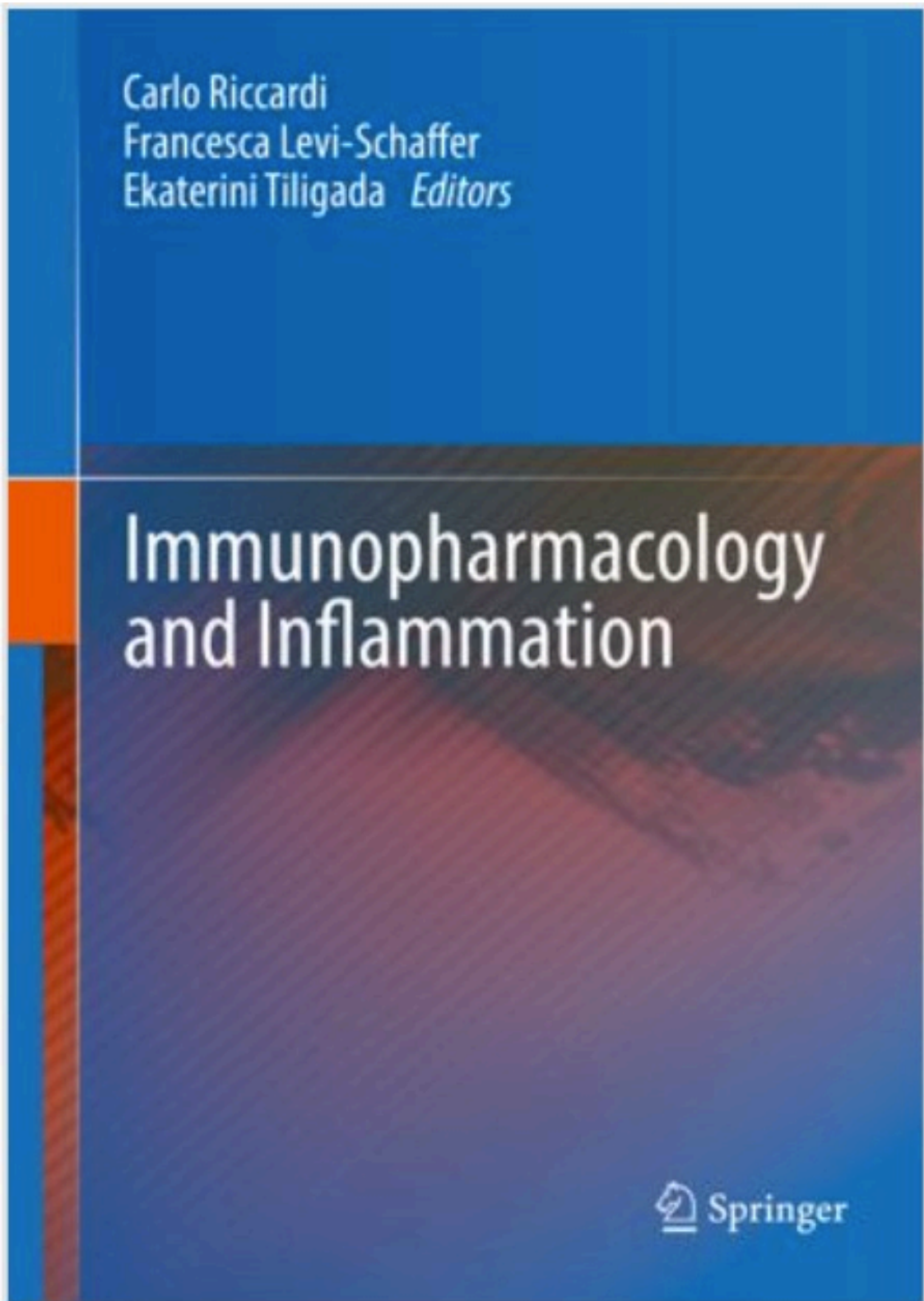
- peripheral inflammation evokes glial activation and proinflammatory cytokine expression in the CNS. *Eur. J. Neurosci.* (2004). doi:10.1111/j.1460-9568.2004.03514.x
114. Cohen, S. & Emery, P. The American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism criteria for the classification of rheumatoid arthritis: A game changer. *Arthritis and Rheumatism* (2010). doi:10.1002/art.27583
 115. Queiroz-Junior, C. M. *et al.* Experimental arthritis triggers periodontal disease in mice: involvement of TNF- α and the oral Microbiota. *J. Immunol.* (2011). doi:10.4049/jimmunol.1101195
 116. Veihelmann, A. *et al.* A novel model for the study of synovial microcirculation in the mouse knee joint in vivo. *Res. Exp. Med.* (1998). doi:10.1007/s004330050088
 117. Mestre, C., Pélissier, T., Fialip, J., Wilcox, G. & Eschalier, A. A method to perform direct transcutaneous intrathecal injection in rats. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* (1994). doi:10.1016/1056-8719(94)90087-6
 118. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* (1976). doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3
 119. Galvão, I. *et al.* The inhibition of phosphoinositide-3 kinases induce resolution of inflammation in a gout model. *Front. Pharmacol.* (2019). doi:10.3389/fphar.2018.01505
 120. Vago, J. P. *et al.* The Role and Effects of Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper in the Context of Inflammation Resolution. *J. Immunol.* (2015). doi:10.4049/jimmunol.1401722
 121. Ji, R. R., Chamesian, A. & Zhang, Y. Q. Pain regulation by non-neuronal cells and inflammation. *Science* (2016). doi:10.1126/science.aaf8924
 122. Hensellek, S., Brell, P., Schaible, H. G., Bräuer, R. & Segond von Banchet, G. The cytokine TNF α increases the proportion of DRG neurones expressing the TRPV1 receptor via the TNFR1 receptor and ERK activation. *Mol. Cell. Neurosci.* (2007). doi:10.1016/j.mcn.2007.07.010
 123. Romero-Sandoval, A., Chai, N., Natile-McMenemy, N. & DeLeo, J. A. A comparison of spinal Iba1 and GFAP expression in rodent models of acute and chronic pain. *Brain Res.* (2008). doi:10.1016/j.brainres.2008.05.004
 124. Berta, T., Qadri, Y., Tan, P. H. & Ji, R. R. Targeting dorsal root ganglia and primary sensory neurons for the treatment of chronic pain. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* (2017). doi:10.1080/14728222.2017.1328057

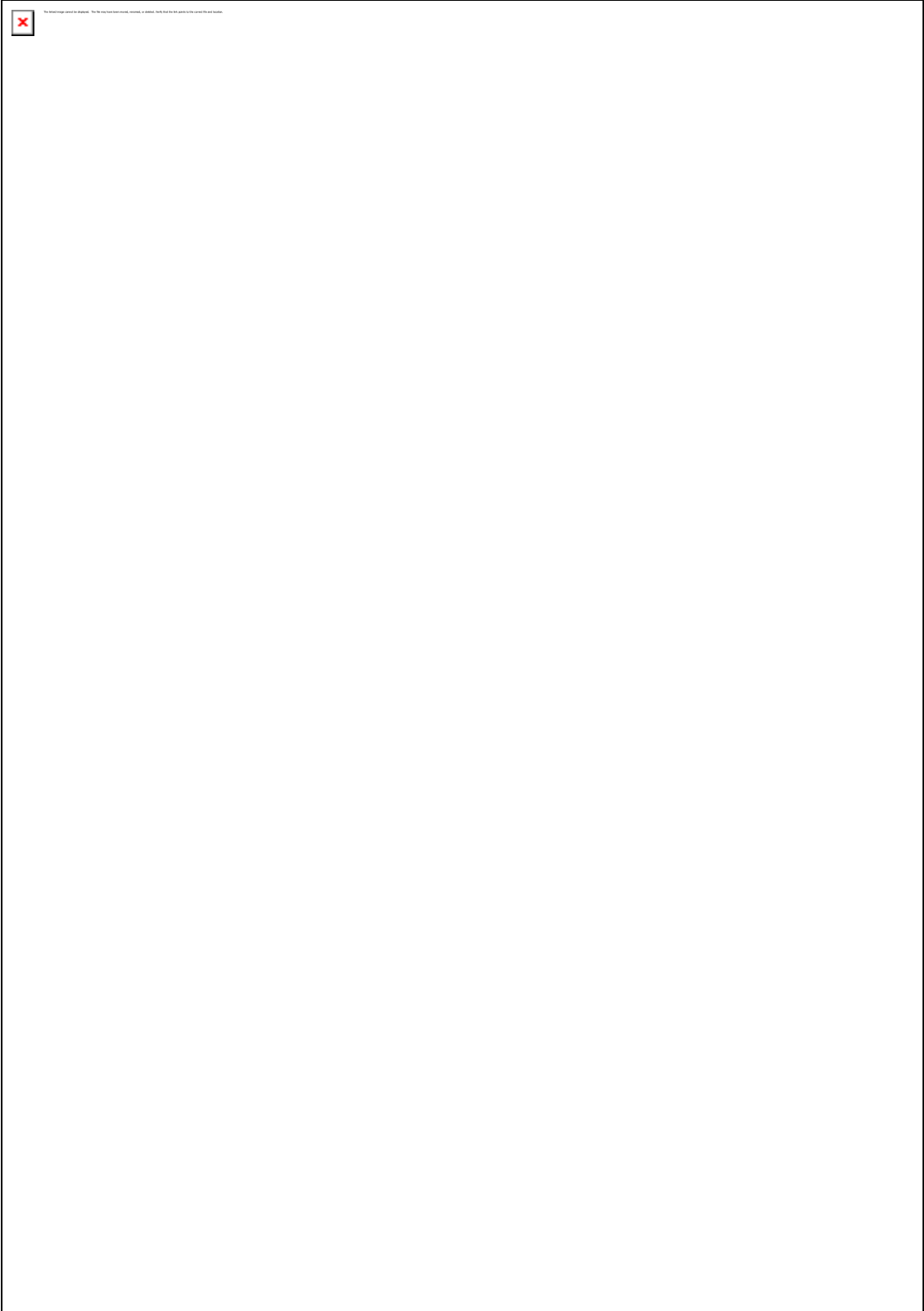
125. Jimenez-Andrade, J. M. *et al.* Vascularization of the dorsal root ganglia and peripheral nerve of the mouse: Implications for chemical-induced peripheral sensory neuropathies. *Mol. Pain* (2008). doi:10.1186/1744-8069-4-10
126. Christianson, C. A. *et al.* Characterization of the acute and persistent pain state present in K/BxN serum transfer arthritis. *Pain* (2010). doi:10.1016/j.pain.2010.07.030
127. Inglis, J. J. *et al.* The differential contribution of tumour necrosis factor to thermal and mechanical hyperalgesia during chronic inflammation. *Arthritis Res. Ther.* (2005). doi:10.1186/ar1743
128. Segond von Banchet, G. *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* (2009). doi:10.1016/j.pain.2009.06.002
129. Nieto, F. R., Clark, A. K., Grist, J., Chapman, V. & Malcangio, M. Calcitonin gene-related peptide-expressing sensory neurons and spinal microglial reactivity contribute to pain states in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheumatol.* (2015). doi:10.1002/art.39082
130. Lee, Y. C. *et al.* Pain persists in DAS28 rheumatoid arthritis remission but not in ACR/EULAR remission: A longitudinal observational study. *Arthritis Res. Ther.* (2011). doi:10.1186/ar3353
131. Lee, Y. C. *et al.* Subgrouping of patients with rheumatoid arthritis based on pain, fatigue, inflammation, and psychosocial factors. *Arthritis Rheumatol.* (2014). doi:10.1002/art.38682
132. Serhan, C. N. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature* (2014). doi:10.1038/nature13479
133. Serhan, C. N., Chiang, N. & Dalli, J. The resolution code of acute inflammation: Novel pro-resolving lipid mediators in resolution. *Seminars in Immunology* (2015). doi:10.1016/j.smim.2015.03.004
134. Serhan, C. N. *et al.* Resolution of inflammation: State of the art, definitions and terms. *FASEB Journal* (2007). doi:10.1096/fj.06-7227rev
135. Qu, L. & Caterina, M. J. Enhanced excitability and suppression of A-type K⁺ currents in joint sensory neurons in a murine model of antigen-induced arthritis. *Sci. Rep.* (2016). doi:10.1038/srep28899
136. Ghilardi, J. R. *et al.* Neuroplasticity of sensory and sympathetic nerve fibers in a mouse model of a painful arthritic joint. *Arthritis Rheum.* (2012). doi:10.1002/art.34385

137. Hunt, S. P., Pini, A. & Evan, G. Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. *Nature* (1988).
138. Gao, Y.-J. & Ji, R.-R. c-Fos or pERK, Which is a Better Marker for Neuronal Activation and Central Sensitization After Noxious Stimulation and Tissue Injury? *Open Pain J.* (2009). doi:10.2174/1876386300902010011
139. Taguchi, T., Matsuda, T., Tamura, R., Sato, J. & Mizumura, K. Muscular mechanical hyperalgesia revealed by behavioural pain test and c-Fos expression in the spinal dorsal horn after eccentric contraction in rats. *J. Physiol.* (2005). doi:10.1113/jphysiol.2004.079483
140. Harris, J. A. Using c-fos as a neural marker of pain. *Brain Research Bulletin* (1998). doi:10.1016/S0361-9230(97)00277-3
141. Pereira, A. F. *et al.* Metformin reduces c-Fos and ATF3 expression in the dorsal root ganglia and protects against oxaliplatin-induced peripheral sensory neuropathy in mice. *Neurosci. Lett.* (2019). doi:10.1016/j.neulet.2019.134378
142. Yang, Y. H. *et al.* Modulation of Inflammation and Response to Dexamethasone by Annexin 1 in Antigen-Induced Arthritis. *Arthritis Rheum.* (2004). doi:10.1002/art.20201
143. Vago, J. P. *et al.* Annexin A1 modulates natural and glucocorticoid-induced resolution of inflammation by enhancing neutrophil apoptosis. *J. Leukoc. Biol.* (2012). doi:10.1189/jlb.0112008
144. Maderna, P., Yona, S., Perretti, M. & Godson, C. Modulation of Phagocytosis of Apoptotic Neutrophils by Supernatant from Dexamethasone-Treated Macrophages and Annexin-Derived Peptide Ac 2–26 . *J. Immunol.* (2005). doi:10.4049/jimmunol.174.6.3727
145. Ebbinghaus, M. *et al.* Interleukin-17A is involved in mechanical hyperalgesia but not in the severity of murine antigen-induced arthritis. *Sci. Rep.* (2017). doi:10.1038/s41598-017-10509-5
146. Ebbinghaus, M. *et al.* Interleukin-6-dependent influence of nociceptive sensory neurons on antigen-induced arthritis. *Arthritis Res. Ther.* (2015). doi:10.1186/s13075-015-0858-0
147. Krock, E., Jurczak, A. & Svensson, C. I. Pain pathogenesis in rheumatoid arthritis—what have we learned from animal models? *Pain* (2018). doi:10.1097/j.pain.0000000000001333
148. Leisegang, S. *et al.* Primary Cultures from Rat Dorsal Root Ganglia: Responses of

- Neurons and Glial Cells to Somatosensory or Inflammatory Stimulation. *Neuroscience* (2018). doi:10.1016/j.neuroscience.2018.10.018
149. Araldi, D. *et al.* Peripheral inflammatory hyperalgesia depends on the COX increase in the dorsal root ganglion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2013). doi:10.1073/pnas.1220668110
 150. Fehrenbacher, J. C., Burkey, T. H., Nicol, G. D. & Vasko, M. R. Tumor necrosis factor α and interleukin-1 β stimulate the expression of cyclooxygenase II but do not alter prostaglandin E 2 receptor mRNA levels in cultured dorsal root ganglia cells. *Pain* (2005). doi:10.1016/j.pain.2004.09.031
 151. Morioka, N. *et al.* Nitric oxide synergistically potentiates interleukin-1 β -induced increase of cyclooxygenase-2 mRNA levels, resulting in the facilitation of substance P release from primary afferent neurons: Involvement of cGMP-independent mechanisms. *Neuropharmacology* (2002). doi:10.1016/S0028-3908(02)00143-0
 152. Inoue, A. *et al.* Interleukin-1beta induces substance P release from primary afferent neurons through the cyclooxygenase-2 system. *J. Neurochem.* (1999).
 153. Qin, X., Wan, Y. & Wang, X. CCL2 and CXCL1 trigger calcitonin gene-related peptide release by exciting primary nociceptive neurons. *J. Neurosci. Res.* (2005). doi:10.1002/jnr.20612
 154. Cao, D. L., Qian, B., Zhang, Z. J., Gao, Y. J. & Wu, X. B. Chemokine receptor CXCR2 in dorsal root ganglion contributes to the maintenance of inflammatory pain. *Brain Res. Bull.* (2016). doi:10.1016/j.brainresbull.2016.09.016
 155. Souza, G. R. *et al.* Fractalkine mediates inflammatory pain through activation of satellite glial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2013). doi:10.1073/pnas.1307445110
 156. Silva, J. R. *et al.* Neuroimmune–Glia Interactions in the Sensory Ganglia Account for the Development of Acute Herpetic Neuralgia. *J. Neurosci.* (2017). doi:10.1523/jneurosci.2233-16.2017
 157. Chen, T. *et al.* Interactions of Notch1 and TLR4 signaling pathways in DRG neurons of in vivo and in vitro models of diabetic neuropathy. *Sci. Rep.* (2017). doi:10.1038/s41598-017-15053-w
 158. Li, Y. Cell-Specific Expression and Lipopolysaccharide-Induced Regulation of Tumor Necrosis Factor (TNF) and TNF Receptors in Rat Dorsal Root Ganglion. *J. Neurosci.* (2004). doi:10.1523/jneurosci.2392-04.2004
 159. Meng, J., Wang, J., Steinhoff, M. & Dolly, J. O. TNF α induces co-trafficking of TRPV1/TRPA1 in VAMP1-containing vesicles to the plasmalemma via Munc18-

- 1/syntaxin1/SNAP-25 mediated fusion. *Sci. Rep.* (2016). doi:10.1038/srep21226
160. Bao, L. *et al.* Adjuvant-induced arthritis: IL-1 beta, IL-6 and TNF-alpha are up-regulated in the spinal cord. *Neuroreport* (2001).
161. Fernandez-Zafra, T. *et al.* Exploring the transcriptome of resident spinal microglia after collagen antibody-induced arthritis. *Pain* (2019). doi:10.1097/j.pain.0000000000001394
162. Zhang, L. *et al.* TNF-alpha contributes to spinal cord synaptic plasticity and inflammatory pain: Distinct role of TNF receptor subtypes 1 and 2. *Pain* (2011). doi:10.1016/j.pain.2010.11.014
163. Joukal, M., Klusáková, I. & Dubový, P. Direct communication of the spinal subarachnoid space with the rat dorsal root ganglia. *Ann. Anat.* (2016). doi:10.1016/j.aanat.2016.01.004
164. Jacques, S. J. *et al.* AAV8 gfp preferentially targets large diameter dorsal root ganglion neurones after both intra-dorsal root ganglion and intrathecal injection. *Mol. Cell. Neurosci.* (2012). doi:10.1016/j.mcn.2012.03.002
165. Hirakawa, H. *et al.* Regional differences in blood-nerve barrier function and tight-junction protein expression within the rat dorsal root ganglion. *Neuroreport* (2004). doi:10.1097/00001756-200403010-00004
166. Gonçalves, T. C., Benoit, E., Partiseti, M. & Servent, D. The NaV1.7 channel subtype as an antinociceptive target for spider toxins in adult dorsal root ganglia neurons. *Frontiers in Pharmacology* (2018). doi:10.3389/fphar.2018.01000
167. Parke, W. W. & Whalen, J. L. The vascular pattern of the human dorsal root ganglion and its probable bearing on a compartment syndrome. *Spine (Phila. Pa. 1976)*. (2002). doi:10.1097/00007632-200202150-00004

9. APÊNDICE



disorders, asthma, arthritis, and periodontal disease [1–4]. In this way, after elimination of the stimulus that induced inflammation, the process known as *resolution of inflammation* must dampen this first inflammatory phase and promotes some key activities to restore the homeostasis of the inflamed tissue or organ. For a long time, the resolution of inflammation has been considered a passive process, conducted by the simple removal/buffering of pro-inflammatory mediators. However, the current understanding regards this endogenous phenomenon as an *active process* [5], guided by the action of pro-resolving mediators to equilibrate and provide a physiological response [6]. To better understand which pro-resolving mediators are involved and how they act during the resolution of inflammation, it is important to emphasize the difference between anti-inflammatory and pro-resolving mediators. Anti-inflammatory mediators contrib-

ute to blocking leucocyte recruitment, as well as reducing endothelial activation and vascular permeability (Fig. 1) [2, 5, 7]. On the other hand, a pro-resolving action involves altering the progression of an established inflammatory process in a clinically relevant manner by releasing endogenous mediators, affecting either signalling cascades or cellular interactions, and acting as inflammatory switches to promote resolution [8].

According to the consensus among renowned researchers studying the resolution of inflammation, certain criteria have been established to define a mediator as a pro-resolving factor. In brief, pro-resolving mediators can induce and activate important events during resolution, including: (1) the cessation of effector leukocyte infiltration, (2) regulation of chemokine and cytokine levels, (3) switch-off of signalling pathways associated with leukocyte survival and the induction of apoptosis, (4) induction of apoptotic neutrophil effero-

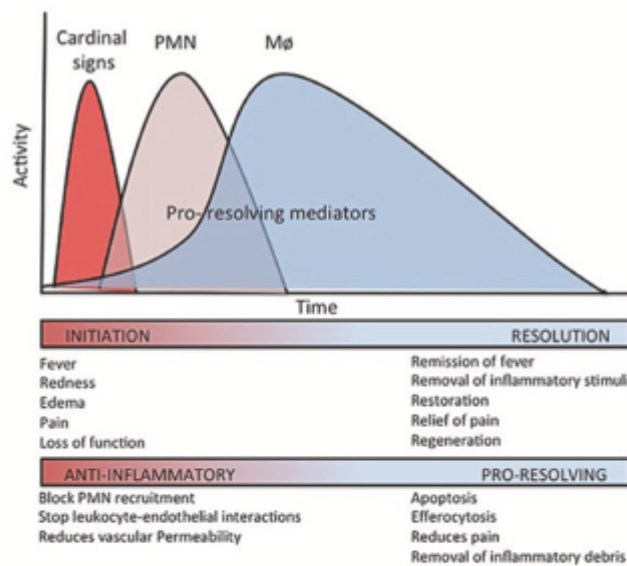


Fig. 1 The inflammatory process. At the onset of acute inflammation, cardinal signs occur (fever, redness, oedema, pain, and loss of function). Polymorphonuclear cells (PMNs) are among the first responders during an acute inflammatory response, followed by macrophages. The first cellular hallmark of tissue resolution is an anti-inflammatory response that blocks additional PMN recruitment. The resolution phase is an active process

involving the removal of inflammatory stimuli and improvement of cardinal signs, and the return to homeostasis. This occurs due to pro-resolving actions such as apoptosis, efferocytosis, and the removal of inflammatory debris. Inadequate or insufficient resolution results in chronic inflammation, excessive tissue damage, and dysregulation of tissue healing, which can lead to fibrosis and loss of function

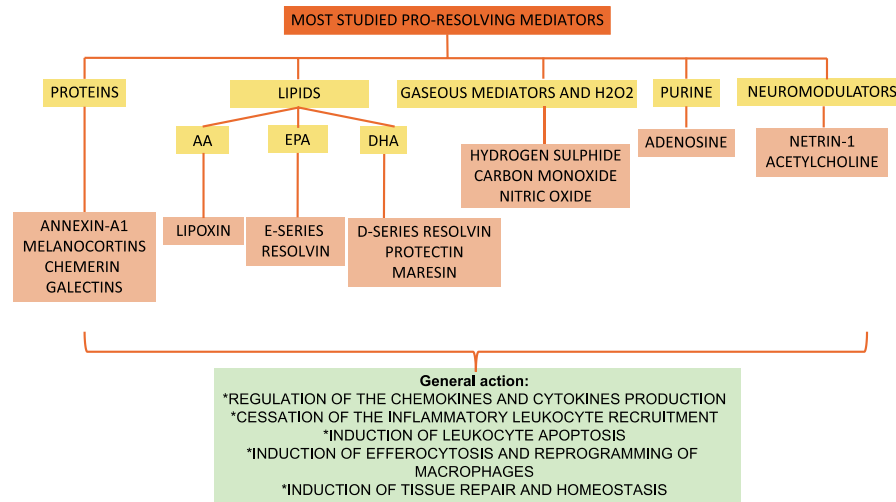


Fig. 2 The pro-resolving mediators: The pro-resolving molecules activate intracellular pathways that terminate inflammation and promote the restoration of homeostasis in damaged tissues by regulation of the chemokines and cytokines production, cessation of the inflammatory leukocyte recruitment, induction of leukocyte apoptosis,

induction of efferocytosis and reprogramming of macrophages. Among the diversity of molecules that comprise this endogenous system, this figure will introduce bioactive lipids, proteins and peptides, gaseous mediators, purines, neuromodulators, and reactive oxygen species (ROS)

cytosis by macrophages, (5) reprogramming of macrophages from classically activated to alternatively activated, and (6) stimulating the production of anti-inflammatory mediators for tissue repair and regeneration [2, 9–14] (Fig. 2).

This *active process* guided by pro-resolving mediators has two important implications, according to the perspective of Perretti and colleagues in the review “*Immune resolution mechanisms in inflammatory arthritis*” published in 2017 [15]. First, chronic inflammation could result from inadequate resolution rather than an exacerbated response during the pro-inflammatory phase. Second, the emerging pathways and molecules that govern the resolution processes create interesting therapeutic possibilities to manage chronic inflammatory diseases. The latter implication subverts the current management of inflammatory diseases that mainly focus on the pharmacological inhibition of key pro-inflammatory mediators [16], and provides new insight to pharmacological-based modulation of resolution activity through endogenous resolving mediators [10].

As such, emerging classes of pro-resolving mediators have been shown to be associated with the initiation and orchestration of the resolution of inflammation. These molecules activate intracellular pathways that terminate inflammation and subsequently promote the restoration of homeostasis in damaged tissues [17]. Among the diversity of molecules that comprise this endogenous system, this chapter will introduce bioactive lipids, proteins and peptides, gaseous mediators, purines, neuromodulators, and reactive oxygen species (ROS) [2, 10, 18] (Fig. 2). Next, the roles of these major pro-resolving molecules in the context of resolution of inflammation will be discussed.

2 Pro-resolving Mediators

2.1 Bioactive Lipids

During adverse conditions, such as tissue injury or pathogen invasion, essential polyunsaturated fatty acids (PUFAs) are released from the phos-

pholipids of cell membranes and used to synthesize inflammatory mediators that trigger vascular and cellular events to the inciting stimulus [19, 20]. However, during inflammation the synthesis of PUFA-derived pro-inflammatory mediators switches to the synthesis of PUFA-derived pro-resolving mediators, namely specialized resolving mediators (SPMs), resulting in the activation of the resolution program [3, 22, 23, 273, 405]. These SPMs are formed by biosynthetic pathways that convert the essential PUFA arachidonic acid (AA) to lipoxins (LXs) [24, 25], omega-3-derived eicosapentaenoic acid (EPA) to E-series resolvins, as well as docosahexaenoic acid (DHA) to D-series resolvins, protectins [52, 405] and maresins [21].

Next, we will discuss the synthesis, mainly cellular sources and receptors of pro-resolving mediators, as well as some examples of how these molecules push on resolution process.

2.1.1 Lipid Mediators Derived from Arachidonic Acid (AA): Lipoxins

At the onset of inflammation, the enzymatic conversion of AA is initiated to synthesize several lipid mediators, such as leukotrienes, prostaglandins, and thromboxanes [2]. These eicosanoids elicit pro-inflammatory activities, resulting from an increase in vascular permeability and leucocyte recruitment [2].

Lipoxygenase-*in*teracting products, or lipoxins, are unique compared to pro-inflammatory eicosanoids, and are the first bioactive lipids proven to have anti-inflammatory and pro-resolving activities [404]. Their production by lipoxygenase (LO)-dependent biosynthetic pathways occurs in different cellular types and requires a sequence of steps (for more details, see Serhan [404]). In macrophages, dendritic cells (DCs), epithelial cells, eosinophils and monocytes; [28–30, 404], AA is converted (by the oxygenation of AA in the C15 position) to 15-HpETE through 15-lipoxygenase (15-LO) action. In leucocytes, 5-LO transforms this compound to DIH(p)ETE, and subsequently to 5(6)-epoxytet-

raene [24, 30, 31, 404]. Lastly, specific hydro-lases catalyse the step to form lipoxin A₄ (LXA₄) or its positional isomer lipoxin B₄ (LXB₄) [31, 404].

The interaction between neutrophils and platelets provide another mechanism of lipoxin synthesis. In summary, leukotriene A₄ (LTA₄) derived from 5-LO-AA-dependent conversion in neutrophils serves as the substrate to the 12-LO to produce LXA₄ and B₄ in platelets [32–34, 402, 404]. Cyclooxygenase 2 (COX-2) acetylation by aspirin, which leads to the inhibition of PG and TX synthesis, also promotes the conversion of AA to 15R-HETE in endothelial cells. Likewise, this intermediate can also be synthesized by cytochrome P450 enzymes [36, 37]. Subsequently, 5-LO acts on 15R-HETE to form 15-*epi*-lipoxins (A₄ or B₄; aspirin-triggered LX (ATL) [30, 31, 35, 37, 404].

The reported pro-resolving effect of LXs and ATLs (as well as annexin A1 (AnxA1) is mediated through the activation of the formyl peptide receptor 2 (FPR2; also known as the lipoxin A₄ receptor (ALX) [38]. The FPR2/ALX receptor, a member of the formyl peptide receptor family (FPR), is a promiscuous G protein-coupled receptor that is activated by lipids and peptides, triggering distinct ligand-dependent signalling pathways [31, 39, 40]. FPR2/ALX detection has been reported in several cell types, such as neutrophils, monocytes, macrophages, eosinophils, T cells, epithelial cells, and fibroblasts [38, 41–47].

The FPR2/ALX as an emergent master receptor of inflammation resolution [403]. This concept could raise new promising perspectives in the development of FPR2/ALX-mediated resolution agonists for pharmacological modulation of several inflammatory conditions [48, 403].

For example, in mice LX-activated FPR2/ALX were found to regulate inflammatory mediators and stimulate IL-10 production [48]. A summary of important pro-resolving responses in generated by LX-activated FPR2/ALX during experimental models as well in human cells are provided in Table 1.

Table 1 Main pro-resolving actions of Lipoxins related to resolution of inflammation

Bioactive lipids	Action	Disease or experimental model	References
Lipoxins (Lxs)	Reduce inflammation-induced pain	Carrageenan-induced hyperalgesia	[233]
	Decrease the number of neutrophils or their infiltration	Monocyte/neutrophil culture; Dermal inflammation; Human skin blister; Peritonitis induced by Zymosan; Skin ulcers	[234] [384] [235] [236] [237]
	Decrease eosinophil infiltration	Human eosinophils culture	[238]
	Stimulate the expression of anti-inflammatory and pro-resolution genes	Human neutrophils culture	[239]
	Decrease inflammatory mediators	Synovial fibroblasts culture; Skin ulcers; Murine air pouches; Ischemia and reperfusion; Leukocytes culture	[240] [385] [47] [48] [237]
	Decrease leucocytes, degranulation from mast cells and eosinophils, and promote a protective effect in the different strati of the airway	Mice allergic inflammation	[241]
	Stimulate IL-10 production	Ischemia and reperfusion	[48]
	Increase noninflammatory monocyte infiltration	Human monocytes culture	[386]
	Stimulate efferocytosis	Human monocytes and neutrophils culture	[242] [243] [244]
	Demonstrate a protective role	Human bronchial epithelial cell culture; Supplementation of transgenic rabbits	[245] [387]
	Lipoxin A4 analogue (BML-111)	The lipoxin A4 analogue decreases pro-inflammatory cytokines, increases microglial/macrophage cell populations and protects against neuroinflammation	Neuroinflammation after ischemic stroke

2.1.2 Lipid Mediators Derived from Omega-3 Fatty Acids

Lipid Mediators Derived from Eicosapentaenoic Acid (EPA): E-Series Resolvins

E-series resolvins (resolution phase interaction products, Rv) are bioactive lipids derived from EPA [405]. Both EPA and DHA are PUFAs obtained from the diet (eg. from fish oils), as the human body cannot produce them naturally [22, 49, 50]. EPA-derived SPMs were the first mediators identified in inflammatory exudate, and their resolving action includes the decrease of leukocyte recruitment and decrease in the magnitude of inflammatory responses (refer to [51, 405]). The E-series resolvins family consists of RvE1, RvE2 and RvE3 [50]. The synthesis of these mediators involves EPA conversion by acetylated

COX-2 to 18(R) hydroxyEPA (18(R)HEPE) in endothelial cells from the vasculature, and subsequent conversion to RvE3 due to the action of 15-LO in leukocytes [30, 52, 53, 55, 56, 58] or to RvE1 and RvE2 by 5-LO in leukocytes [26, 30, 50, 51, 53, 57, 58]. Cytochrome P450 also converts EPA to 18(R)HEPE [50, 53, 407]. Several authors have demonstrated that the expression of biosynthetic enzymes responsible for RvE generation lead to low RvE levels in normal tissue, and increased levels during acute inflammation [50, 59–62]. These described pathways have been observed in neutrophils to produce RvE1 and RvE2 [63], and in eosinophils to produce RvE3 [55, 56].

The pro-resolving and anti-inflammatory effects of RvE1 and RvE2 are mediated by calcitonin gene-related peptide (CGRP) chemerin receptor 23 (Chem23), also called chemokine-like

receptor 1 (CMKLR1) and leukotriene B₄ (LTB₄) receptor (BLT1) [3, 30, 54, 64, 65]. However, RvE1 is a partial agonist to BLT1, and RvE2, a partial agonist to Chem23 [3]. Isobe et al. [406] suggest that there might be a high-affinity receptor to RvE3 in neutrophils because, although RvE3 presents an inhibitory effect in neutrophil chemotaxis, its interaction with BLT1 does not explain this effect [56]. Thus, it is necessary to identify the receptor mediating the effects of RvE3.

Both receptors, Chem23 and BLT1, have been detected in several tissues and cell types. Chem23 is found in the testis, prostate, heart, aorta, liver, kidney, liver, lung, brain, and gastrointestinal organs [51]. Moreover, this receptor has been detected in monocytes, macrophages, microglia, neurons of the dorsal root ganglia (DRG), DCs, CD4⁺ lymphocytes, natural killer cells, platelets, intestinal epithelial cells, as well as endothelial and vascular smooth muscle cells [50, 64, 66–69, 406]. The BLT1 receptor is expressed in eosino-

phils, neutrophils, monocytes, and T cells [50, 54, 70].

Important pro-resolving actions that occur following signal transduction induced by RvE receptor activation during experimental models as well in human cells, for example, the neutrophil resolvin E1 promotes phagocytosis or efferocytosis in type 2 diabetes in mice, and elevates anti-inflammatory mediators [71]. Others pro-resolving actions are described in Table 2.

Lipid Mediators Derived from Docosahexaenoic Acid (DHA): D-Series Resolvins, Protectins and Maresins

DHA is a precursor in the synthesis of D-series resolvins, protectins, and maresins [72, 405]. The anti-inflammatory, pro-resolving, and protective roles of these emerging mediators has increased interest for the development of new pharmacological strategies to treat many inflammatory

Table 2 Main pro-resolving actions of Resolvin E related to resolution of inflammation

Bioactive lipids	Action	Disease or experimental model	References
4Resolvin E (RvE)	Correlates with reduced pain and neuronal sensitivity	Arthritis; Dorsal root ganglia neuron culture	[247] [248]
	Reduces neutrophil infiltration or its accumulation	Human neutrophil culture; Murine peritonitis; Murine dorsal air pouch; Corneal HSV (Herpes simplex virus) infection	[249] [53] [251] [63] [392]
	Diminishes the expression of pro-inflammatory mediators or their gene expression	Human neutrophils culture; Murine peritonitis; Murine dorsal air pouch; Corneal HSV infection; Allergen-initiated respiratory inflammation; Microglial cells culture; Suture-induced inflammatory corneal angiogenesis; Periodontitis	[63] [251] [393] [252] [394] [428]
	Elevates anti-inflammatory mediators	Corneal HSV infection	[251]
	Promotes phagocytosis or efferocytosis	Human neutrophils culture; Murine peritonitis; Murine dorsal pouch; Murine acute lung injury; Dorsal air pouch	[7] [396] [63] [253] [71]
	Plays a protective role	Ligature-induced periodontitis; P. gingivalis- induced periodontitis; Bronchial asthma; Experimental diet-induced atherosclerosis	[254, 255] [256] [257] [258]
	Prevents platelet aggregation	Human fresh venous blood	[259]

conditions [403]. Below, a brief review regarding the main features of these important DHA-derived SPMs will be explored.

D-Series Resolvins (RvDs)

Sequential lipoxygenase-dependent reactions are required to synthesize DHA-derived resolvins (D-series). This bioactive lipid group is composed of RvD1, RvD2, RvD3, RvD4, RvD5 and RvD6. For their endogenous synthesis, the first reaction is catalysed by 15-LO to form 17-(S) HpDHA from DHA. This product undergoes subsequent reactions catalysed by either 15-LO or 5-LO. First, the 17-(S) HpDHA is oxygenated in the C7 position, producing RvD5 or a 7S-8S-epoxide precursor. The 7S-8S-epoxide is then converted to RvD1 and RvD2 by enzymatic hydrolysis. Second, 17-(S) HpDHA is oxygenated in the C4 position, producing RvD6 or a 4,5-epoxi precursor. Moreover, in the presence of acetylated COX-2, the DHA conversion generates 17-(R) HpDHA, followed by the formation of RvD positional isomers (AT-RvD1-6) via 5-LO (for more details, refer to [30, 51, 73]). The biosynthesis of some RvDs has been shown to occur in inflammatory exudates and in a murine model of ischemic stroke [52, 75, 76], as well as in human glial cells, neutrophils, and whole blood samples [75, 97]. More recently, RvD1, RvD3, and RvD5 were found to be present in the synovial fluid from arthritic patients [77, 78], similar to other SPMs (for more details, refer to [15]). In addition, Chatterjee et al. [79] demonstrated that in human intact arteries incubated with DHA, saphenous vein endothelial cells and vascular smooth muscle cells can also produce RvDs.

Evidence from that literature has supported that the RvD1 receptor (DRV1/GPR32), DRV2/GPR18 and FPR2/ALX CGRP receptors can be activated by RvDs. DRV1/GPR32 has been detected in monocytes and neutrophils [80, 81] and is activated by RvD1 [3, 15, 51, 57, 80, 81, 82], RvD3, and RvD5 [3, 50, 83, 84]. DRV2/GPR18 expressed in neutrophils, monocytes, and macrophages [4, 85], is activated by RvD2 [15, 51, 81]. The interaction between DRV2/GPR18 and RvD2 has been confirmed in several trans-

genic mouse studies [3, 85–87]. Activation of the FPR2/ALX-mediated pro-resolving effect is initiated by RvD1 [3, 15, 50, 80]. The specific receptor involved in RvD4 and RvD6 signal transduction that triggers the pro-resolving effect remains to be discovered [50]. In Table 3, important pro-resolving effects of RvDs during experimental models as well in human cells have been described.

Protectins (PDs)

As suggested by the name, protectins (docosatrienes derived from DHA) are SPMs that present with not only pro-resolving features but also protective properties [76, 88, 89, 405]. Frequently identified in the neuronal system, this DHA-derived lipid exerts beneficial protection at this location [76, 88–90, 405]. Moreover, as expected, PDs play an important role in controlling the duration and magnitude of inflammatory responses [51, 91].

The first enzymatic reaction of protectin synthesis is the 15-LO-dependent conversion of DHA into 17-(S) HpDHA. Next, this intermediate undergoes enzymatic epoxidation, forming 16,(17)-epoxy-docosatriene, which is then hydrolysed to produce PDs [51, 73, 88]. From this biosynthetic pathway, two bioactive lipids, PD1 and PD2, can be formed [92].

Originally identified in murine brain cells and human microglial cells [52], PD1 (10,17(S) docosatriene) is termed *neuroprotectin* when detected in neuronal tissue [73, 88, 405]. However, PD1 is reported to be synthesized in murine exudate, brain and, human airways, microglial cells and retinal pigment epithelium, as well as in monocyte and CD4⁺ T cells, neutrophils, and eosinophils [52, 55, 74, 76, 88, 89, 93, 94, 95]. Furthermore, omega-3 fatty acid supplementation has been shown to increase protectin levels in rat placenta [96].

PD1 is related to the promotion of several pro-resolving responses by affecting various cell types [51, 73]. For example, PD1 stimulates the phagocytosis of apoptotic cells by macrophages [7], and reduces cytokine production by glial cells [97], in addition to helping protect retinal pigment epithelium [89] and triggering a response

Table 3 Main pro-resolving actions of Resolvin D related to resolution of inflammation

Bioactive lipids	Action	Disease or experimental model	References
Resolvin D (RvD)	Presents antinociceptive action or decrease in allodynia	Complete Freund's adjuvant (CFA) induced hind paw inflammation; CFA-induced inflammatory pain and arthritis; Chronic pancreatitis-induced chronic pain	[260] [261] [262] [263]
	Limits or blocks neutrophil migration	Peritonitis; Murine zymosan-initiated peritonitis; Neutrophils and monocytes culture; Lung infection	[395] [85] [429]
	Decreases pro-inflammatory mediators or their gene expression	Mpp+- Induced Parkinson Disease in vitro; Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis; Chronic pancreatitis-induced chronic pain; Human monocytes and macrophages culture; Streptozotocin (STZ)- induced diabetic retinopathy; Microglial cells culture; Abdominal aortic aneurysm	[264] [261] [265] [266] [267] [252] [397]
	Increases the anti-inflammatory mediators	Human monocytes and macrophages culture	[265]
	Increases M2 macrophages	Human monocytes and macrophages culture; Abdominal aortic aneurysm	[265] [397]
	Stimulates macrophage phagocytosis or efferocytosis	Microbial- initiated peritonitis; Murine dorsal skin pouches; Neutrophils and monocytes culture; Peritonitis; Ischemia reperfusion injury; Cecal ligation and puncture;	[84] [80] [83, 395] [4] [85]
	Presents a protective role	Murine Zymosan- initiated peritonitis; Neutrophils and monocytes culture; Cecal ligation and puncture; STZ-induced diabetic retinopathy	[85] [4] [267]

in eosinophils [95] and T cells [98]. Moreover, Marcheselli et al. [74] have demonstrated that PD1 binds with a high affinity at the neutrophil surface. However, a specific PD1 receptor is not well known [99], and a detailed characterization needs to be elucidated [81]. The protective, anti-inflammatory, and pro-resolving actions of protectin during experimental models as well in human cells have been shown in Table 4.

Maresins (MaRs)

Maresins (**mac**rophage mediators in **res**olving **in**flammation; MaRs) are macrophage-derived resolution mediators with pro-resolving, anti-inflammatory, and regenerative roles [81, 83, 100, 101, 409]. The main cellular source of these particular DHA-derived SPMs are macrophages [3, 15, 57, 99, 101, 409]. Moreover, Abdulnour et al. have demonstrated that MaR1, a MaR family member, can originate from platelet/neutrophil interactions [102].

The biosynthetic pathway to MaR generation incorporates 12-LOX-dependent lipoxygenation of DHA, yielding the 14-(S) HpDHA precursor [57, 26]. This product undergoes subsequent oxygenation at the omega-1 position to produce MaR3, or is converted to 13S,14S-epoxy-maresin following soluble epoxy hydrolase action to generate MaR1 or MaR2 [83, 101, 410]. MaR1 synthesis can also occur via platelet/neutrophil interactions in the vasculature [102]. This biosynthetic pathway begins in the platelets, with 12-LOX-dependent production of 13S,14S-epoxy-maresin from DHA, and finishes with MaR1 production in neutrophils [102]. Hong et al. also identified the production of maresin-like (L)1 and maresin-L2 via platelets and/or leukocytes [103]. Of note, the 13S,14S-epoxy-maresin intermediate also contributes to potent pro-resolving mechanisms—for example, blocking the hydrolase that synthesizes LTB₄ [410].

Table 4 Main pro-resolving actions of protectins related to resolution of inflammation

Bioactive lipid	Action	Disease or experimental model	References
Protectins (PDs)	Improve pain	Acute and persistent inflammatory pain induced by CFA or formalin	[268]
	Inhibit neutrophil infiltrate	Middle cerebral artery occlusion and reperfusion; Human neural progenitor cells in primary culture; Murine peritonitis; Kidney ischemia/ reperfusion model	[76] [269] [270] [408]
	Prevent eosinophil recruitment	Allergen-initiated respiratory inflammation	[95]
	Decrease pro-inflammatory mediators or their gene expression	Middle cerebral artery occlusion and reperfusion; Human neural progenitor cells in primary culture; Murine peritonitis; Allergen-initiated respiratory inflammation; Concanavalin A- induced hepatitis; Corneal HSV infection; Human T cells culture; Murine peritonitis	[52] [98] [269] [95] [76] [250] [271]
	Increase anti-inflammatory IL-10	Corneal HSV infection; diabetes mouse model	[430] [103]
	Increase macrophage efferocytosis	Leukocytes cell culture	[408]
	Stimulate tissue protection, specifically neuroprotection	Middle cerebral artery occlusion and reperfusion; Human neural progenitor cells in primary culture; Ischemia-reperfusion model; Alzheimer disease; Human ARPE-19 cell culture; Kidney ischemia/reperfusion model; Allergen-initiated respiratory inflammation; Transient middle cerebral artery model (experimental stroke); Human retinal pigment epithelial	[76] [89] [90] [270] [95, 398], [272], [399, 400]

All three MaR family members can stimulate anti-inflammatory and pro-resolving responses at low-range levels [104], including several effects that benefit tissue regeneration, healing, and pain [22, 57, 100]. Nevertheless, there is no mention concerning which specific receptor is activated by MaRs [99]. The pro-resolving effects of MaRs during experimental models as well in human cells can be seen in Table 5.

2.2 Proteins and Peptides

2.2.1 Annexin A1

In the 1980s, many researchers studied the mechanisms of inflammatory response reduction mediated by glucocorticoids (GCs). They found that the inhibition of AA release following GC treatment was dependent on the production of an inhibitory protein that was first named lipocortin-1

[105]. This protein, today known as annexin A1 (AnxA1), is a 37-kDa calcium-dependent phospholipid-binding protein that belongs to the annexin protein superfamily [1, 105].

AnxA1 is expressed in various cell types, including epithelial cells (gut, lung, and skin) [106, 107], endothelial cells [108], synoviocytes [109], fibroblasts [27, 110, 111], and skeletal muscle [112], as well as neutrophils, monocytes, mast cells, and macrophages [107, 113, 114]. AnxA1 is also present in biological fluids such as seminal fluid and plasma [115]. In resting cells that can produce AnxA1, there are elevated cytoplasmic levels of AnxA1 that can be quickly externalized and/or secreted following activation. Cellular activation causes the relocation of AnxA1 to the outside of the plasma membrane in a calcium-dependent manner. The increase in extracellular Ca^{2+} can also change the conformation of AnxA1, resulting in its activation [114].

Table 5 Main pro-resolving actions of maresins related to resolution of inflammation

Bioactive lipids	Action	Disease or experimental model	References
Maresins (MaRs)	Diminish inflammatory pain	Capsaicin- induced spontaneous pain	[100]
	Limit neutrophil chemotaxis, adhesion or infiltration	Ischemia-reperfusion; Peritonitis	[100] [101] [411]
	Stimulate efferocytosis or phagocytosis. Enhance Kupffer cell phagocytic capacity*.	Zymosan-induced peritonitis; <i>Escherichia coli</i> - induced peritonitis; Ischemia- reperfusion; Obesity-induced nonalcoholic fatty liver disease	[401] [100] [411] [101] [274, 275]
	Increase regulatory T cells and decrease the production of IL-5 and IL-13	Allergic inflammation	[276]
	Promote regeneration or healing	Planaria fluorescent lectin-conjugated stainin; Ischemia-reperfusion	[100] [411]
	Induce macrophage polarization towards an M2 phenotype	Genetic (<i>ob/ob</i>) obese mice	[277]
	Revert pro-inflammatory cells and pro-fibrotic effects induced by high glucose in mouse glomerular mesangial cells	Mouse glomerular mesangial cell culture	[278]
	Enhance platelet aggregation and spreading, and suppress the release of pro-inflammatory and prothrombotic mediators. These are important events for the resolution of inflammation in cardiovascular diseases	Human platelets spreading	[279]
	Prevent atheroprogession, suggesting that MaR1 represents an innovative strategy to resolve arterial inflammation	High-fat diet	[280]

After transport to the extracellular space, AnxA1 interacts with its receptor, FPR2/ALX (already been detailed in the section “Bioactive lipids”), and can exert autocrine, paracrine, or juxtacrine effects [92, 114, 116].

The AnxA1 pathway is modulated by GCs that have overlapping activities in the regulation of inflammatory responses. GCs induce ANXA1 gene expression and stimulate the release of protein to the extracellular medium [117]. An increase in FPR2/ALX expression occurs 12–24 h after human monocyte incubation with dexamethasone or other synthetic glucocorticoids [118].

In this context, AnxA1 has emerged as a potent pro-resolving mediator, regulating the inflammatory response through a variety of methods, such as the modulation of pro-inflammatory mediator production, as well as stimulating the release of immunosuppressive and pro-resolving molecules [2, 412]. In Table 6, the pro-resolving

effects of annexin-A1 during experimental models as well in human cells are described in detail.

2.2.2 Melanocortins

Melanocortins, which include adrenocorticotrophic hormone (ACTH), α -melanocyte-stimulating hormone (α -MSH), β -MSH, and γ -MSH, are peptides derived from the cleavage of pro-opiomelanocortin (POMC) [119–121]. POMC is mainly found in the central nervous system, but is also present in smaller amounts at other sites, including the skin, spleen, lungs, gastrointestinal tract, genitourinary tract, adrenal gland, thyroid gland, and immune cells (such as lymphocytes and monocytes) [119, 120, 122].

There are five transmembrane G protein-coupled receptors related to the activation of the melanocortin pathway (abbreviated MC1R to MC5R). All melanocortin peptides can bind to MC1R, MC3R, MC4R and MC5R, but with varying affinities. On the other hand, the MC2

Table 6 Main pro-resolving actions of Annexin-A1 related to resolution of inflammation

Protein	Action	Disease or experimental model	References
Annexin-A1	Inhibits neutrophil recruitment	Zymosan-induced neutrophil rolling, adhesion, and emigration model; Human neutrophils cell culture; Peripheral blood PMN cell culture; Murine air-pouch; Murine peritonitis; Murine ischemia reperfusion; Human umbilical vein endothelial cells culture; Skin edema induced by fMLF; Paw edema induced by carrageenan	[281] [282] [283] [284] [92] [285]
	Induces apoptosis of inflammatory cells	Rat pheochromocytoma (PC12) cells culture; Rat thymocytes culture; Rat pheochromocytoma cell culture; U937 cell culture; Mammary glands of adult rats; BZR cell culture; Human PMN cell culture; LPS-induced pleurisy model	[286] [287] [288] [289] [290] [117] [219, 388]
	Stimulates efferocytosis of apoptotic neutrophils by macrophages	Human monocyte-derived macrophages (Mphi) cell culture; Mice Bone Marrow derivated macrophage cell culture; LPS-induced pleurisy model	[291] [292] [388]
	Elevates cAMP, which in turn stimulates the pro-apoptotic program in neutrophils, leading to the resolution of inflammation	Human neutrophils cell culture; pleurisy model	[232]
	Induces macrophage reprogramming	Jurkat and THP-1 cells culture; Human Primary Neutrophils and Monocytes cell culture; HEK 293 cell culture; Nonalcoholic steatohepatitis in mice	[293] [116] [302] [413]
	Inhibits the inducible nitric oxide synthase (iNOS) enzyme	Nonalcoholic steatohepatitis in mice; Microglial secondary culture	[294] [295]
	Stimulates IL-10 release ^{1,2} and inhibits nitric oxide synthesis ¹	Macrophage (J774) cell line culture; Murine intestinal ischemia and reperfusion	¹ [296] ² [48]
	Reduces cerebral microvascular dysfunction and tissue injury associated with middle cerebral artery occlusion and reperfusion by the reduction of pro-inflammatory cytokine levels, rolling and cell adhesion and attenuation of the infarct volume	Middle cerebral artery occlusion and reperfusion	[297]
	Contributes to the process of the healing of gastric mucosal damage	Gastric mucosal injury	[298]
	Regulates bleomycin-induced lung fibrosis and inflammation	Bleomycin-induced lung fibrosis model	[299]

Table 6 (continued)

Protein	Action	Disease or experimental model	References
Annexin-A1	Contributes to skeletal muscle tissue regeneration	Mouse myoblast cell culture and In vitro Wound-healing Assay	[391]
	Contributes to the resolution of cerebral inflammation in sepsis, reducing rolling and adhesion leucocytes in cerebral venules	Murine model of endotoxin-induced cerebral inflammation by intraperitoneal injection of LPS	[300]
	Binding to a novel intestinal epithelial FPR promotes mucosal wound repair by the activation of focal adhesion kinase and paxillin	Human intestinal epithelial cells culture, mechanical colonic mucosal wounds in mice by colonoscopy and culture of human intestinal cell of patients with ulcerative colitis	[301]
	Release of AnxA1 by hepatic macrophages modulates hepatic inflammation and fibrogenesis during nonalcoholic steatohepatitis progression.	1. Murine model of nonalcoholic steatohepatitis	[302]
	Reduces atherosclerotic plaque formation.	Western Type Diet in LDLR ^{-/-} mice and intraperitoneal injection of Human recombinant annexin A1 (hr-anxA1)	[303]
	Promotes timely resolution of inflammation in murine gout by reducing neutrophil influx, IL-1 β and CXCL1 production in the periarticular joint, hypernociception and improving articular injury.	2. Murine model of acute gout	[304]
	Contributes to the resolution of inflammatory responses during <i>Leishmania braziliensis</i> infection.	<i>L. braziliensis</i> -infected BALB/c mice	[228]

receptor interacts only with ACTH [119, 120, 122, 123]. The melanocortin 1 receptor (MC1R) participates in skin and hair pigmentation, and contributes to immune cell regulation [124]. This receptor is considered the classical melanocyte α -MSH receptor and is expressed by fibroblasts, cutaneous melanocytes, keratinocytes, endothelial cells, and antigen-presenting cells. Monocytes, macrophages, neutrophils, mast cells, fibroblasts, DCs, astrocytes, and microglia also express MC1R, contributing to the immune system regulation realized by melanocortins [122, 414]. MC2R is expressed in the zona reticularis and zona fasciculata of the adrenal gland, and interacts only with ACTH in this organ, controlling the synthesis and release of GCs [122, 415]. This receptor was also found in adipose tissue, likely mediating stress-induced lipolysis in response to ACTH [125]. MC3R is expressed in the central nervous system (CNS) and in several peripheral tissues such as the placenta, gastrointestinal tract, and heart, as well as in human

monocytes and murine peritoneal macrophages [119, 122, 126, 127]. This receptor also participates in immune system regulation [128]. MC4R is expressed mainly in the CNS. MC4R contributes to hunger control, pain, and sexual health [129, 416–418]. MC5R is expressed in many locations, such as the adrenal gland, adipocytes, and leucocytes (including B and T-lymphocytes), and can regulate lipid metabolism, exocrine function, and inflammatory activity [122, 123, 126].

The exact role of melanocortins in the resolution of inflammation remains unclear, but many achievements have demonstrated significant anti-inflammatory and immunomodulatory properties of melanocortins during experimental models as well in human cells as seen in Table 7.

2.2.3 Chemerin Peptides

Chemerin is a protein that was discovered and described in 2003 as a natural ligand for chemokine-like receptor 1 (CMKLR1 or chemR23), an orphan G protein-coupled recep-

Table 7 Main pro-resolving actions of Melanocortins related to resolution of inflammation

Protein	Action	Disease or experimental model	References
Melanocortins	Reduce pro-inflammatory cytokines, including IL-1, IL-8, IL-6, TNF- α , IFN- γ , and IL-17	Lymph Node T cell culture; Myocardial infarction; Rheumatic disorders; Endotoxemia; HIV infection; TNF-alpha activated human C-20/A4 chondrocytes culture; Urate crystal-induced monocyte activation and neutrophil responses in vitro; Peripheral blood mononuclear cells human culture; Psoriasis-like skin inflammation	[305] [306] [307] [308] [309] [310] [311]
	Increase the levels of anti-inflammatory cytokines such as IL-10 and TGF- β	Human monocytes culture; T cell culture; Macrophage-like RAW 264.7 cells culture; TNF-alpha activated human C-20/A4 chondrocytes culture	[389] [313] [314] [310]
	Inhibit the CD86 ^{1,2} and CD40 ² co-stimulatory receptors	Human monocytes culture; Human peripheral blood-derived monocytes and dendritic cells culture	¹ [312] ² [315]
	Inhibit NF-kappaB activation, which reduces pro-inflammatory mediators	Macrophage-like RAW 264.7 cells culture; U937 cell culture; Human melanocytes and melanoma cells	[316] [317] [314]
	Inhibit iNOS ¹ and reduce NO production ^{1,2}	Macrophage-like RAW 2647 cell culture; Microglial cells culture; U937 cell culture	¹ [318] ¹ [314] ² [308]
	Reduce the expression of ICAM-1, VCAM-1, and E-selectin	Human keratinocytes culture; Lipopolysaccharide-induced vasculitis	[319] [320]
	An analogue of α -MSH, AP214, inhibits cell infiltration and cytokine release and stimulates efferocytosis	Gouty inflammation	[321]
	Induce tolerogenic dendritic cells ² and immunosuppressive Tregs ^{1,2} ; suppress the activation and proliferation of effector T cells ^{1,2}	T cell culture; Psoriasis-like skin inflammation	¹ [313] ² [311]
	Reduce chemoattractant activity for neutrophils and expression of CD11b in these cells; reduce reactive oxygen intermediate production	Urate crystal-induced monocyte activation and neutrophil responses in vitro	[309]

tor, already detailed in the section “Bioactive lipids” [65, 130, 131]. This protein was first named tazarotene-induced gene 2 protein (TIG2) or retinoid acid receptor responder 2 (RARRES2), since the anti-psoriatic synthetic retinoid tazarotene used to treat psoriatic skin injuries was shown to up regulate the chemerin gene [132, 133]. There are more than two receptors for chemerin binding—chemokine CC motif receptor-like 2 (CCRL2) and G protein-coupled receptor 1 (GPR1)—of which chemR23 is the main chemerin receptor, and is associated with chemerin chemotactic action [133]. Chemerin was initially isolated from inflamed biologic fluids, such as rheumatoid arthritis synovial fluid and ovarian cancer ascites [134, 135, 136]. This

protein is also released by several tissues and organs, including the liver, spleen, lymph nodes, epithelia, pancreas, lung, skin, platelets, adipose tissue, and immune cells (as reviewed by [133]).

Chemerin is synthesized and secreted as a precursor named prochemerin [137]. Human prochemerin is synthesized by the removal of a 20-aa hydrophobic signal peptide from chemerin by an unknown protease, generating a prochemerin that contains 143 aa (chem^{21–163}) [137]. This prochemerin has little activity, but can be converted into a fully active form by proteolytic removal of the last 6 amino acids by different proteases, such as elastase and cathepsin G (neutrophil-derived proteases), trypsin (derived from mast cells), and proteases of the

coagulation cascade [134–137, 139]. Based on the cleavage in the C-terminal domain, different chemerin peptide isoforms can be produced, presenting either high activity when the peptide isoforms are chemerin⁻¹⁵⁷ and chemerin⁻¹⁵⁶, or low activity/inactivity, when the peptide isoforms are chemerin⁻¹⁵⁸, chemerin⁻¹⁵⁵, chemerin⁻¹⁵⁴ and chemerin⁻¹⁵² [137].

Traditionally, the production of bioactive chemerin is mediated mainly by the serine proteases cathepsin G (CG) and elastase (HLE), which are released following neutrophil activation and are responsible for producing chemerin⁻¹⁵⁷ and chemerin⁻¹⁵⁶, respectively. These chemerins stimulate chemokine production and recruitment of macrophages and DCs [134, 135]. However, some studies have now demonstrated the participation of other proteases in producing chemerin peptides that regulate inflammation. Guillabert and colleagues [138] showed the ability of the neutrophil-derived serine protease proteinase 3 (PR3) to convert prochemerin into chemerin⁻¹⁵⁵. Moreover, these researchers found that chymase, an enzyme present in mast cells, can convert active chemerin⁻¹⁵⁷ and chemerin⁻¹⁵⁶ into chemerin⁻¹⁵⁴. Neither chemerin⁻¹⁵⁵ produced by PR3 of neutrophils nor chemerin⁻¹⁵⁴ produced by chymase of mast cells induced DC chemotaxis, and thereby regulated the action of chemerin during immune responses. In 2008, Cash and colleagues [139] also demonstrated that classically activated macrophages release cysteine proteases, mainly calpains and cathepsin S, which cleave prochemerin into peptides with potent anti-inflammatory properties, including inhibition of pro-inflammatory mediators such as tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1, IL-6, IL-12 and RANTES (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted) and induced the mRNA expression of the anti-inflammatory cytokines transforming growth factor (TGF)- β and IL-10. Peptide chemerin15 (C15) is another peptide derived from chemerin cleavage, which has been considered an anti-inflammatory and pro-resolving peptide, since it inhibits pro-inflammatory mediators produced by macrophages, promotes phagocytosis of apoptotic cells, inhibits integrin activation and

clustering, reduces neutrophil adhesion and chemotaxis, and contributes to the reprogramming of macrophages by reducing inducible nitric oxide synthase (iNOS) and TNF- α and increasing arginase-1 expression [139–142]. Thus, chemerin is a protein that can contribute both to the onset and termination of acute inflammation [133].

Confirming the role of chemerin as an anti-inflammatory and pro-resolving mediator, Zhao and colleagues [143] have demonstrated that chemerin administration is positively related to reduced CD4⁺ T-cell accumulation, lower mRNA expression of CCL17 and CCL22 (Th2-attracting chemokines) and decreased recruitment of CD11c⁺ CD11b⁺ inflammatory DCs in a murine model of asthma. Chemerin treatment could also reduce neutrophil infiltration and inflammatory cytokine release in a mouse model of acute lung inflammation induced by LPS [144]. Despite the studies presented here, participation of chemerin in the resolution of inflammation remains poorly understood and needs to be studied further.

2.2.4 Galectins

In recent years, several studies have focused on understanding the role of proteins and glycans in the modulation of the immune response [145]. Galectins are conserved glycan-binding proteins presented in mammals, birds, fish, sponges, nematodes, and microorganisms during evolution [146, 148]. To date, 15 galectin members have been identified, and all of them share a conserved carbohydrate-recognition domain (CRD) of approximately 130 amino acids, which promote carbohydrate binding [148, 149].

Based on their structure and number of CRDs, galectins can be classified into three families: (1) prototypic galectins that have one CRD, and exist as monomers or dimers, represented by galectin-1, 2, 5, 7, 10, 11, 13, 14 and 15; (2) tandem-repeat galectins that are composed of two different CRDs separated by a set of more than 70 amino acids, represented by galectin-4, 6, 8, 9 and 12; and (3) chimaera-type galectin-3 group that has a single CRD and a large amino-terminal domain, represented only by galectin-3 [148–152].

Galectins are involved at all stages of immunity and inflammation, from the initiation

through to the resolution [153, 154]. There are no specific receptors for galectin binding, and these proteins act both extracellularly and intracellularly [148, 149]. Intracellularly, galectins bind to cytoplasmic and nuclear proteins regardless of their interaction with carbohydrates and regulate various biological responses [147, 419]. Through an unknown mechanism, galectins can be exported extracellularly and act via the recognition of glycoproteins on the cell surface (such as adhesion receptors and cytokine receptors), controlling the responses and properties of these receptors [148, 152].

According to the galectin type, concentration, location, and glycan-binding preferences of each galectin member, these proteins can perform diverse biological response, regulating positively or negatively distinct cellular events, including cell activation, cytokine secretion, migration, proliferation, differentiation, polarization, and viability of immune cell populations [148, 149, 155]. Thus, some members of this family, such as galectin-3, contribute to the pro-inflammatory response, and others (for instance galectin-1 (Gal-1) and Gal-9) participate mainly in the resolution of inflammation [153, 156]. Here, we focus on the main characteristics of Gal-1 and Gal-9, and their contribution to the resolution of inflammation.

Gal-1 is expressed by epithelial, endothelial, and stromal cells, as well as macrophages, polymorphonuclear cells, eosinophils, DCs, and activated T cells (as reviewed by [157]). Galectin can be found in the nucleus, cytoplasm, inner or outer surface of the cell membrane, and extracellular matrix [167]. The participation of endogenous or exogenous Gal-1 to limit or resolve inflammation has been demonstrated in multiple inflammatory disease models, including nephritis, arthritis, encephalomyelitis, and hepatitis [158].

Gal-9 is expressed in various tissues and cell types, such as lung and immune cells, including T cells, B cells, DCs, monocytes, and eosinophils (as reviewed by Rao [167]). Some researchers have demonstrated anti-inflammatory and pro-resolutive properties related to Gal-9, such as the induction of T cell apoptosis and stimulation of phagocytic clearance [159–162].

The participation of Gal-1 and -9 in the resolution of inflammation remains controversial since some studies have also demonstrated pro-inflammatory properties of these molecules [163, 164]. Thus, Table 8 summarizes certain studies in which Gal-1 or Gal-9 has pro-resolution activity during experimental models as well in human cells.

2.3 Gaseous Mediators: Hydrogen Sulphide, Carbon Monoxide, and Nitric Oxide

Gaseous mediators are gases with very low molecular weights, which diffuse freely through cell membranes. The half-lives of these molecules are very short, and they do not have specific receptors [165]. The main representatives of gaseous resolving mediators are hydrogen sulphide (H_2S), carbon monoxide (CO), and nitric oxide (NO), whose functions are mediated through the interaction with many genes and proteins [165].

Hydrogen sulphide used to be strictly considered a toxic gas. However, in 1996, Abe and Kimura demonstrated the physiological role of this gas in the nervous system [166]. In 2001, Wang and colleagues also showed that H_2S is an important endogenous vasorelaxant. Subsequently, several studies have explored the role of this gaseous mediator in various tissues [165]. H_2S is derived from cysteine through the enzymatic action of cystathionine beta-synthase (CBS), cystathionine gamma-lyase (CSE), [166–169] and 3-mercaptopyruvate sulphur transferase (3MST) [170]. CBS and CSE can be found in the liver, kidney, brain, ileum, uterus, placenta, and pancreatic islets. The CSE enzyme is also found in the portal vein and thoracic aorta [423]. 3MST is localized to the liver, kidney, heart, lung, thymus, testis, thoracic aorta, and brain [423].

CO is produced by the action of the enzyme heme oxygenase (HO) on heme. There are two isoforms of this enzyme: HO-2 (constitutive expression) and HO-1 (inducible expression). The detection of HO-1 can be used to identify cellular stress and produces CO to limit tissue damage. Moreover, the products of HO-1 activity are involved in various defence mechanism [171].

Table 8 Main pro-resolving actions of Galectins related to resolution of inflammation

Protein	Action	Disease or experimental model	References
Galectin-1	¹ Inhibits pro-inflammatory cytokine production, ^{1,3} reduces cell adhesion and lymphocyte trafficking and ² deletes T helper (Th)1 and Th-17 cells selectively	Human T cells culture; Murine T cells culture; Experimental autoimmune encephalomyelitis; Human umbilical vein endothelial cells culture; Delayed-type hypersensitivity response induced in mice by met-BSA	¹ [146] ² [322] ³ [323]
	¹ Inhibits neutrophil extravasation and mast cell degranulation and ^{2,3} reduces neutrophil adhesion and transmigration across the inflamed endothelium	Rat hind paw edema; Human recombinant Gal-1 and human PMNs assay; Neutrophil culture	¹ [324] ² [390] ³ [420]
	Inhibits nitric oxide production by reducing inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression	Peritoneal rats macrophages culture	[325]
	Suppresses antigen presentation by regulating constitutive and inducible FcγRI expression and FcγRI-dependent phagocytosis; inhibits IFN-γ-induced MHC class II (MHC-II) expression and MHC-II-dependent Ag presentation in a dose-dependent manner.	Human monocytes culture and murine macrophages culture	[326]
	Induces the differentiation of tolerogenic dendritic cells and regulatory T cells	Experimental autoimmune encephalomyelitis; Murine and human T cells culture; Human DCs and monocytes culture	[322] [327]
	Enhances IL-10 production	J558L, HL-60, Wehi-3, and PC-3 cells culture; Mouse Th cells culture; Hapten-dependent contact hypersensitivity; Human skin-explant T cell culture; Human knee synovial fluid culture of patients with rheumatoid arthritis; Human PBMC culture; MOLT-4 T cells culture; Human neutrophils and T cell culture	[328] [329] [330]
	Induces 12 and 15-lipoxygenase expression in macrophages and favours their conversion towards a pro-resolving phenotype	Mouse peritonitis; Mouse peritoneal macrophages and neutrophils culture	[331]
Galectin-9	¹ Exogenous Gal-9 inhibits airway inflammation by binding to CD44 and preventing CD44-hyaluronic acid interaction, reducing, in turn, leucocyte adhesion and migration to the lung; ² Exogenous Gal-9 also suppresses airway resistance and eosinophil recruitment; ³ Reduces the inflammatory response related to asthma by inducing IL-10 production	Murine model of allergic asthma; RBL-2H3 cells culture; Mouse mast cell line MC/9 culture; Asthmatic reaction in guinea pigs and passive-cutaneous anaphylaxis in mice; Induced sputum samples of asthma patients	¹ [161] ² [333] ³ [153]
	Binds to IgE and prevents IgE-antigen complex formation and mast cell degranulation	RBL-2H3 cells culture; Mouse mast cell line MC/9 culture; Asthmatic reaction in guinea pigs and passive-cutaneous anaphylaxis in mice	[333]
	Induces apoptosis of activated eosinophils but not non-activated eosinophils	Bronchoalveolar lavage fluid of patients with acute and chronic eosinophilic pneumonia	[332]
	Exogenous Gal-9 induces T-cell apoptosis, limits leucocyte recruitment and oedema formation	Carrageenan-induced paw edema model	[162]
	Exogenous Gal-9 suppresses Th17 cell development and expands Foxp3 ⁺ Tregs from naïve CD4 T cells	MOG-induced experimental allergic encephalomyelitis model	[334]

NO was first described in the 80s as a molecule that was able to regulate vascular tone [172]. It is now known that this inorganic free radical is related to many diverse functions in physiological and pathological situations [165, 173]. NO production results from the catalysis of L-arginine by a family of enzymes termed nitric oxide synthases (NOS). There are three known isoforms of NOS: two constitutive isoforms nNOS (or NOS1, present in nervous system tissue and skeletal muscle) and eNOS (also called NOS3, present in the endothelium), and an inducible isoform (iNOS or NOS2, present in immune cells and the cardiovascular system). nNOS and eNOS are present as preformed proteins and produce loss of NO levels after increased intracellular calcium, which is generally associated with physiological processes. iNOS produces large quantities of NO upon stimulation, by pro-inflammatory cytokines for example, and is therefore usually related to pathological processes [174].

Production of these gases is related to both physiological and pathological processes. In the context of resolving inflammation, they present similar actions that contribute to the termination of the inflammatory response [165]. Table 9 details the specific activities mediated by each of these gases that participate in the resolution of inflammation during experimental models as well in human cells.

2.3.1 Purine: Adenosine

Adenosine is a purine that can be detected in the extracellular space at nanomolar levels under normal conditions [175], and is found in every cell of the body [176]. Following cellular damage or stress, increased levels of adenosine can be produced by various cell types through its intracellular formation and export via nucleoside transporters, or extracellular degradation of adenine nucleotides (ATP and/or ADP) [175, 177, 424].

There are four specific G-protein-coupled receptors associated with adenosine binding: A1, A2A (high-affinity), A2B (low-affinity), and A3. The A1 and A3 receptors are known to inhibit adenylyl cyclase (the enzyme responsible for catalysing the conversion of adenosine ATP to

3',5'-cyclic AMP (cAMP), whereas the A2 receptor stimulates this enzyme [99, 175, 178, 424]. Thus, activation of a certain adenosine receptor may result in contrasting physiological effects, based on the location and level of expression of these receptors [99, 175].

Adenosine represents an impressive pro-resolving mediator that can impact the initiation, duration, and resolution of the inflammatory response [175]. Production of this purine has been demonstrated to be associated with the modulation of several cell types, including neutrophils, macrophages, endothelial cells, DCs, and lymphocytes (see [175, 177] and references therein for more details). In summary, the following points regarding adenosine receptor interactions and their roles in the resolution of inflammation in various cells types can be highlighted:

- *Neutrophils*: This cell type can release adenosine after activation. Adenosine binding to A2A and A3 receptors is related to the inhibition of neutrophil activation [179]. Adenosine inhibits the phagocytic activity of neutrophils, diminishes neutrophil production of oxygen radicals and other potentially deleterious mediators, as well as reduces neutrophil adhesion to the vascular endothelium [180, 181].
- *Macrophages*: The differentiation of monocytes into macrophages is related to increased expression of A1, A2A and A3 receptors. Activation of A2A, A2B and A3 receptors promotes the polarization of the anti-inflammatory alternatively activated macrophages (or M2), which are associated with decreased levels of TNF, IL-6, IL-12 and macrophage inflammatory protein (MIP)-1 α , as well as increased levels of the anti-inflammatory cytokine IL-10. A2B receptor activation also increases the expression of arginase-1 and Mgl-1 expression, and increases the production of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in alternatively activated macrophages. These changes also favour tissue repair [182–186].
- *Endothelial cells*: Adenosine binding of the A2 receptor increases vascular endothelial

Table 9 Main pro-resolving actions of gaseous mediators related to resolution of inflammation

Gas	Action	Disease or experimental model	References
Hydrogen sulphide	Acts as a scavenger of cytotoxic substances, including peroxynitrite ¹ , hypochlorous acid ² hydrogen peroxide ³ , and superoxide anion ⁴	Human neuroblastoma SH-SY5Y cells culture; Murine RAW 264.7 macrophage culture; Human vascular smooth muscle cells culture	¹ [354] ² [355] ³ [356] ⁴ [357]
	Exerts antinociceptive effects in the gastrointestinal tract by activating K _{ATP} channels	Colorectal distension in rats	[339]
	Suppresses leucocyte infiltration and oedema formation: inhibits the expression of cell adhesion molecules in both the endothelium (ICAM-1 and P-selectin) and on leucocytes (LFA-1)	Mesenteric microcirculation evaluation by intravital; Carrageenan air pouch model in rats	[340]
	Helps to restore tissue function by upregulating enzymes that drive tissue repair and preserve mitochondrial function	Human colon adenocarcinoma cell lines culture; Mitochondria isolated from mouse kidneys, liver, and heart; Human colonic epithelial HT-29 Glc - /+ cells culture	[341, 342] [343]
	Reduces the inflammation-associated-upregulation of COX-2 expression and reduces the range of pro-inflammatory cytokines such as IL-1, TNF, IFN, IL-12, and IL-23	LPS-induced endotoxic shock in rats	[344]
	Enhances ulcer healing	Experimental gastric ulcer in rats	[345]
	Inhibits leucocyte adherence to blood vessels walls and induces vasodilatation in the cardiovascular system	Haemorrhagic shock model in rats	[346]
	Induces neutrophil apoptosis	Human PMN cells culture	[347]
	Stimulates angiogenesis	Human umbilical vein endothelial cells culture; chick chorioallantoic membrane model	[348]
	Stimulates the translocation of annexin-A1 from the cytosol to the plasma membrane	Murine bone marrow-derived macrophages culture; Intravital microscopy in mouse mesenteric microcirculation; Human PMN cells culture	[421]
	Protects blood-brain barrier integrity ¹ and promotes angiogenesis after cerebral ischemia ²	Middle cerebral artery occlusion in mice; Middle cerebral artery occlusion in rats	¹ [422] ² [349]
	Promotes gastrointestinal mucosal integrity and repair ^{1,2} Promotes stronger barrier function of the GI mucosa, limiting exposure to luminal bacteria ²	Gastroenteropathy; Hapten-induced colitis in rodents	¹ [350] ² [351]
Inhibits the activity of the human myeloperoxidase (MPO)	Circulating and endothelium-bound human MPO	[352]	

(continued)

Table 9 (continued)

Gas	Action	Disease or experimental model	References
Carbon monoxide	At lower concentrations, produced by eNOS and nNOS: usually is cytoprotective At supra-physiological concentrations, produced by iNOS: triggers cell death	Culture of endothelial cells, hepatocytes, thymocytes, neurons, leukocytes and several tumor cell lines; Brain ischemia; Alzheimer's and Parkinson's Disease; Murine macrophage culture; Human peripheral blood mononuclear cells culture; Human neutrophils culture; Eosinophils culture; Rheumatoid arthritis, acute pancreatitis, bacterial pneumonia, inflammatory bowel disease, asthma, and following surgery	[353] [354] [355] [173]
	Suppresses leucocyte adherence to the vascular endothelium and reduces pro-inflammatory cytokine expression by inhibiting NF- κ B	Human osteoarthritic chondrocytes and cartilage cell culture; Acute peritonitis induced by Zymosan in mice; Model of adaptive immune response in mice	[356] [357] [358]
	Reduces neutrophil infiltration and stimulates the activity of HO-1 and phagocytosis by resolution macrophages	Murine peritonitis and human macrophage and PMN cell culture	[359]
	Exhibits cell and tissue protection through anti-apoptotic, anti-inflammatory, and anti-proliferative effects	CO gas inhalation by rats, mice and pigs; Murine model of chronic colitis; Pulmonary arterial hypertension and right ventricular hypertrophy in mice; Experimental model of cerebral malaria in mice	[360]
Nitric oxide	Inhibits platelet and inflammatory cell activation	Vascular smooth muscle cells culture; Human and mice neutrophils culture	[361] [362]
	Promotes ulcer healing	Gastric ulcer in rats	[363]
	Induces apoptosis in smooth muscle cells	Vascular smooth muscle cells culture	[364]
	Stimulates angiogenesis, proliferation and metastasis in cancer at lower levels (<100 nM), but promotes cytotoxicity and cell apoptosis in cancer at higher levels (>400–500 nM):	Breast cancer; Gastric cancer; Melanoma cells; HL-60 human leukemia; JEG-3 choriocarcinoma cells; Ovarian carcinoma cells; Medullablastoma cells; Human prostatic epithelial cells; Human bladder carcinoma cells; Murine melanoma cells; Human adenocarcinoma cells; Fibrosarcoma cell; Renal cell carcinoma; B-cell chronic lymphocytic leukemia cells; Colon cancer cells; Skin tumors (murine)	[365] [366]

growth factor (VEGF) expression by macrophages, stimulates the proliferation and migration of endothelial cells, and promotes angiogenesis, tissue repair, and wound healing [187–189].

- *Dendritic cells*: A1 and A3 receptors are expressed on immature human DCs and contribute to the recruitment of this cell type to inflamed tissues. Mature DCs mainly express the A2A receptor, which is associated with the reduction of interferon (IFN)- α , IL-6, TNF, and IL-12, as well as the inhibition of antigen

presentation and costimulation [177, 190, 425].

- *Lymphocytes*: The binding of adenosine to A2A, A2B, and A3 receptors is related to reduction of IL-2 and IFN- γ levels, and inhibition of effector T-cell proliferation. CD39 and CD73, molecules present on the surface of Tregs and Th17 cells, play important roles in the production of adenosine that binds the A2 receptor of effector T cells, suppressing both CD4⁺ and CD8⁺ T cell effector functions [191, 192, 193].

2.4 Neuromodulators

Interaction between the nervous system and immune system have been well documented in many studies. Following activation, immune cells can stimulate neuronal circuits that participate in innate and adaptive immune response regulation [194–198]. This is possible since there are cholinergic, catecholaminergic, peptidergic, and other types of neurons distributed throughout different organs, including the liver, spleen, lymph nodes, and thymus. These neurons transmit information to and from the nervous system during infection or sterile inflammation [198]. Moreover, some structures, such as Toll-like receptors (TLRs) and cytokine receptors, are present in both leukocytes and neurons, facilitating neuro-immune communication [197].

In the context of neuro-immune regulation, vagus nerve-mediated cholinergic signalling plays an important role in the resolution of inflammation via the inflammatory reflex arc [194–198]. This inflammatory reflex arc is characterized by the recognition of signs of injury, infection, or inflammation by an afferent sensory neural arc, and the transmission of responses by an efferent motor neural arc that regulates the immune system [196]. The neurotransmitters involved in this process can bind to acetylcholine receptors and adrenergic receptors expressed in immune cells such as macrophages, T lymphocytes, and DCs, enabling the neural regulation of immune responses (as reviewed by [199]). Furthermore, acetylcholine, dopamine, and other neuromodulators can be produced and released by immune cells, contributing to local immune regulation [197, 199–201].

Netrin-1 and acetylcholine are two relevant neuromodulators associated with the resolution of inflammation that act via the vagus nerve-mediated reflex [197]. Mirakaj and colleagues [6] have shown that vagotomy after zymosan-initiated peritoneal injury in mice reduced acetylcholine and netrin-1 levels and delayed the resolution of inflammation, by increasing pro-inflammatory cytokines and leukocyte recruitment.

The cholinergic anti-inflammatory activity induced by the vagus nerve occurs via acetylcholine binding to the alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor ($\alpha 7$ nAChR). This receptor is broadly expressed by immune cells, such as B cells, T cells, DCs, monocytes, and macrophages [196, 197, 202, 426]. $\alpha 7$ nAChR activation results mainly in the suppression of pro-inflammatory cytokines via three pathways: (1) cAMP response element binding protein (CREB) phosphorylation, followed by increased c-Fos expression, which inhibits nuclear factor (NF)- κ B; (2) through the interaction of $\alpha 7$ nAChR with Janus kinase 2 (JAK2), causing the phosphorylation and subsequent nuclear translocation of STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) or (3) via rapid acetylcholine influx into the cytoplasm following ATP entry, which attenuates the release of mitochondrial DNA and inflammasome activation [197].

Netrin-1, the other neuromodulator regulated by the vagus nerve, is a laminin-related protein expressed by the vascular endothelium. Its expression is regulated by inflammatory cytokines and infectious agents [427]. Unc5 netrin receptor B (UNC5B) is highly expressed in leukocytes, and can interact with netrin-1 to regulate the immune response [427]. The binding of netrin-1 to the A2B receptor is also associated with a reduced inflammatory response [6, 203, 204]. This receptor is expressed in several tissues and organs, including the vasculature, large intestine, and brain. Moreover, different cell types express high levels of A2B, such as neurons, astrocytes, endothelial cells, mast cells, neutrophils, DCs, macrophages, and lymphocytes (as reviewed by [205]). The participation of netrin-1 in the resolution of inflammation is related to the overexpression of resolvins, decreased recruitment of neutrophils, and overactivation of efferocytosis [6, 203, 204, 383].

The effects of acetylcholine and netrin-1 that contribute to the resolution of inflammation during experimental models as well in human cells are highlighted in Table 10.

Table 10 Main pro-resolving actions of neuromodulators related to resolution of inflammation

Protein	Action	Disease or experimental model	References
Acetylcholine/ cholinergic anti- inflammatory pathway stimulation	Attenuates the release of pro-inflammatory cytokines, such as IL-1 β , IL-6, IL-18 and TNF	Lethal endotoxaemia in rats and mice; Human macrophage culture; Acute Hypovolemic hemorrhagic shock in rats; Septic peritonitis induced in mice; Murine model of chronic relapsing colitis; Spleen cell culture; Microdialysis in mice; Kidney ischemia- reperfusion injury in mice	[367] [368] [369] [431] [370] [374] [371] [200, 372] [373]
	Upregulates the protective immunoresolvent PCTR biosynthetic pathway in human group 3 innate lymphoid cells (ILC3), promoting the resolution of bacterial infections	<i>Escherichia coli</i> peritonitis in mice	[222]
	Decreases circulating HMGB1, attenuating sepsis	Endotoxemia and polymicrobial sepsis	[374]
	Impairs the migration of B cells, neutrophils, monocytes and dendritic cells and reduces antibody production	Immunization of mice with <i>Streptococcus pneumoniae</i>	[375]
	Improves inflammation, pannus formation, cartilage destruction and bone erosion in collagen-induced arthritis	Rat collagen-induced arthritis	[376]
Netrin-1	Reduces myocardium inflammation, decreasing IL-6 and TNF- α ; monocyte chemoattractant protein-1, macrophage inflammatory protein-1 β , RANTES, CCR1, CCR2, and CCR5. Reduces matrix metalloproteinase-14, natriuretic peptide precursor B, tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and osteopontin	Murine autoimmune myocarditis	[377]
	Increases the expression of alternatively activated macrophages and promotes proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) expression; decreases cardiac serum Troponin T (TnT) expression and reduces allograft infiltration of neutrophils and monocytes/macrophages	Cardiac ischemia reperfusion injury	[378]
	Inhibits leucocyte migration	Peripheral blood lymphocytes culture; Human umbilical vein endothelial cells culture; Mouse sepsis model; Mouse peritonitis model	[379]
	Shortens the resolution interval, decreases neutrophil recruitment, reduces pro-inflammatory mediators and stimulates the production of resolvins, protectins and lipoxins	Murine peritonitis; Human neutrophils and monocytes culture; Murine LPS inhalation model; Murine ventilator-induced lung injury model; Peritonitis model; Caco-2, T84 and HMEC-1 cells culture; DSS-colitis; Murine model of hepatic ischemia reperfusion injury	[6, 203, 383] [204, 380] [381]

2.5 Hydrogen Peroxide – H₂O₂

The reactive oxygen species (ROS) family is comprised of a group of molecules, such as hydrogen peroxide (H₂O₂), are essential for host defence, and are produced through the mitochondrial electron transport chain or the activation of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase (NOX) complexes in the plasma membrane and cytosol [206]. ROS are normally produced during cellular energy production in aerobic cells, and are removed by antioxidant enzymes. ROS can also be produced by phagocytes in response to microbial and inflammatory stimuli, within the mitochondria, or through a process known as “oxidative burst” mediated by NOX, and are generally considered to be pro-inflammatory mediators [207].

A reduction in ROS production is associated with several human pathological conditions, such as chronic granulomatous disease (CGD). In this disease, ROS-deficiency is associated with severe infections and is characterized by excessive inflammation [208]. Patients with CGD have a decreased ability to resolve inflammation [209]. In addition, H₂O₂ is described as an inducer of apoptosis in epithelial cells, endothelial cells, human hepatocytes, myocytes, neutrophils, and eosinophils [210–215].

It has also been demonstrated that H₂O₂ derived from NOX is directly linked to the induction of eosinophil and neutrophil apoptosis. Moreover, exogenous administration of H₂O₂ at the peak of the inflammatory response decreases the number of viable eosinophils and increases the number of apoptotic eosinophils, which consequently shortens the duration of allergic inflammation [210, 211]. In addition, in an antigen-induced arthritis model, Lopes et al. [211] showed that H₂O₂ increased neutrophil apoptosis, anticipating the natural resolution of inflammation. Indeed, at controlled low concentrations, H₂O₂ is a key second messenger of physiological processes such as cell proliferation [216] and migration [217]. Thus, in addition to the canonical pro-inflammatory roles, H₂O₂ has also been shown to act as an important pro-resolutive mediator.

3 Pharmacological Strategies for Resolution: Clinical Trials

Several studies have focused on the discovery of new compounds with a therapeutic potential to treat inflammatory diseases [6, 71, 210, 211, 218–222]. The development of pharmacological pro-resolution strategies to treat chronic inflammatory pathology intrinsically affords a greater scope than conventional anti-inflammatory approaches. Current treatments that focus on the inhibition of the productive phase of inflammation (anti-inflammatory treatments), act mainly to reduce both leukocyte recruitment and the release of pro-inflammatory mediators [3, 8]. By contrast, pro-resolving treatment aims to increase the production or use of mediators to augment important aspects during resolution, such as apoptosis, efferocytosis, recruitment of resolving macrophages, and tissue repair. In addition, these treatments seek to simulate the mechanisms and endogenous biochemical pathways related to the resolution of inflammation [8, 57, 210, 220].

Several authors have investigated the anti-inflammatory and pro-resolving properties of endogenous and synthetic lipids derived from PUFAs, which has demonstrated that these specialized lipid mediators limit leukocyte accumulation and enhance the influx of pro-resolving macrophages and efferocytosis in animal models. Many of these studies have translational potential, and some have already been tested in clinical trials [26, 72, 100].

Most clinical trials aiming to resolve inflammatory exudates use omega-3 fatty acids to produce structurally distinct families of signalling molecules, including SPMs. A resolvin E1 analogue improved the signs and symptoms in a Phase II clinical trial in patients with dry eye syndrome [223], and this study has progressed to a Phase III clinical trial (Safety and Efficacy Study of RX-10045 on the Signs and Symptoms of Dry Eye, identifier NCT00799552; www.clinicaltrials.gov). This was the first demonstration of clinical efficacy using mediators associated with the resolution phase of the inflammatory response. SPMs have demonstrated several pro-operative effects, are associated with a low cost

Table 11 Pro-resolving strategies in clinical trials

Pro-resolution drug/ compounds	Action	Disease	References
Protectin D1	Protectin D1 is generated in asthma and dampens airway inflammation and hyperresponsiveness	Asthma	[95]
Resolving macrophages	Efferocytosis of neutrophils	Periodontal disease	www.clinicalTrials.gov Ekstein, J
Fish oil supplementation	Production of Omega-3 Fatty Acid-Derived Mediators	Peripheral Artery Disease	[226]
Neuroprotectin D1	This report provides a demonstration of the role of neuroprotectin D1 in cell survival and its potential deficiency in Alzheimer's disease	Alzheimer	[90, 225]
Docosahexaenoic acid	The ratio of pro-resolution/pro-inflammatory lipid markers was increased in the plasma of the intervention group over the entire study	Obesity inflammation	[224]
Specialized pro-resolving lipid mediators	SPMs promote macrophage phagocytosis of blood clots	Coronary artery disease	[382]
RvE1 analogue	Reduces inflammation	Dry eye syndrome	www.clinicalTrials.gov Phase 3
Specialized pro-resolving lipid mediators	Increase pro-resolution signals	Allergic inflammation	www.clinicalTrials.gov Barning C, completed study
E-series resolvin (RvE) 1	RvE1 rescues the dysregulation in the neutrophil receptor profile and, following a therapeutic dosage, activates phagocytosis and resolution signals in type 2 diabetes	Type II Diabetes	[71]
Monoglyceride of DHA	Monoglyceride of DHA (DHA-MAG) is a lipid compound for which intestinal absorption would increase the DHA/arachidonic acid (AA) ratio and promote the synthesis of specific metabolites involved in the resolution of inflammation. Reduces lung inflammation and improves pulmonary function	Cystic fibrosis	www.clinicalTrials.gov Phase 2

and can be found in the diet, and have also been widely used as supplementation in pregnant, obese, and diabetic patients [240]. In addition, several studies have demonstrated the importance of these mediators in diseases such as allergic asthma, Alzheimer's disease, coronary artery disease, and peripheral artery disease [71, 90, 95, 225–227].

However, these mediators carry a high price tag for large-scale use in the clinic. Thus, certain animal studies seem promising, [2, 10, 12, 17, 77, 92, 210, 211, 220, 221, 228, 229, 230, 231, 232] especially those related to the use of alternative therapies that use other mechanisms associated

with the resolution phase of an inflammatory response, and those associated with the activation of endogenous mechanisms that trigger an acceleration of the resolving phase. Table 11 is a summary of pro-resolving strategies in clinical trials.

In summary, this chapter highlighted the main pro-resolving mediators and their roles in the resolution of inflammation. Moreover, some clinical trials were presented to confirm the importance of these mediators in regulating inflammatory responses in different diseases. Research into the resolution of inflammation and its mediators continues to be a promising field of study, still requiring constant progress.

References

- Alessandri AL, Sousa LP, Lucas CD, Rossi AG, Pinho V, Teixeira MM (2013) Resolution of inflammation: mechanisms and opportunity for drug development. *Pharmacol Ther* 139(2):189–212. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.04.006>
- Sugimoto MA, Sousa LP, Pinho V, Perretti M, Teixeira MM (2016) Resolution of inflammation: what controls its onset? *Front Immunol* 7:160. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00160>
- Chiang N, Serhan CN (2017) Structural elucidation and physiologic functions of specialized pro-resolving mediators and their receptors. *Mol Asp Text Med*. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2017.03.005>
- Chiang N, de la Rosa X, Libreros S, Serhan CN (2017) Novel resolvin D2 receptor axis in infectious inflammation. *J Immunol* 198(2):842–851. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601650>
- Buckley CD, Gilroy DW, Serhan CN, Stockinger B, Tak PP (2013) The resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol* 13(1):59–66. <https://doi.org/10.1038/nri3362>
- Mirakaj V, Dalli J, Granja T, Rosenberger P, Serhan CN (2014) Vagus nerve controls resolution and pro-resolving mediators of inflammation. *J Exp Med* 211(6):1037–1048. <https://doi.org/10.1084/jem.20132103>
- Schwab JM, Chiang N, Arita M, Serhan CN (2007) Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes. *Nature* 447(7146):869–874. <https://doi.org/10.1038/nature05877>
- Fullerton JN, Gilroy DW (2016) Resolution of inflammation: a new therapeutic frontier. *Nat Rev Drug Discov* 15(8):551–567. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.39>
- Perretti CT, Munch SB (2015) On estimating the reliability of ecological forecasts. *J Theor Biol* 372:211–216. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2015.02.031>
- Perretti M (2015) The resolution of inflammation: new mechanisms in patho-physiology open opportunities for pharmacology. *Semin Immunol* 27(3):145–148. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2015.06.001>
- Schwab R, Schumacher O, Junge K, Binnebosel M, Klinge U, Schumpelick V (2007) Fibrin sealant for mesh fixation in Lichtenstein repair: biomechanical analysis of different techniques. *Hernia* 11(2):139–145. <https://doi.org/10.1007/s10029-007-0195-6>
- Ortega-Gomez A, Perretti M, Soehnlein O (2013) Resolution of inflammation: an integrated view. *EMBO Mol Med* 5(5):661–674. <https://doi.org/10.1002/emmm.201202382>
- Sousa LP, Carmo AF, Rezende BM, Lopes F, Silva DM, Alessandri AL, Bonjardim CA, Rossi AG, Teixeira MM, Pinho V (2009) Cyclic AMP enhances resolution of allergic pleurisy by promoting inflammatory cell apoptosis via inhibition of PI3K/Akt and NF-kappaB. *Biochem Pharmacol* 78(4):396–405. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2009.04.030>
- Sousa LP, Lopes F, Silva DM, Tavares LP, Vieira AT, Rezende BM, Carmo AF, Russo RC, Garcia CC, Bonjardim CA, Alessandri AL, Rossi AG, Pinho V, Teixeira MM (2010) PDE4 inhibition drives resolution of neutrophilic inflammation by inducing apoptosis in a PKA-PI3K/Akt-dependent and NF-kappaB-independent manner. *J Leukoc Biol* 87(5):895–904. <https://doi.org/10.1189/jlb.0809540>
- Perretti M, Cooper D, Dalli J, Norling LV (2017) Immune resolution mechanisms in inflammatory arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 13(2):87–99. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2016.193>
- Tabas I, Glass CK (2013) Anti-inflammatory therapy in chronic disease: challenges and opportunities. *Science* 339(6116):166–172. <https://doi.org/10.1126/science.1230720>
- Perez DA, Vago JP, Athayde RM, Reis AC, Teixeira MM, Sousa LP, Pinho V (2014) Switching off key signaling survival molecules to switch on the resolution of inflammation. *Mediat Inflamm* 2014:829851. <https://doi.org/10.1155/2014/829851>
- Wallace JL, Blackler RW, Chan MV, Da Silva GJ, Elsheikh W, Flannigan KL, Gamaniek I, Manko A, Wang L, Motta JP, Buret AG (2015) Anti-inflammatory and cytoprotective actions of hydrogen sulfide: translation to therapeutics. *Antioxid Redox Signal* 22(5):398–410. <https://doi.org/10.1089/ars.2014.5901>
- Serhan CN, Krishnamoorthy S, Recchiuti A, Chiang N (2011) Novel anti-inflammatory--pro-resolving mediators and their receptors. *Curr Top Med Chem* 11(6):629–647
- Samuelsson B (1987) An elucidation of the arachidonic acid cascade. Discovery of prostaglandins, thromboxane and leukotrienes. *Drugs* 33(Suppl 1):2–9
- Serhan CN, Chiang N (2008) Endogenous pro-resolving and anti-inflammatory lipid mediators: a new pharmacologic genus. *Br J Pharmacol* 153(Suppl 1):S200–S215. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707489>
- Buckley CD, Gilroy DW, Serhan CN (2014) Proresolving lipid mediators and mechanisms in the resolution of acute inflammation. *Immunity* 40(3):315–327. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.02.009>
- Buckley CD, Halder S, Hardie D, Reynolds G, Torensma R, De Villeroche VJ, Brouty-Boye D, Isacke CM (2005) Report on antibodies submitted to the stromal cell section of HLDA8. *Cell Immunol* 236(1–2):29–41. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2005.08.027>
- Serhan CN, Lundberg U, Weissmann G, Samuelsson B (1984) Formation of leukotrienes and hydroxy acids by human neutrophils and platelets exposed to monosodium urate. *Prostaglandins* 27(4):563–581
- Serhan CN (1994) Lipoxin biosynthesis and its impact in inflammatory and vascular events. *Biochim Biophys Acta* 1212(1):1–25

26. Serhan CN (2017) Discovery of specialized pro-resolving mediators marks the dawn of resolution physiology and pharmacology. *Mol Asp Med*. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2017.03.001>
27. Tagoe CE, Marjanovic N, Park JY, Chan ES, Abeles AM, Attur M, Abramson SB, Pillinger MH (2008) Annexin-1 mediates TNF-alpha-stimulated matrix metalloproteinase secretion from rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *J Immunol* 181(4):2813–2820
28. Serhan CN, Hamberg M, Samuelsson B (1984) Lipoxins: novel series of biologically active compounds formed from arachidonic acid in human leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81(17):5335–5339
29. Levy BD, Bertram S, Tai HH, Israel E, Fischer A, Drazen JM, Serhan CN (1993) Agonist-induced lipoxin A4 generation: detection by a novel lipoxin A4-ELISA. *Lipids* 28(12):1047–1053
30. Basil MC, Levy BD (2016) Specialized pro-resolving mediators: endogenous regulators of infection and inflammation. *Nat Rev Immunol* 16(1):51–67. <https://doi.org/10.1038/nri.2015.4>
31. Ryan A, Godson C (2010) Lipoxins: regulators of resolution. *Curr Opin Pharmacol* 10(2):166–172. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2010.02.005>
32. Lindgren JA, Edenius C (1993) Transcellular biosynthesis of leukotrienes and lipoxins via leukotriene A4 transfer. *Trends Pharmacol Sci* 14(10):351–354
33. Fiore S, Serhan CN (1990) Formation of lipoxins and leukotrienes during receptor-mediated interactions of human platelets and recombinant human granulocyte/macrophage colony-stimulating factor-primed neutrophils. *J Exp Med* 172(5):1451–1457
34. Serhan CN, Sheppard KA (1990) Lipoxin formation during human neutrophil-platelet interactions. Evidence for the transformation of leukotriene A4 by platelet 12-lipoxygenase in vitro. *J Clin Invest* 85(3):772–780. <https://doi.org/10.1172/JCI114503>
35. Claria J, Serhan CN (1995) Aspirin triggers previously undescribed bioactive eicosanoids by human endothelial cell-leukocyte interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(21):9475–9479
36. Chiang N, Takano T, Clish CB, Petasis NA, Tai HH, Serhan CN (1998) Aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A4 (ATL) generation by human leukocytes and murine peritonitis exudates: development of a specific 15-epi-LXA4 ELISA. *J Pharmacol Exp Ther* 287(2):779–790
37. Claria J, Lee MH, Serhan CN (1996) Aspirin-triggered lipoxins (15-epi-LX) are generated by the human lung adenocarcinoma cell line (A549)-neutrophil interactions and are potent inhibitors of cell proliferation. *Mol Med* 2(5):583–596
38. Chiang N, Serhan CN, Dahlen SE, Drazen JM, Hay DW, Rovati GE, Shimizu T, Yokomizo T, Brink C (2006) The lipoxin receptor ALX: potent ligand-specific and stereoselective actions in vivo. *Pharmacol Rev* 58(3):463–487. <https://doi.org/10.1124/pr.58.3.4>
39. Corminboeuf O, Leroy X (2015) FPR2/ALXR agonists and the resolution of inflammation. *J Med Chem* 58(2):537–559. <https://doi.org/10.1021/jm501051x>
40. Cattaneo F, Parisi M, Ammendola R (2013) Distinct signaling cascades elicited by different formyl peptide receptor 2 (FPR2) agonists. *Int J Mol Sci* 14(4):7193–7230. <https://doi.org/10.3390/ijms14047193>
41. Maderna P, Godson C (2009) Lipoxins: resolution-ary road. *Br J Pharmacol* 158(4):947–959. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00386.x>
42. Barnig C, Cernadas M, Dutile S, Liu X, Perrella MA, Kazani S, Wechsler ME, Israel E, Levy BD (2013) Lipoxin A4 regulates natural killer cell and type 2 innate lymphoid cell activation in asthma. *Sci Transl Med* 5(174):174ra126. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3004812>
43. Ye RD, Boulay F, Wang JM, Dahlgren C, Gerard C, Parmentier M, Serhan CN, Murphy PM (2009) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIII. Nomenclature for the formyl peptide receptor (FPR) family. *Pharmacol Rev* 61(2):119–161. <https://doi.org/10.1124/pr.109.001578>
44. Bonnans C, Fukunaga K, Levy MA, Levy BD (2006) Lipoxin A(4) regulates bronchial epithelial cell responses to acid injury. *Am J Pathol* 168(4):1064–1072. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2006.051056>
45. Maddox JF, Hachicha M, Takano T, Petasis NA, Fokin VV, Serhan CN (1997) Lipoxin A4 stable analogs are potent mimetics that stimulate human monocytes and THP-1 cells via a G-protein-linked lipoxin A4 receptor. *J Biol Chem* 272(11):6972–6978
46. Fiore S, Maddox JF, Perez HD, Serhan CN (1994) Identification of a human cDNA encoding a functional high affinity lipoxin A4 receptor. *J Exp Med* 180(1):253–260
47. Sodin-Semrl S, Taddeo B, Tseng D, Varga J, Fiore S (2000) Lipoxin A4 inhibits IL-1 beta-induced IL-6, IL-8, and matrix metalloproteinase-3 production in human synovial fibroblasts and enhances synthesis of tissue inhibitors of metalloproteinases. *J Immunol* 164(5):2660–2666
48. Souza DG, Fagundes CT, Amaral FA, Cisalpino D, Sousa LP, Vieira AT, Pinho V, Nicoli JR, Vieira LQ, Fierro IM, Teixeira MM (2007) The required role of endogenously produced lipoxin A4 and annexin-1 for the production of IL-10 and inflammatory hyporesponsiveness in mice. *J Immunol* 179(12):8533–8543
49. Calder PC (2013) Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: nutrition or pharmacology? *Br J Clin Pharmacol* 75(3):645–662. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2012.04374.x>
50. Qu Q, Xuan W, Fan GH (2015) Roles of resolvins in the resolution of acute inflammation. *Cell Biol Int* 39(1):3–22. <https://doi.org/10.1002/cbin.10345>

51. Serhan CN, Petasis NA (2011) Resolvins and protectins in inflammation resolution. *Chem Rev* 111(10):5922–5943. <https://doi.org/10.1021/cr100396c>
52. 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(8):1025–1037
53. 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 antiinflammatory drugs and transcellular processing. *J Exp Med* 192(8):1197–1204
54. Arita M, Ohira T, Sun YP, Elangovan S, Chiang N, Serhan CN (2007) Resolvin E1 selectively interacts with leukotriene B4 receptor BLT1 and ChemR23 to regulate inflammation. *J Immunol* 178(6):3912–3917
55. Yamada T, Tani Y, Nakanishi H, Taguchi R, Arita M, Arai H (2011) Eosinophils promote resolution of acute peritonitis by producing proresolving mediators in mice. *FASEB J* 25(2):561–568. <https://doi.org/10.1096/fj.10-170027>
56. Isoe Y, Arita M, Matsueda S, Iwamoto R, Fujihara T, Nakanishi H, Taguchi R, Masuda K, Sasaki K, Urabe D, Inoue M, Arai H (2012) Identification and structure determination of novel anti-inflammatory mediator resolvin E3, 17,18-dihydroxyeicosapentaenoic acid. *J Biol Chem* 287(13):10525–10534. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.340612>
57. Serhan CN (2017) Treating inflammation and infection in the 21st century: new hints from decoding resolution mediators and mechanisms. *FASEB J* 31(4):1273–1288. <https://doi.org/10.1096/fj.201601222R>
58. Arita M, Bianchini F, Aliberti J, Sher A, Chiang N, Hong S, Yang R, Petasis NA, Serhan CN (2005) Stereochemical assignment, antiinflammatory properties, and receptor for the omega-3 lipid mediator resolvin E1. *J Exp Med* 201(5):713–722. <https://doi.org/10.1084/jem.20042031>
59. Werz O, Szellas D, Steinhilber D, Radmark O (2002) Arachidonic acid promotes phosphorylation of 5-lipoxygenase at Ser-271 by MAPK-activated protein kinase 2 (MK2). *J Biol Chem* 277(17):14793–14800. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111945200>
60. Ji RR, Xu ZZ, Strichartz G, Serhan CN (2011) Emerging roles of resolvins in the resolution of inflammation and pain. *Trends Neurosci* 34(11):599–609. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2011.08.005>
61. Fukunaga K, Kohli P, Bonnans C, Fredenburgh LE, Levy BD (2005) Cyclooxygenase 2 plays a pivotal role in the resolution of acute lung injury. *J Immunol* 174(8):5033–5039
62. Stables MJ, Gilroy DW (2011) Old and new generation lipid mediators in acute inflammation and resolution. *Prog Lipid Res* 50(1):35–51. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2010.07.005>
63. Oh SF, Pillai PS, Recchiuti A, Yang R, Serhan CN (2011) Pro-resolving actions and stereoselective biosynthesis of 18S E-series resolvins in human leukocytes and murine inflammation. *J Clin Invest* 121(2):569–581. <https://doi.org/10.1172/JCI42545>
64. Arita M, Yoshida M, Hong S, Tjonahen E, Glickman JN, Petasis NA, Blumberg RS, Serhan CN (2005) 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 U S A* 102(21):7671–7676. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409271102>
65. Wittamer V, Franssen JD, Vulcano M, Mirjolet JF, Le Poul E, Migeotte I, Brezillon S, Tyldesley R, Blanpain C, Detheux M, Mantovani A, Sozzani S, Vassart G, Parmentier M, Communi D (2003) Specific recruitment of antigen-presenting cells by chemerin, a novel processed ligand from human inflammatory fluids. *J Exp Med* 198(7):977–985. <https://doi.org/10.1084/jem.20030382>
66. Campbell EL, MacManus CF, Kominsky DJ, Keely S, Glover LE, Bowers BE, Scully M, Bruyninckx WJ, Colgan SP (2010) Resolvin E1-induced intestinal alkaline phosphatase promotes resolution of inflammation through LPS detoxification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(32):14298–14303. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914730107>
67. Ishida T, Yoshida M, Arita M, Nishitani Y, Nishiimi S, Masuda A, Mizuno S, Takagawa T, Morita Y, Kutsumi H, Inokuchi H, Serhan CN, Blumberg RS, Azuma T (2010) Resolvin E1, an endogenous lipid mediator derived from eicosapentaenoic acid, prevents dextran sulfate sodium-induced colitis. *Inflamm Bowel Dis* 16(1):87–95. <https://doi.org/10.1002/ibd.21029>
68. Haworth O, Cernadas M, Levy BD (2011) NK cells are effectors for resolvin E1 in the timely resolution of allergic airway inflammation. *J Immunol* 186(11):6129–6135. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1004007>
69. Ohira T, Arita M, Omori K, Recchiuti A, Van Dyke TE, Serhan CN (2010) Resolvin E1 receptor activation signals phosphorylation and phagocytosis. *J Biol Chem* 285(5):3451–3461. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.044131>
70. Yokomizo T, Izumi T, Chang K, Takuwa Y, Shimizu T (1997) A G-protein-coupled receptor for leukotriene B4 that mediates chemotaxis. *Nature* 387(6633):620–624. <https://doi.org/10.1038/42506>
71. Freire MO, Dalli J, Serhan CN, Van Dyke TE (2017) Neutrophil resolvin E1 receptor expression and function in type 2 diabetes. *J Immunol* 198(2):718–728. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601543>
72. Serhan CN, Chiang N, Dalli J (2017) New pro-resolving n-3 mediators bridge resolution of infectious inflammation to tissue regeneration. *Mol Asp Med*. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2017.08.002>
73. Kohli P, Levy BD (2009) Resolvins and protectins: mediating solutions to inflammation.

- Br J Pharmacol 158(4):960–971. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00290.x>
74. Marcheselli VL, Mukherjee PK, Arita M, Hong S, Antony R, Sheets K, Winkler JW, Petasis NA, Serhan CN, Bazan NG (2010) Neuroprotectin D1/protectin D1 stereoselective and specific binding with human retinal pigment epithelial cells and neutrophils. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 82(1):27–34. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2009.10.010>
 75. Serhan CN, Gotlinger K, Hong S, Arita M (2004) 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* 73(3–4):155–172
 76. Marcheselli VL, Hong S, Lukiw WJ, Tian XH, Gronert K, Musto A, Hardy M, Gimenez JM, Chiang N, Serhan CN, Bazan NG (2003) Novel docosanoids inhibit brain ischemia-reperfusion-mediated leukocyte infiltration and pro-inflammatory gene expression. *J Biol Chem* 278(44):43807–43817. <https://doi.org/10.1074/jbc.M305841200>
 77. Norling LV, Headland SE, Dalli J, Arnardottir HH, Haworth O, Jones HR, Irimia D, Serhan CN, Perretti M (2016) Proresolving and cartilage-protective actions of resolvin D1 in inflammatory arthritis. *JCI Insight* 1(5):e85922. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.85922>
 78. Giera M, Ioan-Facsinay A, Toes R, Gao F, Dalli J, Deelder AM, Serhan CN, Mayboroda OA (2012) Lipid and lipid mediator profiling of human synovial fluid in rheumatoid arthritis patients by means of LC-MS/MS. *Biochim Biophys Acta* 1821(11):1415–1424. <https://doi.org/10.1016/j.bbaliip.2012.07.011>
 79. Chatterjee A, Komshian S, Sansbury BE, Wu B, Mottola G, Chen M, Spite M, Conte MS (2017) Biosynthesis of proresolving lipid mediators by vascular cells and tissues. *FASEB J* 31(8):3393–3402. <https://doi.org/10.1096/fj.201700082R>
 80. 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(4):1660–1665. <https://doi.org/10.1073/pnas.0907342107>
 81. Bennett M, Gilroy DW (2016) Lipid mediators in inflammation. *Microbiol Spectr* 4(6). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MCHD-0035-2016>
 82. Recchiuti A, Krishnamoorthy S, Fredman G, Chiang N, Serhan CN (2011) MicroRNAs in resolution of acute inflammation: identification of novel resolvin D1-miRNA circuits. *FASEB J* 25(2):544–560. <https://doi.org/10.1096/fj.10-169599>
 83. Dalli J, Colas RA, Serhan CN (2013) Novel n-3 immunoresolvents: structures and actions. *Sci Rep* 3:1940. <https://doi.org/10.1038/srep01940>
 84. Chiang N, Fredman G, Backhed F, Oh SF, Vickery T, Schmidt BA, Serhan CN (2012) Infection regulates pro-resolving mediators that lower antibiotic requirements. *Nature* 484(7395):524–528. <https://doi.org/10.1038/nature11042>
 85. Chiang N, Dalli J, Colas RA, Serhan CN (2015) Identification of resolvin D2 receptor mediating resolution of infections and organ protection. *J Exp Med* 212(8):1203–1217. <https://doi.org/10.1084/jem.20150225>
 86. Zhang MJ, Sansbury BE, Hellmann J, Baker JF, Guo L, Parmer CM, Prenner JC, Conklin DJ, Bhatnagar A, Creager MA, Spite M (2016) Resolvin D2 enhances postischemic revascularization while resolving inflammation. *Circulation* 134(9):666–680. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.116.021894>
 87. Pascoal LB, Bombassaro B, Ramalho AF, Coope A, Moura RF, Correa-da-Silva F, Ignacio-Souza L, Razolli D, de Oliveira D, Catharino R, Velloso LA (2017) Resolvin RvD2 reduces hypothalamic inflammation and rescues mice from diet-induced obesity. *J Neuroinflammation* 14(1):5. <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0777-2>
 88. Serhan CN, Gotlinger K, Hong S, Lu Y, Siegelman J, Baer T, Yang R, Colgan SP, Petasis NA (2006) Anti-inflammatory actions of neuroprotectin D1/protectin D1 and its natural stereoisomers: assignments of dihydroxy-containing docosatrienes. *J Immunol* 176(3):1848–1859
 89. Mukherjee PK, Marcheselli VL, Serhan CN, Bazan NG (2004) Neuroprotectin D1: a docosahexaenoic acid-derived docosatriene protects human retinal pigment epithelial cells from oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(22):8491–8496. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402531101>
 90. Lukiw WJ, Cui JG, Marcheselli VL, Bodker M, Botkjaer A, Gotlinger K, Serhan CN, Bazan NG (2005) A role for docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1 in neural cell survival and Alzheimer disease. *J Clin Invest* 115(10):2774–2783. <https://doi.org/10.1172/JCI25420>
 91. Schwab S, Kuefner MA (2007) Ureterolithiasis with right urine blockage. *Dtsch Med Wochenschr* 132(31–32):1627–1628. <https://doi.org/10.1055/s-2007-984944>
 92. Dalli J, Consalvo AP, Ray V, Di Filippo C, D'Amico M, Mehta N, Perretti M (2013) Proresolving and tissue-protective actions of annexin A1-based cleavage-resistant peptides are mediated by formyl peptide receptor 2/lipoxin A4 receptor. *J Immunol* 190(12):6478–6487. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1203000>
 93. Serhan CN, Arita M, Hong S, Gotlinger K (2004) Resolvins, docosatrienes, and neuroprotectins, novel omega-3-derived mediators, and their endogenous aspirin-triggered epimers. *Lipids* 39(11):1125–1132
 94. Hong JH (2003) Synthesis and antiviral evaluation of novel 3'- and 4'-doubly branched carbocyclic nucleosides as potential antiviral agents. *Arch Pharm Res* 26(12):1109–1116
 95. Levy BD, Kohli P, Gotlinger K, Haworth O, Hong S, Kazani S, Israel E, Haley KJ, Serhan CN (2007) Protectin D1 is generated in asthma and dampens

- airway inflammation and hyperresponsiveness. *J Immunol* 178(1):496–502
96. Jones ML, Mark PJ, Keelan JA, Barden A, Mas E, Mori TA, Waddell BJ (2013) Maternal dietary omega-3 fatty acid intake increases resolvins and protectin levels in the rat placenta. *J Lipid Res* 54(8):2247–2254. <https://doi.org/10.1194/jlr.M039842>
 97. Hong S, Gronert K, Devchand PR, Moussignac RL, 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(17):14677–14687. <https://doi.org/10.1074/jbc.M300218200>
 98. Ariel A, Li PL, Wang W, Tang WX, Fredman G, Hong S, Gotlinger KH, Serhan CN (2005) The docosatriene protectin D1 is produced by TH2 skewing and promotes human T cell apoptosis via lipid raft clustering. *J Biol Chem* 280(52):43079–43086. <https://doi.org/10.1074/jbc.M509796200>
 99. Kalinec GM, Lomber G, Urrutia RA, Kalinec F (2017) Resolution of cochlear inflammation: novel target for preventing or ameliorating drug-, noise- and age-related hearing loss. *Front Cell Neurosci* 11:192. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00192>
 100. Serhan CN, Dalli J, Karamnov S, Choi A, Park CK, Xu ZZ, Ji RR, Zhu M, Petasis NA (2012) Macrophage proresolving mediator maresin 1 stimulates tissue regeneration and controls pain. *FASEB J* 26(4):1755–1765. <https://doi.org/10.1096/fj.11-201442>
 101. Deng B, Wang CW, Armandottir HH, Li Y, Cheng CY, Dalli J, Serhan CN (2014) Maresin biosynthesis and identification of maresin 2, a new anti-inflammatory and pro-resolving mediator from human macrophages. *PLoS One* 9(7):e102362. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102362>
 102. Abdulnour RE, Dalli J, Colby JK, Krishnamoorthy N, Timmons JY, Tan SH, Colas RA, Petasis NA, Serhan CN, Levy BD (2014) Maresin 1 biosynthesis during platelet-neutrophil interactions is organ-protective. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(46):16526–16531. <https://doi.org/10.1073/pnas.1407123111>
 103. Hong S, Tian H, Lu Y, Laborde JM, Muhale FA, Wang Q, Alapure BV, Serhan CN, Bazan NG (2014) Neuroprotectin/protectin D1: endogenous biosynthesis and actions on diabetic macrophages in promoting wound healing and innervation impaired by diabetes. *Am J Physiol Cell Physiol* 307(11):C1058–C1067. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00270.2014>
 104. Poorani R, Bhatt AN, Dwarakanath BS, Das UN (2016) COX-2, aspirin and metabolism of arachidonic, eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids and their physiological and clinical significance. *Eur J Pharmacol* 785:116–132. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.08.049>
 105. Parente L, Solito E (2004) Annexin 1: more than an anti-phospholipase protein. *Inflammation research: official journal of the European Histamine Research Society* [et al] 53(4):125–132. <https://doi.org/10.1007/s00011-003-1235-z>
 106. Dreier R, Schmid KW, Gerke V, Riehemann K (1998) Differential expression of annexins I, II and IV in human tissues: an immunohistochemical study. *Histochem Cell Biol* 110(2):137–148
 107. Babbin BA, Laukoetter MG, Nava P, Koch S, Lee WY, Capaldo CT, Peatman E, Severson EA, Flower RJ, Perretti M, Parkos CA, Nusrat A (2008) Annexin A1 regulates intestinal mucosal injury, inflammation, and repair. *J Immunol* 181(7):5035–5044
 108. Hullin F, Raynal P, Ragab-Thomas JM, Fauvel J, Chap H (1989) Effect of dexamethasone on prostaglandin synthesis and on lipocortin status in human endothelial cells. Inhibition of prostaglandin I₂ synthesis occurring without alteration of arachidonic acid liberation and of lipocortin synthesis. *J Biol Chem* 264(6):3506–3513
 109. Sampey AV, Hutchinson P, Morand EF (2000) Annexin I and dexamethasone effects on phospholipase and cyclooxygenase activity in human synovial cells. *Mediat Inflamm* 9(3–4):125–132. <https://doi.org/10.1080/09629350020018357>
 110. Jia Y, Morand EF, Song W, Cheng Q, Stewart A, Yang YH (2013) Regulation of lung fibroblast activation by annexin A1. *J Cell Physiol* 228(2):476–484. <https://doi.org/10.1002/jcp.24156>
 111. Neymeyer H, Labes R, Reverte V, Saez F, Stroh T, Dathe C, Hohberger S, Zeisberg M, Muller GA, Salazar J, Bachmann S, Paliege A (2015) Activation of annexin A1 signalling in renal fibroblasts exerts antifibrotic effects. *Acta Physiol (Oxf)* 215(3):144–158. <https://doi.org/10.1111/apha.12586>
 112. Bizzarro V, Fontanella B, Franceschelli S, Pirozzi M, Christian H, Parente L, Petrella A (2010) Role of Annexin A1 in mouse myoblast cell differentiation. *J Cell Physiol* 224(3):757–765. <https://doi.org/10.1002/jcp.22178>
 113. D'Acquisto F, Merghani A, Lecona E, Rosignoli G, Raza K, Buckley CD, Flower RJ, Perretti M (2007) Annexin-1 modulates T-cell activation and differentiation. *Blood* 109(3):1095–1102. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-05-022798>
 114. Perretti M, D'Acquisto F (2009) Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol* 9(1):62–70. <https://doi.org/10.1038/nri2470>
 115. Christmas P, Callaway J, Fallon J, Jones J, Haigler HT (1991) Selective secretion of annexin I, a protein without a signal sequence, by the human prostate gland. *J Biol Chem* 266(4):2499–2507
 116. Cooray SN, Gobbetti T, Montero-Melendez T, McArthur S, Thompson D, Clark AJ, Flower RJ, Perretti M (2013) Ligand-specific conformational change of the G-protein-coupled receptor ALX/FPR2 determines proresolving functional responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(45):18232–18237. <https://doi.org/10.1073/pnas.1308253110>
 117. Solito E, Kamal A, Russo-Marie F, Buckingham JC, Marullo S, Perretti M (2003) A novel calcium-

- dependent proapoptotic effect of annexin 1 on human neutrophils. *FASEB J* 17(11):1544–1546. <https://doi.org/10.1096/fj.02-0941fje>
118. Sawmynaden P, Perretti M (2006) Glucocorticoid upregulation of the annexin-A1 receptor in leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 349(4):1351–1355. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.08.179>
 119. Catania A (2007) The melanocortin system in leukocyte biology. *J Leukoc Biol* 81(2):383–392. <https://doi.org/10.1189/jlb.0706426>
 120. Loram LC, Culp ME, Connolly-Strong EC, Sturgill-Koszycki S (2015) Melanocortin peptides: potential targets in systemic lupus erythematosus. *Inflammation* 38(1):260–271. <https://doi.org/10.1007/s10753-014-0029-5>
 121. Yang Y, Harmon CM (2017) Molecular signatures of human melanocortin receptors for ligand binding and signaling. *Biochim Biophys Acta* 1863(10 Pt A):2436–2447. <https://doi.org/10.1016/j.bbaid.2017.04.025>
 122. Gantz I, Fong TM (2003) The melanocortin system. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284(3):E468–E474. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00434.2002>
 123. Lisak RP, Benjamins JA (2017) Melanocortins, melanocortin receptors and multiple sclerosis. *Brain Sci* 7(8). <https://doi.org/10.3390/brainsci7080104>
 124. Abdel-Malek ZA, Swope VB, Nordlund JJ (1992) The nature and biological effects of factors responsible for proliferation and differentiation of melanocytes. *Pigment Cell Res Suppl* 2:43–47
 125. Boston BA (1999) The role of melanocortins in adipocyte function. *Ann N Y Acad Sci* 885:75–84
 126. Chhajlani V (1996) Distribution of cDNA for melanocortin receptor subtypes in human tissues. *Biochem Mol Biol Int* 38(1):73–80
 127. Taherzadeh S, Sharma S, Chhajlani V, Gantz I, Rajora N, Demitri MT, Kelly L, Zhao H, Ichiyama T, Catania A, Lipton JM (1999) Alpha-MSH and its receptors in regulation of tumor necrosis factor- α production by human monocyte/macrophages. *Am J Phys* 276(5 Pt 2):R1289–R1294
 128. Catania A, Gatti S, Colombo G, Lipton JM (2004) Targeting melanocortin receptors as a novel strategy to control inflammation. *Pharmacol Rev* 56(1):1–29. <https://doi.org/10.1124/pr.56.1.1>
 129. Lasaga M, Debeljuk L, Durand D, Scimionelli TN, Caruso C (2008) Role of alpha-melanocyte stimulating hormone and melanocortin 4 receptor in brain inflammation. *Peptides* 29(10):1825–1835. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2008.06.009>
 130. Meder W, Wendland M, Busmann A, Kutzleb C, Spodberg N, John H, Richter R, Schleuder D, Meyer M, Forssmann WG (2003) Characterization of human circulating TIG2 as a ligand for the orphan receptor ChemR23. *FEBS Lett* 555(3):495–499
 131. Vermi W, Riboldi E, Wittamer V, Gentili F, Luini W, Marrelli S, Vecchi A, Franssen JD, Communi D, Massardi L, Sironi M, Mantovani A, Parmentier M, Facchetti F, Sozzani S (2005) Role of ChemR23 in directing the migration of myeloid and plasmacytoid dendritic cells to lymphoid organs and inflamed skin. *J Exp Med* 201(4):509–515. <https://doi.org/10.1084/jem.20041310>
 132. Nagpal S, Patel S, Jacobs H, DiSepio D, Ghosn C, Malhotra M, Teng M, Duvic M, Chandraratna RA (1997) Tazarotene-induced gene 2 (TIG2), a novel retinoid-responsive gene in skin. *J Invest Dermatol* 109(1):91–95
 133. Mariani F, Roncucci L (2015) Chemerin/chemR23 axis in inflammation onset and resolution. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society [et al]* 64(2):85–95. <https://doi.org/10.1007/s00011-014-0792-7>
 134. Wittamer V, Bondue B, Guillabert A, Vassart G, Parmentier M, Communi D (2005) Neutrophil-mediated maturation of chemerin: a link between innate and adaptive immunity. *J Immunol* 175(1):487–493
 135. Zabel BA, Allen SJ, Kulig P, Allen JA, Cichy J, Handel TM, Butcher EC (2005) Chemerin activation by serine proteases of the coagulation, fibrinolytic, and inflammatory cascades. *J Biol Chem* 280(41):34661–34666. <https://doi.org/10.1074/jbc.M504868200>
 136. Parolini S, Santoro A, Marcenaro E, Luini W, Massardi L, Facchetti F, Communi D, Parmentier M, Majorana A, Sironi M, Tabellini G, Moretta A, Sozzani S (2007) The role of chemerin in the colocalization of NK and dendritic cell subsets into inflamed tissues. *Blood* 109(9):3625–3632. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-08-038844>
 137. Du XY, Zabel BA, Myles T, Allen SJ, Handel TM, Lee PP, Butcher EC, Leung LL (2009) Regulation of chemerin bioactivity by plasma carboxypeptidase N, carboxypeptidase B (activated thrombin-activable fibrinolysis inhibitor), and platelets. *J Biol Chem* 284(2):751–758. <https://doi.org/10.1074/jbc.M805000200>
 138. Guillabert A, Wittamer V, Bondue B, Godot V, Imbault V, Parmentier M, Communi D (2008) Role of neutrophil proteinase 3 and mast cell chymase in chemerin proteolytic regulation. *J Leukoc Biol* 84(6):1530–1538. <https://doi.org/10.1189/jlb.0508322>
 139. Cash JL, Hart R, Russ A, Dixon JP, Colledge WH, Doran J, Hendrick AG, Carlton MB, Greaves DR (2008) Synthetic chemerin-derived peptides suppress inflammation through ChemR23. *J Exp Med* 205(4):767–775. <https://doi.org/10.1084/jem.20071601>
 140. Cash JL, Christian AR, Greaves DR (2010) Chemerin peptides promote phagocytosis in a ChemR23- and Syk-dependent manner. *J Immunol* 184(9):5315–5324. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903378>
 141. Cash JL, Bass MD, Campbell J, Barnes M, Kubes P, Martin P (2014) Resolution mediator chemerin15 reprograms the wound microenvironment to promote repair and reduce scarring. *Curr Biol* 24(12):1435. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.06.010>

142. Cash JL, Bena S, Headland SE, McArthur S, Brancaleone V, Perretti M (2013) Chemerin15 inhibits neutrophil-mediated vascular inflammation and myocardial ischemia-reperfusion injury through ChemR23. *EMBO Rep* 14(11):999–1007. <https://doi.org/10.1038/embor.2013.138>
143. Zhao L, Yang W, Yang X, Lin Y, Lv J, Dou X, Luo Q, Dong J, Chen Z, Chu Y, He R (2014) Chemerin suppresses murine allergic asthma by inhibiting CCL2 production and subsequent airway recruitment of inflammatory dendritic cells. *Allergy* 69(6):763–774. <https://doi.org/10.1111/all.12408>
144. Luangsay S, Wittamer V, Bondue B, De Henau O, Rouger L, Brait M, Franssen JD, de Nadai P, Huaux F, Parmentier M (2009) Mouse ChemR23 is expressed in dendritic cell subsets and macrophages, and mediates an anti-inflammatory activity of chemerin in a lung disease model. *J Immunol* 183(10):6489–6499. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901037>
145. van Kooyk Y, Rabinovich GA (2008) Protein-glycan interactions in the control of innate and adaptive immune responses. *Nat Immunol* 9(6):593–601. <https://doi.org/10.1038/ni.f.203>
146. Rabinovich GA, Ariel A, Hershkovitz R, Hirabayashi J, Kasai KI, Lider O (1999) Specific inhibition of T-cell adhesion to extracellular matrix and proinflammatory cytokine secretion by human recombinant galectin-1. *Immunology* 97(1):100–106
147. Rabinovich GA, Toscano MA, Jackson SS, Vasta GR (2007) Functions of cell surface galectin-glycoprotein lattices. *Curr Opin Struct Biol* 17(5):513–520. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2007.09.002>
148. Rabinovich GA, Toscano MA (2009) Turning 'sweet' on immunity: galectin-glycan interactions in immune tolerance and inflammation. *Nat Rev Immunol* 9(5):338–352. <https://doi.org/10.1038/nri2536>
149. van der Hoeven NW, Hollander MR, Yildirim C, Jansen MF, Teunissen PF, Horrevoets AJ, van der Pouw Kraan TC, van Royen N (2016) The emerging role of galectins in cardiovascular disease. *Vasc Pharmacol* 81:31–41. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2016.02.006>
150. Yang Z, Chiang CK, Chang HT (2008) Synthesis of fluorescent and photovoltaic Cu(2)O nanocubes. *Nanotechnology* 19(2):025604. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/19/02/025604>
151. Mendez-Huergo SP, Blidner AG, Rabinovich GA (2017) Galectins: emerging regulatory checkpoints linking tumor immunity and angiogenesis. *Curr Opin Immunol* 45:8–15. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2016.12.003>
152. Nio-Kobayashi J (2017) Tissue- and cell-specific localization of galectins, beta-galactose-binding animal lectins, and their potential functions in health and disease. *Anat Sci Int* 92(1):25–36. <https://doi.org/10.1007/s12565-016-0366-6>
153. Sanchez-Cuellar S, de la Fuente H, Cruz-Adalia A, Lamana A, Cibrian D, Giron RM, Vara A, Sanchez-Madrid F, Ancochea J (2012) Reduced expression of galectin-1 and galectin-9 by leucocytes in asthma patients. *Clin Exp Immunol* 170(3):365–374. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2012.04665.x>
154. Golden-Mason L, Rosen HR (2017) Galectin-9: diverse roles in hepatic immune homeostasis and inflammation. *Hepatology* 66(1):271–279. <https://doi.org/10.1002/hep.29106>
155. Cooper D, Iqbal AJ, Gittens BR, Cervone C, Perretti M (2012) The effect of galectins on leukocyte trafficking in inflammation: sweet or sour? *Ann N Y Acad Sci* 1253:181–192. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.06291.x>
156. Rabinovich GA, Baum LG, Tinari N, Paganelli R, Natoli C, Liu FT, Iacobelli S (2002) Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response? *Trends Immunol* 23(6):313–320
157. Rao SP, Ge XN, Sriramarao P (2017) Regulation of eosinophil recruitment and activation by galectins in allergic asthma. *Front Med (Lausanne)* 4:68. <https://doi.org/10.3389/fmed.2017.00068>
158. Rabinovich GA, Croci DO (2012) Regulatory circuits mediated by lectin-glycan interactions in autoimmunity and cancer. *Immunity* 36(3):322–335. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.03.004>
159. Tsuchiyama Y, Wada J, Zhang H, Morita Y, Hiragushi K, Hida K, Shikata K, Yamamura M, Kanwar YS, Makino H (2000) Efficacy of galectins in the amelioration of nephrotoxic serum nephritis in Wistar Kyoto rats. *Kidney Int* 58(5):1941–1952. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2000.00366.x>
160. Zhu C, Anderson AC, Schubart A, Xiong H, Imitola J, Khoury SJ, Zheng XX, Strom TB, Kuchroo VK (2005) The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nat Immunol* 6(12):1245–1252. <https://doi.org/10.1038/ni1271>
161. Katoh S, Ishii N, Nobumoto A, Takeshita K, Dai SY, Shinonaga R, Niki T, Nishi N, Tominaga A, Yamauchi A, Hirashima M (2007) Galectin-9 inhibits CD44-hyaluronan interaction and suppresses a murine model of allergic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 176(1):27–35. <https://doi.org/10.1164/rccm.200608-1243OC>
162. Iqbal AJ, Sampaio AL, Maione F, Greco KV, Niki T, Hirashima M, Perretti M, Cooper D (2011) Endogenous galectin-1 and acute inflammation: emerging notion of a galectin-9 pro-resolving effect. *Am J Pathol* 178(3):1201–1209. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2010.11.073>
163. Gil CD, Gullo CE, Oliani SM (2010) Effect of exogenous galectin-1 on leukocyte migration: modulation of cytokine levels and adhesion molecules. *Int J Clin Exp Pathol* 4(1):74–84
164. Hsu YL, Wang MY, Ho LJ, Huang CY, Lai JH (2015) Up-regulation of galectin-9 induces cell migration in human dendritic cells infected with dengue virus. *J Cell Mol Med* 19(5):1065–1076. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12500>
165. Wallace JL, Ianaro A, Flannigan KL, Cirino G (2015) Gaseous mediators in resolution of inflammation. *Semin Immunol* 27(3):227–233. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2015.05.004>

166. Abe K, Kimura H (1996) The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *J Neurosci* 16(3):1066–1071
167. Hosoki R, Matsuki N, Kimura H (1997) The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 237(3):527–531. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.6878>
168. Stipanuk MH, Beck PW (1982) Characterization of the enzymic capacity for cysteine desulphhydration in liver and kidney of the rat. *Biochem J* 206(2):267–277
169. Zhao W, Zhang J, Lu Y, Wang R (2001) The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener. *EMBO J* 20(21):6008–6016. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.21.6008>
170. Shibuya N, Tanaka M, Yoshida M, Ogasawara Y, Togawa T, Ishii K, Kimura H (2009) 3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase produces hydrogen sulfide and bound sulfane sulfur in the brain. *Antioxid Redox Signal* 11(4):703–714. <https://doi.org/10.1089/ARS.2008.2253>
171. Wallace JL, Ianaro A, de Nucci G (2017) Gaseous mediators in gastrointestinal mucosal defense and injury. *Dig Dis Sci*. <https://doi.org/10.1007/s10620-017-4681-0>
172. Furchgott RF, Zawadzki JV (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288(5789):373–376
173. Taylor EL, Megson IL, Haslett C, Rossi AG (2003) Nitric oxide: a key regulator of myeloid inflammatory cell apoptosis. *Cell Death Differ* 10(4):418–430. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401152>
174. Kobayashi Y (2010) The regulatory role of nitric oxide in proinflammatory cytokine expression during the induction and resolution of inflammation. *J Leukoc Biol* 88(6):1157–1162. <https://doi.org/10.1189/jlb.0310149>
175. Antonioli L, Csoka B, Fornai M, Colucci R, Kokai E, Blandizzi C, Hasko G (2014) Adenosine and inflammation: what's new on the horizon? *Drug Discov Today* 19(8):1051–1068. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.02.010>
176. de Oliveira Bravo M, Carvalho JL, Saldanha-Araujo F (2016) Adenosine production: a common path for mesenchymal stem-cell and regulatory T-cell-mediated immunosuppression. *Purinergic Signal* 12(4):595–609. <https://doi.org/10.1007/s11302-016-9529-0>
177. Hasko G, Cronstein B (2013) Regulation of inflammation by adenosine. *Front Immunol* 4:85. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00085>
178. Ralevic V, Burnstock G (1998) Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 50(3):413–492
179. Linden J (2006) New insights into the regulation of inflammation by adenosine. *J Clin Invest* 116(7):1835–1837. <https://doi.org/10.1172/JCI29125>
180. Theron AJ, Steel HC, Tintinger GR, Anderson R (2002) Endogenous adenosine regulates neutrophil pro-inflammatory activities by cyclic AMP-dependent accelerated clearance of cytosolic calcium. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society [et al]* 51(12):594–602
181. Sun WC, Moore JN, Hurley DJ, Vandenplas ML, Linden J, Cao Z, Murray TF (2008) Adenosine A_{2A} receptor agonists inhibit lipopolysaccharide-induced production of tumor necrosis factor- α by equine monocytes. *Vet Immunol Immunopathol* 121(1–2):91–100. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2007.08.011>
182. Hasko G, Szabo C, Nemeth ZH, Kvetan V, Pastores SM, Vizi ES (1996) Adenosine receptor agonists differentially regulate IL-10, TNF- α , and nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages and in endotoxemic mice. *J Immunol* 157(10):4634–4640
183. Hasko G, Kuhel DG, Chen JF, Schwarzschild MA, Deitch EA, Mabley JG, Marton A, Szabo C (2000) Adenosine inhibits IL-12 and TNF- α production via adenosine A_{2a} receptor-dependent and independent mechanisms. *FASEB J* 14(13):2065–2074. <https://doi.org/10.1096/fj.99-0508com>
184. Koscsó B, Trepakov A, Csoka B, Nemeth ZH, Pacher P, Eltzschig HK, Hasko G (2013) Stimulation of A_{2B} adenosine receptors protects against trauma-hemorrhagic shock-induced lung injury. *Purinergic Signal* 9(3):427–432. <https://doi.org/10.1007/s11302-013-9362-7>
185. Csoka B, Selmecezy Z, Koscsó B, Nemeth ZH, Pacher P, Murray PJ, Kepka-Lenhart D, Morris SM Jr, Gause WC, Leibovich SJ, Hasko G (2012) Adenosine promotes alternative macrophage activation via A_{2A} and A_{2B} receptors. *FASEB J* 26(1):376–386. <https://doi.org/10.1096/fj.11-190934>
186. Nemeth ZH, Lutz CS, Csoka B, Deitch EA, Leibovich SJ, Gause WC, Tone M, Pacher P, Vizi ES, Hasko G (2005) Adenosine augments IL-10 production by macrophages through an A_{2B} receptor-mediated posttranscriptional mechanism. *J Immunol* 175(12):8260–8270
187. Murphree LJ, Sullivan GW, Marshall MA, Linden J (2005) Lipopolysaccharide rapidly modifies adenosine receptor transcripts in murine and human macrophages: role of NF- κ B in A_{2A} adenosine receptor induction. *Biochem J* 391(Pt 3):575–580. <https://doi.org/10.1042/BJ20050888>
188. Csoka B, Nemeth ZH, Virag L, Gergely P, Leibovich SJ, Pacher P, Sun CX, Blackburn MR, Vizi ES, Deitch EA, Hasko G (2007) A_{2A} adenosine receptors and C/EBP β are crucially required for IL-10 production by macrophages exposed to *Escherichia coli*. *Blood* 110(7):2685–2695. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-01-065870>
189. Ernens I, Leonard F, Vausort M, Rolland-Turner M, Devaux Y, Wagner DR (2010) Adenosine up-regulates vascular endothelial growth factor in human macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 392(3):351–356. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.01.023>

190. Schnurr M, Toy T, Shin A, Hartmann G, Rothenfusser S, Soellner J, Davis ID, Cebon J, Maraskovsky E (2004) Role of adenosine receptors in regulating chemotaxis and cytokine production of plasmacytoid dendritic cells. *Blood* 103(4):1391–1397. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-06-1959>
191. Koshiba M, Rosin DL, Hayashi N, Linden J, Sitkovsky MV (1999) Patterns of A2A extracellular adenosine receptor expression in different functional subsets of human peripheral T cells. Flow cytometry studies with anti-A2A receptor monoclonal antibodies. *Mol Pharmacol* 55(3):614–624
192. Adair TH (2005) Growth regulation of the vascular system: an emerging role for adenosine. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 289(2):R283–R296. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00840.2004>
193. Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, Chen JF, Enjyoji K, Linden J, Oukka M, Kuchroo VK, Strom TB, Robson SC (2007) Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med* 204(6):1257–1265. <https://doi.org/10.1084/jem.20062512>
194. Pavlov VA, Tracey KJ (2012) The vagus nerve and the inflammatory reflex—linking immunity and metabolism. *Nat Rev Endocrinol* 8(12):743–754. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2012.189>
195. Andersson U, Tracey KJ (2012) Reflex principles of immunological homeostasis. *Annu Rev Immunol* 30:313–335. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-075015>
196. Tracey KJ (2009) Reflex control of immunity. *Nat Rev Immunol* 9(6):418–428. <https://doi.org/10.1038/nri2566>
197. Chavan SS, Pavlov VA, Tracey KJ (2017) Mechanisms and therapeutic relevance of neuro-immune communication. *Immunity* 46(6):927–942. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.06.008>
198. Chavan SS, Tracey KJ (2017) Essential Neuroscience in Immunology. *J Immunol* 198(9):3389–3397. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601613>
199. Kawashima K, Fujii T, Moriwaki Y, Misawa H, Horiguchi K (2015) Non-neuronal cholinergic system in regulation of immune function with a focus on alpha7 nAChRs. *Int Immunopharmacol* 29(1):127–134. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2015.04.015>
200. Rosas-Ballina M, Olofsson PS, Ochani M, Valdes-Ferrer SI, Levine YA, Reardon C, Tusche MW, Pavlov VA, Andersson U, Chavan S, Mak TW, Tracey KJ (2011) Acetylcholine-synthesizing T cells relay neural signals in a vagus nerve circuit. *Science* 334(6052):98–101. <https://doi.org/10.1126/science.1209985>
201. Marino F, Cosentino M (2013) Adrenergic modulation of immune cells: an update. *Amino Acids* 45(1):55–71. <https://doi.org/10.1007/s00726-011-1186-6>
202. Olofsson PS, Katz DA, Rosas-Ballina M, Levine YA, Ochani M, Valdes-Ferrer SI, Pavlov VA, Tracey KJ, Chavan SS (2012) alpha7 nicotinic acetylcholine receptor (alpha7nAChR) expression in bone marrow-derived non-T cells is required for the inflammatory reflex. *Mol Med* 18:539–543. <https://doi.org/10.2119/molmed.2011.00405>
203. Mirakaj V, Thix CA, Laucher S, Mielke C, Morote-Garcia JC, Schmit MA, Henes J, Unertl KE, Kohler D, Rosenberger P (2010) Netrin-1 dampens pulmonary inflammation during acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 181(8):815–824. <https://doi.org/10.1164/rccm.200905-0717OC>
204. Aherne CM, Collins CB, Masterson JC, Tizzano M, Boyle TA, Westrich JA, Parnes JA, Furuta GT, Rivera-Nieves J, Eltzschig HK (2012) Neuronal guidance molecule netrin-1 attenuates inflammatory cell trafficking during acute experimental colitis. *Gut* 61(5):695–705. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2011-300012>
205. Sun Y, Huang P (2016) Adenosine A2B receptor: from cell biology to human diseases. *Front Chem* 4:37. <https://doi.org/10.3389/fchem.2016.00037>
206. Forman HJ, Torres M, Fukuto J (2002) Redox signaling. *Mol Cell Biochem* 234–235(1–2):49–62
207. Leavy O (2014) Inflammation: regulating ROS. *Nat Rev Immunol* 14(6):357. <https://doi.org/10.1038/nri3685>
208. Kuijpers T, Lutter R (2012) Inflammation and repeated infections in CGD: two sides of a coin. *Cell Mol Life Sci* 69(1):7–15. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0834-z>
209. Yasui K, Baba A (2006) Therapeutic potential of superoxide dismutase (SOD) for resolution of inflammation. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society [et al]* 55(9):359–363. <https://doi.org/10.1007/s00011-006-5195-y>
210. Reis AC, Alessandri AL, Athayde RM, Perez DA, Vago JP, Avila TV, Ferreira TP, de Arantes AC, Coutinho Dde S, Rachid MA, Sousa LP, Martins MA, Menezes GB, Rossi AG, Teixeira MM, Pinho V (2015) Induction of eosinophil apoptosis by hydrogen peroxide promotes the resolution of allergic inflammation. *Cell Death Dis* 6:e1632. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.580>
211. Lopes F, Coelho FM, Costa VV, Vieira EL, Sousa LP, Silva TA, Vieira LQ, Teixeira MM, Pinho V (2011) Resolution of neutrophilic inflammation by H2O2 in antigen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 63(9):2651–2660. <https://doi.org/10.1002/art.30448>
212. Hussain S, Thomassen LC, Ferecatu I, Borot MC, Andreau K, Martens JA, Fleury J, Baeza-Squiban A, Marano F, Boland S (2010) Carbon black and titanium dioxide nanoparticles elicit distinct apoptotic pathways in bronchial epithelial cells. *Part Fibre Toxicol* 7:10. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-7-10>
213. Fang WT, Li HJ, Zhou LS (2010) Protective effects of prostaglandin E1 on human umbilical vein endothelial cell injury induced by hydrogen peroxide. *Acta Pharmacol Sin* 31(4):485–492. <https://doi.org/10.1038/aps.2010.23>

214. Kim SJ, Jung HJ, Hyun DH, Park EH, Kim YM, Lim CJ (2010) Glutathione reductase plays an anti-apoptotic role against oxidative stress in human hepatoma cells. *Biochimie* 92(8):927–932. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.03.007>
215. Wang Y, Park KD, Salome C, Wilson SM, Stables JP, Liu R, Khanna R, Kohn H (2011) Development and characterization of novel derivatives of the anti-epileptic drug lacosamide that exhibit far greater enhancement in slow inactivation of voltage-gated sodium channels. *ACS Chem Neurosci* 2(2):90–106. <https://doi.org/10.1021/cn100089b>
216. Morgan MJ, Liu ZG (2011) Crosstalk of reactive oxygen species and NF-kappaB signaling. *Cell Res* 21(1):103–115. <https://doi.org/10.1038/cr.2010.178>
217. Clemens RE, Griendling KK (2006) Reactive oxygen species signaling in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* 71(2):216–225. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2006.02.033>
218. Alessandri AL, Duffin R, Leitch AE, Lucas CD, Sheldrake TA, Dorward DA, Hirani N, Pinho V, de Sousa LP, Teixeira MM, Lyons JF, Haslett C, Rossi AG (2011) Induction of eosinophil apoptosis by the cyclin-dependent kinase inhibitor AT7519 promotes the resolution of eosinophil-dominant allergic inflammation. *PLoS One* 6(9):e25683. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025683>
219. Vago JP, Nogueira CR, Tavares LP, Soriani FM, Lopes F, Russo RC, Pinho V, Teixeira MM, Sousa LP (2012) Annexin A1 modulates natural and glucocorticoid-induced resolution of inflammation by enhancing neutrophil apoptosis. *J Leukoc Biol* 92(2):249–258. <https://doi.org/10.1189/jlb.0112008>
220. Vago JP, Tavares LP, Garcia CC, Lima KM, Perucci LO, Vieira EL, Nogueira CR, Soriani FM, Martins JO, Silva PM, Gomes KB, Pinho V, Bruscoli S, Riccardi C, Beaulieu E, Morand EF, Teixeira MM, Sousa LP (2015) The role and effects of glucocorticoid-induced leucine zipper in the context of inflammation resolution. *J Immunol* 194(10):4940–4950. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401722>
221. Vago JP, Tavares LP, Sugimoto MA, Lima GL, Galvao I, de Caux TR, Lima KM, Ribeiro AL, Carneiro FS, Nunes FF, Pinho V, Perretti M, Teixeira MM, Sousa LP (2016) Proresolving actions of synthetic and natural protease inhibitors are mediated by annexin A1. *J Immunol* 196(4):1922–1932. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500886>
222. Dalli J, Colas RA, Arnardottir H, Serhan CN (2017) Vagal regulation of group 3 innate lymphoid cells and the immunoresolvent PCTR1 controls infection resolution. *Immunity* 46(1):92–105. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.12.009>
223. Serhan CN, Chiang N, Dalli J, Levy BD (2014) Lipid mediators in the resolution of inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7(2):a016311. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016311>
224. de Luis D, Domingo JC, Izaola O, Casanueva FF, Bellido D, Sajoux I (2016) Effect of DHA supplementation in a very low-calorie ketogenic diet in the treatment of obesity: a randomized clinical trial. *Endocrine* 54(1):111–122. <https://doi.org/10.1007/s12020-016-0964-z>
225. Lukiw WJ, Bazan NG (2010) Inflammatory, apoptotic, and survival gene signaling in Alzheimer's disease. A review on the bioactivity of neuroprotectin D1 and apoptosis. *Mol Neurobiol* 42(1):10–16. <https://doi.org/10.1007/s12035-010-8126-4>
226. Grenon SM, Owens CD, Nosova EV, Hughes-Fulford M, Alley HF, Chong K, Perez S, Yen PK, Boscardin J, Hellmann J, Spite M, Conte MS (2015) Short-term, high-dose fish oil supplementation increases the production of omega-3 fatty acid-derived mediators in patients with peripheral artery disease (the OMEGA-PAD I trial). *J Am Heart Assoc* 4(8):e002034. <https://doi.org/10.1161/JAHA.115.002034>
227. Perucci LO, Sugimoto MA, Gomes KB, Dusse LM, Teixeira MM, Sousa LP (2017) Annexin A1 and specialized proresolving lipid mediators: promoting resolution as a therapeutic strategy in human inflammatory diseases. *Expert Opin Ther Targets* 21(9):879–896. <https://doi.org/10.1080/14728222.2017.1364363>
228. Oliveira LG, Souza-Testasica MC, Vago JP, Figueiredo AB, Canavaci AM, Perucci LO, Ferreira TP, Coelho EA, Goncalves DU, Rocha MO, PM ES, Ferreira CN, Queiroz-Junior C, Sousa LP, Fernandes AP (2017) Annexin A1 is involved in the resolution of inflammatory responses during Leishmania braziliensis infection. *J Immunol* 198(8):3227–3236. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1602028>
229. Norling LV, Perretti M (2013) The role of omega-3 derived resolvins in arthritis. *Curr Opin Pharmacol* 13(3):476–481. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2013.02.003>
230. Jones HR, Robb CT, Perretti M, Rossi AG (2016) The role of neutrophils in inflammation resolution. *Semin Immunol* 28(2):137–145. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2016.03.007>
231. Ahmed TJ, Kaneva MK, Pitzalis C, Cooper D, Perretti M (2014) Resolution of inflammation: examples of peptidergic players and pathways. *Drug Discov Today* 19(8):1166–1171. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.05.020>
232. Lima KM, Vago JP, Caux TR, Negreiros-Lima GL, Sugimoto MA, Tavares LP, Arribada RG, Carmo AAF, Galvao I, Costa BRC, Soriani FM, Pinho V, Solito E, Perretti M, Teixeira MM, Sousa LP (2017) The resolution of acute inflammation induced by cyclic AMP is dependent on annexin A1. *J Biol Chem* 292(33):13758–13773. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.800391>
233. Svensson CI, Zattoni M, Serhan CN (2007) Lipoxins and aspirin-triggered lipoxin inhibit inflammatory pain processing. *J Exp Med* 204(2):245–252. <https://doi.org/10.1084/jem.20061826>
234. Maddox JF, Colgan SP, Clish CB, Petasis NA, Fokin VV, Serhan CN (1998) Lipoxin B4 regulates human

- monocyte/neutrophil adherence and motility: design of stable lipoxin B4 analogs with increased biologic activity. *FASEB J* 12(6):487–494
235. Devchand PR, Arita M, Hong S, Bannenberg G, Moussignac RL, Gronert K, Serhan CN (2003) Human ALX receptor regulates neutrophil recruitment in transgenic mice: roles in inflammation and host defense. *FASEB J* 17(6):652–659. <https://doi.org/10.1096/fj.02-0770com>
 236. Morris T, Stables M, Hobbs A, de Souza P, Colville-Nash P, Warner T, Newson J, Belligan G, Gilroy DW (2009) Effects of low-dose aspirin on acute inflammatory responses in humans. *J Immunol* 183(3):2089–2096. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900477>
 237. Reis MB, Pereira PAT, Caetano GF, Leite MN, Galvao AF, Paula-Silva FWG, Frade MAC, Faccioli LH (2017) Lipoxin A4 encapsulated in PLGA microparticles accelerates wound healing of skin ulcers. *PLoS One* 12(7):e0182381. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182381>
 238. Soyombo O, Spur BW, Lee TH (1994) Effects of lipoxin A4 on chemotaxis and degranulation of human eosinophils stimulated by platelet-activating factor and N-formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-phenylalanine. *Allergy* 49(4):230–234
 239. Qiu FH, Devchand PR, Wada K, Serhan CN (2001) Aspirin-triggered lipoxin A4 and lipoxin A4 up-regulate transcriptional corepressor NAB1 in human neutrophils. *FASEB J* 15(14):2736–2738. <https://doi.org/10.1096/fj.01-0576fje>
 240. Hachicha M, Pouliot M, Petasis NA, Serhan CN (1999) Lipoxin (LX)A4 and aspirin-triggered 15-epi-LXA4 inhibit tumor necrosis factor 1 α -initiated neutrophil responses and trafficking: regulators of a cytokine-chemokine axis. *J Exp Med* 189(12):1923–1930
 241. Karra L, Haworth O, Priluck R, Levy BD, Levi-Schaffer F (2015) Lipoxin B(4) promotes the resolution of allergic inflammation in the upper and lower airways of mice. *Mucosal Immunol* 8(4):852–862. <https://doi.org/10.1038/mi.2014.116>
 242. Godson C, Mitchell S, Harvey K, Petasis NA, Hogg N, Brady HR (2000) Cutting edge: lipoxins rapidly stimulate nonphlogistic phagocytosis of apoptotic neutrophils by monocyte-derived macrophages. *J Immunol* 164(4):1663–1667
 243. Mitchell S, Thomas G, Harvey K, Cottell D, Reville K, Berlasconi G, Petasis NA, Erwig L, Rees AJ, Savill J, Brady HR, Godson C (2002) Lipoxins, aspirin-triggered epi-lipoxins, lipoxin stable analogues, and the resolution of inflammation: stimulation of macrophage phagocytosis of apoptotic neutrophils in vivo. *J Am Soc Nephrol* 13(10):2497–2507
 244. Reville K, Crean JK, Vivers S, Dransfield I, Godson C (2006) Lipoxin A4 redistributes myosin IIa and Cdc42 in macrophages: implications for phagocytosis of apoptotic leukocytes. *J Immunol* 176(3):1878–1888
 245. Grumbach Y, Quynh NV, Chiron R, Urbach V (2009) LXA4 stimulates ZO-1 expression and transepithelial electrical resistance in human airway epithelial (16HBE14o-) cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 296(1):L101–L108. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00018.2008>
 246. Hawkins KE, DeMars KM, Alexander JC, de Leon LG, Pacheco SC, Graves C, Yang C, McCrea AO, Frankowski JC, Garrett TJ, Febo M, Candelario-Jalil E (2017) Targeting resolution of neuroinflammation after ischemic stroke with a lipoxin A4 analog: protective mechanisms and long-term effects on neurological recovery. *Brain Behav* 7(5):e00688. <https://doi.org/10.1002/brb3.688>
 247. Barden AE, Moghaddami M, Mas E, Phillips M, Cleland LG, Mori TA (2016) Specialised pro-resolving mediators of inflammation in inflammatory arthritis. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 107:24–29. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2016.03.004>
 248. Jo YY, Lee JY, Park CK (2016) Resolvin E1 inhibits substance P-induced potentiation of TRPV1 in primary sensory neurons. *Mediat Inflamm* 2016:5259321. <https://doi.org/10.1155/2016/5259321>
 249. Tjonahen E, Oh SF, Siegelman J, Elangovan S, Percarpio KB, Hong S, Arita M, Serhan CN (2006) Resolvin E2: identification and anti-inflammatory actions: pivotal role of human 5-lipoxygenase in resolvin E series biosynthesis. *Chem Biol* 13(11):1193–1202. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2006.09.011>
 250. Rajasagi NK, Reddy PB, Mulik S, Gjorstrup P, Rouse BT (2013) Neuroprotectin D1 reduces the severity of herpes simplex virus-induced corneal immunopathology. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 54(9):6269–6279. <https://doi.org/10.1167/iovs.13-12152>
 251. Rajasagi NK, Reddy PB, Suryawanshi A, Mulik S, Gjorstrup P, Rouse BT (2011) Controlling herpes simplex virus-induced ocular inflammatory lesions with the lipid-derived mediator resolvin E1. *J Immunol* 186(3):1735–1746. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003456>
 252. Rey C, Nadjar A, Buaud B, Vaysse C, Aubert A, Pallet V, Laye S, Joffre C (2016) Resolvin D1 and E1 promote resolution of inflammation in microglial cells in vitro. *Brain Behav Immun* 55:249–259. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.12.013>
 253. Herrera BS, Hasturk H, Kantarci A, Freire MO, Nguyen O, Kansal S, Van Dyke TE (2015) Impact of resolvin E1 on murine neutrophil phagocytosis in type 2 diabetes. *Infect Immun* 83(2):792–801. <https://doi.org/10.1128/IAI.02444-14>
 254. Hasturk H, Kantarci A, Ohira T, Arita M, Ebrahimi N, Chiang N, Petasis NA, Levy BD, Serhan CN, Van Dyke TE (2006) RvE1 protects from local inflammation and osteoclast-mediated bone destruction in periodontitis. *FASEB J* 20(2):401–403. <https://doi.org/10.1096/fj.05-4724fje>
 255. Hasturk H, Kantarci A, Goguet-Surmenian E, Blackwood A, Andry C, Serhan CN, Van Dyke TE (2007) Resolvin E1 regulates inflammation at the cellular and tissue level and restores tissue homeostasis in vivo. *J Immunol* 179(10):7021–7029

256. Aoki H, Hisada T, Ishizuka T, Utsugi M, Kawata T, Shimizu Y, Okajima F, Dobashi K, Mori M (2008) Resolvin E1 dampens airway inflammation and hyperresponsiveness in a murine model of asthma. *Biochem Biophys Res Commun* 367(2):509–515. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.01.012>
257. Lee CT, Teles R, Kantarci A, Chen T, McCafferty J, Starr JR, Brito LC, Paster BJ, Van Dyke TE (2016) Resolvin E1 reverses experimental periodontitis and dysbiosis. *J Immunol* 197(7):2796–2806. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600859>
258. Salic K, Morrison MC, Verschuren L, Wielinga PY, Wu L, Kleemann R, Gjorstrup P, Kooistra T (2016) Resolvin E1 attenuates atherosclerosis in absence of cholesterol-lowering effects and on top of atorvastatin. *Atherosclerosis* 250:158–165. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2016.05.001>
259. Dona M, Fredman G, Schwab JM, Chiang N, Arita M, Goodarzi A, Cheng G, von Andrian UH, Serhan CN (2008) Resolvin E1, an EPA-derived mediator in whole blood, selectively counterregulates leukocytes and platelets. *Blood* 112(3):848–855. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-11-122598>
260. 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(3):707–720. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00909.x>
261. Quan-Xin F, Fan F, Xiang-Ying F, Shu-Jun L, Shi-Qi W, Zhao-Xu L, Xu-Jie Z, Qing-Chuan Z, Wei W (2012) Resolvin D1 reverses chronic pancreatitis-induced mechanical allodynia, phosphorylation of NMDA receptors, and cytokines expression in the thoracic spinal dorsal horn. *BMC Gastroenterol* 12:148. <https://doi.org/10.1186/1471-230X-12-148>
262. Lima-Garcia JF, Dutra RC, da Silva K, Motta EM, Campos MM, Calixto JB (2011) The precursor of resolvin D series and aspirin-triggered resolvin D1 display anti-hyperalgesic properties in adjuvant-induced arthritis in rats. *Br J Pharmacol* 164(2):278–293. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01345.x>
263. Oehler B, Mohammadi M, Perpina Viciano C, Hackel D, Hoffmann C, Brack A, Rittner HL (2017) Peripheral interaction of resolvin D1 and E1 with opioid receptor antagonists for antinociception in inflammatory pain in rats. *Front Mol Neurosci* 10:242. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00242>
264. Bento AF, Claudino RF, Dutra RC, Marcon R, Calixto JB (2011) Omega-3 fatty acid-derived mediators 17(R)-hydroxy docosahexaenoic acid, aspirin-triggered resolvin D1 and resolvin D2 prevent experimental colitis in mice. *J Immunol* 187(4):1957–1969. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101305>
265. Croasdell A, Thatcher TH, Kottmann RM, Colas RA, Dalli J, Serhan CN, Sime PJ, Phipps RP (2015) Resolvins attenuate inflammation and promote resolution in cigarette smoke-exposed human macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 309(8):L888–L901. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00125.2015>
266. Xu J, Gao X, Yang C, Chen L, Chen Z (2017) Resolvin D1 attenuates Mpp+ induced Parkinson disease via inhibiting inflammation in PC12 cells. *Med Sci Monit* 23:2684–2691
267. Yin Y, Chen F, Wang W, Wang H, Zhang X (2017) Resolvin D1 inhibits inflammatory response in STZ-induced diabetic retinopathy rats: possible involvement of NLRP3 inflammasome and NF-kappaB signaling pathway. *Mol Vis* 23:242–250
268. Park CK, Lu N, Xu ZZ, Liu T, Serhan CN, Ji RR (2011) Resolving TRPV1- and TNF-alpha-mediated spinal cord synaptic plasticity and inflammatory pain with neuroprotectin D1. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31(42):15072–15085. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2443-11.2011>
269. Bannenberg GL, Chiang N, Ariel A, Arita M, Tjonahen E, Gotlinger KH, Hong S, Serhan CN (2005) Molecular circuits of resolution: formation and actions of resolvins and protectins. *J Immunol* 174(7):4345–4355
270. Duffield JS, Hong S, Vaidya VS, Lu Y, Fredman G, Serhan CN, Bonventre JV (2006) Resolvin D series and protectin D1 mitigate acute kidney injury. *J Immunol* 177(9):5902–5911
271. Ren J, Meng S, Yan B, Yu J, Liu J (2016) Protectin D1 reduces concanavalin A-induced liver injury by inhibiting NF-kappaB-mediated CX3CL1/CX3CR1 axis and NLR family, pyrin domain containing 3 inflammasome activation. *Mol Med Rep* 13(4):3627–3638. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.4980>
272. Zhu M, Wang X, Hjorth E, Colas RA, Schroeder L, Granholm AC, Serhan CN, Schultzberg M (2016) Pro-resolving lipid mediators improve neuronal survival and increase Abeta42 phagocytosis. *Mol Neurobiol* 53(4):2733–2749. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9544-0>
273. Serhan CN, Chiang N, Dalli J (2015) The resolution code of acute inflammation: novel pro-resolving lipid mediators in resolution. *Semin Immunol* 27(3):200–215. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2015.03.004>
274. Colas RA, Dalli J, Chiang N, Vlasakov I, Sanger JM, Riley IR, Serhan CN (2016) Identification and actions of the maresin 1 metabolome in infectious inflammation. *J Immunol* 197(11):4444–4452. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600837>
275. Rius B, Duran-Guell M, Flores-Costa R, Lopez-Vicario C, Lopategi A, Alcaraz-Quiles J, Casulleras M, Lozano JJ, Titos E, Claria J (2017) The specialized pro-resolving lipid mediator maresin 1 protects hepatocytes from lipotoxic and hypoxia-induced endoplasmic reticulum stress. *FASEB J*. <https://doi.org/10.1096/fj.201700394R>
276. Krishnaamoorthy N, Burkett PR, Dalli J, Abdounour RE, Colas R, Ramon S, Phipps RP, Petasis NA, Kuchroo VK, Serhan CN, Levy BD (2015) Cutting edge: maresin-1 engages regulatory T cells to limit type 2 innate lymphoid cell activa-

- tion and promote resolution of lung inflammation. *J Immunol* 194(3):863–867. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402534>
277. Martinez-Fernandez L, Gonzalez-Muniesa P, Laiglesia LM, Sainz N, Prieto-Hontoria PL, Escote X, Odriozola L, Corrales FJ, Arbones-Mainar JM, Martinez JA, Moreno-Aliaga MJ (2017) Maresin 1 improves insulin sensitivity and attenuates adipose tissue inflammation in ob/ob and diet-induced obese mice. *FASEB J* 31(5):2135–2145. <https://doi.org/10.1096/fj.201600859R>
 278. Tang S, Gao C, Long Y, Huang W, Chen J, Fan F, Jiang C, Xu Y (2017) Maresin 1 mitigates high glucose-induced mouse glomerular mesangial cell injury by inhibiting inflammation and fibrosis. *Mediat Inflamm* 2017:2438247. <https://doi.org/10.1155/2017/2438247>
 279. Lannan KL, Spinelli SL, Blumberg N, Phipps RP (2017) Maresin 1 induces a novel pro-resolving phenotype in human platelets. *J Thromb Haemost* 15(4):802–813. <https://doi.org/10.1111/jth.13620>
 280. Viola JR, Lemnitzer P, Jansen Y, Csaba G, Winter C, Neideck C, Silvestre-Roig C, Dittmar G, Doring Y, Drechsler M, Weber C, Zimmer R, Cenac N, Soehnlein O (2016) Resolving lipid mediators maresin 1 and resolvin D2 prevent atheroprogession in mice. *Circ Res* 119(9):1030–1038. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.309492>
 281. Perretti M, Flower RJ (1993) Modulation of IL-1-induced neutrophil migration by dexamethasone and lipocortin 1. *J Immunol* 150(3):992–999
 282. Lim LH, Solito E, Russo-Marie F, Flower RJ, Perretti M (1998) Promoting detachment of neutrophils adherent to murine postcapillary venules to control inflammation: effect of lipocortin 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(24):14535–14539
 283. Walther A, Riehemann K, Gerke V (2000) A novel ligand of the formyl peptide receptor: annexin I regulates neutrophil extravasation by interacting with the FPR. *Mol Cell* 5(5):831–840
 284. Hayhoe RP, Kamal AM, Solito E, Flower RJ, Cooper D, Perretti M (2006) Annexin 1 and its bioactive peptide inhibit neutrophil-endothelium interactions under flow: indication of distinct receptor involvement. *Blood* 107(5):2123–2130. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-08-3099>
 285. Pederzoli-Ribeil M, Maione F, Cooper D, Al-Kashi A, Dalli J, Perretti M, D'Acquisto F (2010) Design and characterization of a cleavage-resistant Annexin A1 mutant to control inflammation in the microvasculature. *Blood* 116(20):4288–4296. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-02-270520>
 286. McKanna JA (1995) Lipocortin 1 in apoptosis: mammary regression. *Anat Rec* 242(1):1–10. <https://doi.org/10.1002/ar.1092420102>
 287. Sakamoto T, Repasky WT, Uchida K, Hirata A, Hirata F (1996) Modulation of cell death pathways to apoptosis and necrosis of H2O2-treated rat thymocytes by lipocortin I. *Biochem Biophys Res Commun* 220(3):643–647. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.0457>
 288. Wang W, Post JI, Dow KE, Shin SH, Riopelle RJ, Ross GM (1999) Zinc and copper inhibit nerve growth factor-mediated protection from oxidative stress-induced apoptosis. *Neurosci Lett* 259(2):115–118
 289. Solito E, de Coupade C, Canaider S, Goulding NJ, Perretti M (2001) Transfection of annexin 1 in monocytic cells produces a high degree of spontaneous and stimulated apoptosis associated with caspase-3 activation. *Br J Pharmacol* 133(2):217–228. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704054>
 290. Debret R, El Btaouri H, Duca L, Rahman I, Radke S, Haye B, Sallenave JM, Antonicelli F (2003) Annexin A1 processing is associated with caspase-dependent apoptosis in BZR cells. *FEBS Lett* 546(2–3):195–202
 291. Maderna P, Yona S, Perretti M, Godson C (2005) Modulation of phagocytosis of apoptotic neutrophils by supernatant from dexamethasone-treated macrophages and annexin-derived peptide Ac(2-26). *J Immunol* 174(6):3727–3733
 292. Scannell M, Flanagan MB, deStefani A, Wynne KJ, Cagney G, Godson C, Maderna P (2007) Annexin-1 and peptide derivatives are released by apoptotic cells and stimulate phagocytosis of apoptotic neutrophils by macrophages. *J Immunol* 178(7):4595–4605
 293. Blume KE, Soeroes S, Waibel M, Keppeler H, Wesselborg S, Herrmann M, Schulze-Osthoff K, Lauber K (2009) Cell surface externalization of annexin A1 as a failsafe mechanism preventing inflammatory responses during secondary necrosis. *J Immunol* 183(12):8138–8147. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902250>
 294. Wu CC, Croxtall JD, Perretti M, Bryant CE, Thiernemann C, Flower RJ, Vane JR (1995) Lipocortin 1 mediates the inhibition by dexamethasone of the induction by endotoxin of nitric oxide synthase in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(8):3473–3477
 295. Minghetti L, Nicolini A, Polazzi E, Greco A, Perretti M, Parente L, Levi G (1999) Down-regulation of microglial cyclo-oxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression by lipocortin 1. *Br J Pharmacol* 126(6):1307–1314. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0702423>
 296. Ferlazzo V, D'Agostino P, Milano S, Caruso R, Feo S, Cillari E, Parente L (2003) Anti-inflammatory effects of annexin-1: stimulation of IL-10 release and inhibition of nitric oxide synthesis. *Int Immunopharmacol* 3(10–11):1363–1369. [https://doi.org/10.1016/S1567-5769\(03\)00133-4](https://doi.org/10.1016/S1567-5769(03)00133-4)
 297. Gavins FN, Dalli J, Flower RJ, Granger DN, Perretti M (2007) Activation of the annexin 1 counter-regulatory circuit affords protection in the mouse brain microcirculation. *FASEB J* 21(8):1751–1758. <https://doi.org/10.1096/fj.06-7842com>

298. Martin GR, Perretti M, Flower RJ, Wallace JL (2008) Annexin-1 modulates repair of gastric mucosal injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 294(3):G764–G769. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00531.2007>
299. Damazo AS, Sampaio AL, Nakata CM, Flower RJ, Perretti M, Oliani SM (2011) Endogenous annexin A1 counter-regulates bleomycin-induced lung fibrosis. *BMC Immunol* 12:59. <https://doi.org/10.1186/1471-2172-12-59>
300. Gavins FN, Hughes EL, Buss NA, Holloway PM, Getting SJ, Buckingham JC (2012) Leukocyte recruitment in the brain in sepsis: involvement of the annexin 1-FPR2/ALX anti-inflammatory system. *FASEB J* 26(12):4977–4989. <https://doi.org/10.1096/fj.12-205971>
301. Leoni G, Alam A, Neumann PA, Lambeth JD, Cheng G, McCoy J, Hilgarth RS, Kundu K, Murthy N, Kusters D, Reutelingsperger C, Perretti M, Parkos CA, Neish AS, Nusrat A (2013) Annexin A1, formyl peptide receptor, and NOX1 orchestrate epithelial repair. *J Clin Invest* 123(1):443–454. <https://doi.org/10.1172/JCI65831>
302. Locatelli I, Sutti S, Jindal A, Vacchiano M, Bozzola C, Reutelingsperger C, Kusters D, Bena S, Parola M, Paternostro C, Bugianesi E, McArthur S, Albano E, Perretti M (2014) Endogenous annexin A1 is a novel protective determinant in nonalcoholic steatohepatitis in mice. *Hepatology* 60(2):531–544. <https://doi.org/10.1002/hep.27141>
303. Kusters DH, Chatrou ML, Willems BA, De Saint-Hubert M, Bauwens M, van der Vorst E, Bena S, Biessen EA, Perretti M, Schurgers LJ, Reutelingsperger CP (2015) Pharmacological treatment with annexin A1 reduces atherosclerotic plaque burden in LDLR^{-/-} mice on western type diet. *PLoS One* 10(6):e0130484. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130484>
304. Galvao I, Dias AC, Tavares LD, Rodrigues IP, Queiroz-Junior CM, Costa VV, Reis AC, Ribeiro Oliveira RD, Louzada-Junior P, Souza DG, Leng L, Bucala R, Sousa LP, Bozza MT, Teixeira MM, Amaral FA (2016) Macrophage migration inhibitory factor drives neutrophil accumulation by facilitating IL-1beta production in a murine model of acute gout. *J Leukoc Biol* 99(6):1035–1043. <https://doi.org/10.1189/jlb.3MA0915-418R>
305. Taylor AW, Streilein JW, Cousins SW (1994) Alpha-melanocyte-stimulating hormone suppresses antigen-stimulated T cell production of gamma-interferon. *Neuroimmunomodulation* 1(3):188–194
306. Lipton JM, Catania A (1997) Anti-inflammatory actions of the neuroimmunomodulator alpha-MSH. *Immunol Today* 18(3):140–145
307. Manna SK, Sarkar A, Sreenivasan Y (2006) Alpha-melanocyte-stimulating hormone down-regulates CXC receptors through activation of neutrophil elastase. *Eur J Immunol* 36(3):754–769. <https://doi.org/10.1002/eji.200535209>
308. Delgado R, Carlin A, Airaghi L, Demitri MT, Meda L, Galimberti D, Baron P, Lipton JM, Catania A (1998) Melanocortin peptides inhibit production of proinflammatory cytokines and nitric oxide by activated microglia. *J Leukoc Biol* 63(6):740–745
309. Capsoni F, Ongari AM, Reali E, Catania A (2009) Melanocortin peptides inhibit urate crystal-induced activation of phagocytic cells. *Arthritis Res Ther* 11(5):R151. <https://doi.org/10.1186/ar2827>
310. Kaneva MK, Kerrigan MJ, Grieco P, Curley GP, Locke IC, Getting SJ (2012) Chondroprotective and anti-inflammatory role of melanocortin peptides in TNF-alpha activated human C-20/A4 chondrocytes. *Br J Pharmacol* 167(1):67–79. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.01968.x>
311. Auriemma M, Brzoska T, Klenner L, Kupas V, Goerge T, Voskort M, Zhao Z, Sparwasser T, Luger TA, Loser K (2012) Alpha-MSH-stimulated tolerogenic dendritic cells induce functional regulatory T cells and ameliorate ongoing skin inflammation. *J Invest Dermatol* 132(7):1814–1824. <https://doi.org/10.1038/jid.2012.59>
312. Bhardwaj R, Becher E, Mahnke K, Hartmeyer M, Schwarz T, Scholzen T, Luger TA (1997) Evidence for the differential expression of the functional alpha-melanocyte-stimulating hormone receptor MC-1 on human monocytes. *J Immunol* 158(7):3378–3384
313. Taylor A, Namba K (2001) In vitro induction of CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells by the neuropeptide alpha-melanocyte stimulating hormone (alpha-MSH). *Immunol Cell Biol* 79(4):358–367. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1711.2001.01022.x>
314. Mandrika I, Muceniece R, Wikberg JE (2001) Effects of melanocortin peptides on lipopolysaccharide/interferon-gamma-induced NF-kappaB DNA binding and nitric oxide production in macrophage-like RAW 264.7 cells: evidence for dual mechanisms of action. *Biochem Pharmacol* 61(5):613–621
315. Becher E, Mahnke K, Brzoska T, Kalden DH, Grabbe S, Luger TA (1999) Human peripheral blood-derived dendritic cells express functional melanocortin receptor MC-1R. *Ann N Y Acad Sci* 885:188–195
316. Haycock JW, Wagner M, Morandini R, Ghanem G, Rennie IG, Mac Neil S (1999) Alpha-melanocyte-stimulating hormone inhibits NF-kappaB activation in human melanocytes and melanoma cells. *J Invest Dermatol* 113(4):560–566. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.1999.00739.x>
317. Manna SK, Aggarwal BB (1998) Alpha-melanocyte-stimulating hormone inhibits the nuclear transcription factor NF-kappa B activation induced by various inflammatory agents. *J Immunol* 161(6):2873–2880
318. Galimberti D, Baron P, Meda L, Prat E, Scarpini E, Delgado R, Catania A, Lipton JM, Scarlato G (1999) Alpha-MSH peptides inhibit production of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha by microglial cells activated with beta-amyloid and interferon

- gamma. *Biochem Biophys Res Commun* 263(1):251–256. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1276>
319. Brzoska T, Kalden DH, Scholzen T, Luger TA (1999) Molecular basis of the alpha-MSH/IL-1 antagonism. *Ann N Y Acad Sci* 885:230–238
 320. Scholzen TE, Sunderkotter C, Kalden DH, Brzoska T, Fastrich M, Fisbeck T, Armstrong CA, Ansel JC, Luger TA (2003) Alpha-melanocyte stimulating hormone prevents lipopolysaccharide-induced vasculitis by down-regulating endothelial cell adhesion molecule expression. *Endocrinology* 144(1):360–370. <https://doi.org/10.1210/en.2002-220651>
 321. Montero-Melendez T, Patel HB, Perretti M (2011) Role of melanocortin receptors in the regulation of gouty inflammation. *Curr Rheumatol Rep* 13(2):138–145. <https://doi.org/10.1007/s11926-011-0163-0>
 322. Toscano MA, Bianco GA, Ilarregui JM, Croci DO, Correale J, Hernandez JD, Zwirner NW, Poirier F, Riley EM, Baum LG, Rabinovich GA (2007) Differential glycosylation of TH1, TH2 and TH-17 effector cells selectively regulates susceptibility to cell death. *Nat Immunol* 8(8):825–834. <https://doi.org/10.1038/ni1482>
 323. Norling LV, Sampaio AL, Cooper D, Perretti M (2008) Inhibitory control of endothelial galectin-1 on *in vitro* and *in vivo* lymphocyte trafficking. *FASEB J* 22(3):682–690. <https://doi.org/10.1096/fj.07-9268com>
 324. Rabinovich GA, Sotomayor CE, Riera CM, Bianco I, Correa SG (2000) Evidence of a role for galectin-1 in acute inflammation. *Eur J Immunol* 30(5):1331–1339. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(200005\)30:5<#60:1331::AID-IMMU1331>#62;3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(200005)30:5<#60:1331::AID-IMMU1331>#62;3.0.CO;2-H)
 325. Correa SG, Sotomayor CE, Aoki MP, Maldonado CA, Rabinovich GA (2003) Opposite effects of galectin-1 on alternative metabolic pathways of L-arginine in resident, inflammatory, and activated macrophages. *Glycobiology* 13(2):119–128. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwg010>
 326. Barrionuevo P, Beigier-Bompadre M, Ilarregui JM, Toscano MA, Bianco GA, Isturiz MA, Rabinovich GA (2007) A novel function for galectin-1 at the crossroad of innate and adaptive immunity: galectin-1 regulates monocyte/macrophage physiology through a nonapoptotic ERK-dependent pathway. *J Immunol* 178(1):436–445
 327. Ilarregui JM, Croci DO, Bianco GA, Toscano MA, Salatino M, Vermeulen ME, Geffner JR, Rabinovich GA (2009) Tolerogenic signals delivered by dendritic cells to T cells through a galectin-1-driven immunoregulatory circuit involving interleukin 27 and interleukin 10. *Nat Immunol* 10(9):981–991. <https://doi.org/10.1038/ni.1772>
 328. van der Leij J, van den Berg A, Harms G, Eschbach H, Vos H, Zwieters P, van Weeghel R, Groen H, Poppema S, Visser L (2007) Strongly enhanced IL-10 production using stable galectin-1 homodimers. *Mol Immunol* 44(4):506–513. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2006.02.011>
 329. Stowell SR, Qian Y, Karmakar S, Koyama NS, Dias-Baruffi M, Leffler H, McEver RP, Cummings RD (2008) Differential roles of galectin-1 and galectin-3 in regulating leukocyte viability and cytokine secretion. *J Immunol* 180(5):3091–3102
 330. Cedeno-Laurent F, Barthel SR, Opperman MJ, Lee DM, Clark RA, Dimitroff CJ (2010) Development of a nascent galectin-1 chimeric molecule for studying the role of leukocyte galectin-1 ligands and immune disease modulation. *J Immunol* 185(8):4659–4672. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000715>
 331. Rostoker R, Yaseen H, Schiff-Zuck S, Lichtenstein RG, Rabinovich GA, Ariel A (2013) Galectin-1 induces 12/15-lipoxygenase expression in murine macrophages and favors their conversion toward a pro-resolving phenotype. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 107:85–94. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2013.08.001>
 332. Katoh S, Nobumoto A, Matsumoto N, Matsumoto K, Ehara N, Niki T, Inada H, Nishi N, Yamauchi A, Fukushima K, Hirashima M (2010) Involvement of galectin-9 in lung eosinophilia in patients with eosinophilic pneumonia. *Int Arch Allergy Immunol* 153(3):294–302. <https://doi.org/10.1159/000314371>
 333. Niki T, Tsutsui S, Hirose S, Aradono S, Sugimoto Y, Takeshita K, Nishi N, Hirashima M (2009) Galectin-9 is a high affinity IgE-binding lectin with anti-allergic effect by blocking IgE-antigen complex formation. *J Biol Chem* 284(47):32344–32352. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.035196>
 334. Oomizu S, Arikawa T, Niki T, Kadowaki T, Ueno M, Nishi N, Yamauchi A, Hirashima M (2012) Galectin-9 suppresses Th17 cell development in an IL-2-dependent but Tim-3-independent manner. *Clin Immunol* 143(1):51–58. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2012.01.004>
 335. Whiteman M, Armstrong JS, Chu SH, Jia-Ling S, Wong BS, Cheung NS, Halliwell B, Moore PK (2004) The novel neuromodulator hydrogen sulfide: an endogenous peroxynitrite 'scavenger'? *J Neurochem* 90(3):765–768. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02617.x>
 336. Whiteman M, Cheung NS, Zhu YZ, Chu SH, Siau JL, Wong BS, Armstrong JS, Moore PK (2005) Hydrogen sulphide: a novel inhibitor of hypochlorous acid-mediated oxidative damage in the brain? *Biochem Biophys Res Commun* 326(4):794–798. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.11.110>
 337. Whiteman M, Li L, Rose P, Tan CH, Parkinson DB, Moore PK (2010) The effect of hydrogen sulfide donors on lipopolysaccharide-induced formation of inflammatory mediators in macrophages. *Antioxid Redox Signal* 12(10):1147–1154. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2899>
 338. Muzaffar S, Shukla N, Bond M, Newby AC, Angelini GD, Sparatore A, Del Soldato P, Jeremy JY (2008) Exogenous hydrogen sulfide inhibits superoxide formation, NOX-1 expression and Rac1 activity in human vascular smooth muscle

- cells. *J Vasc Res* 45(6):521–528. <https://doi.org/10.1159/000129686>
339. Distrutti E, Sediari L, Mencarelli A, Renga B, Orlandi S, Antonelli E, Roviezzo F, Morelli A, Cirino G, Wallace JL, Fiorucci S (2006) Evidence that hydrogen sulfide exerts antinociceptive effects in the gastrointestinal tract by activating KATP channels. *J Pharmacol Exp Ther* 316(1):325–335. <https://doi.org/10.1124/jpet.105.091595>
 340. Zanardo RC, Brancaleone V, Distrutti E, Fiorucci S, Cirino G, Wallace JL (2006) Hydrogen sulfide is an endogenous modulator of leukocyte-mediated inflammation. *FASEB J* 20(12):2118–2120. <https://doi.org/10.1096/fj.06-6270fje>
 341. Goubern M, Andriamihaja M, Nubel T, Blachier F, Bouillaud F (2007) Sulfide, the first inorganic substrate for human cells. *FASEB J* 21(8):1699–1706. <https://doi.org/10.1096/fj.06-7407com>
 342. Lagoutte E, Mimoun S, Andriamihaja M, Chaumontet C, Blachier F, Bouillaud F (2010) Oxidation of hydrogen sulfide remains a priority in mammalian cells and causes reverse electron transfer in colonocytes. *Biochim Biophys Acta* 1797(8):1500–1511. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.04.004>
 343. Mimoun S, Andriamihaja M, Chaumontet C, Atanasiu C, Benamouzig R, Blouin JM, Tome D, Bouillaud F, Blachier F (2012) Detoxification of H₂S by differentiated colonic epithelial cells: implication of the sulfide oxidizing unit and of the cell respiratory capacity. *Antioxid Redox Signal* 17(1):1–10. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4186>
 344. Li L, Rossoni G, Sparatore A, Lee LC, Del Soldato P, Moore PK (2007) Anti-inflammatory and gastrointestinal effects of a novel diclofenac derivative. *Free Radic Biol Med* 42(5):706–719. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2006.12.011>
 345. Wallace JL, Dickey M, McKnight W, Martin GR (2007) Hydrogen sulfide enhances ulcer healing in rats. *FASEB J* 21(14):4070–4076. <https://doi.org/10.1096/fj.07-8669com>
 346. Mok YY, Moore PK (2008) Hydrogen sulphide is pro-inflammatory in haemorrhagic shock. *Inflamm Res* 57(11):512–518. <https://doi.org/10.1007/s00111-008-7231-6>
 347. Mariggio MA, Minunno V, Riccardi S, Santacroce R, De Rinaldis P, Fumarulo R (1998) Sulfide enhancement of PMN apoptosis. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 20(3):399–408. <https://doi.org/10.3109/08923979809034822>
 348. Papapetropoulos A, Pyriochou A, Altaany Z, Yang G, Marazioti A, Zhou Z, Jeschke MG, Branski LK, Herndon DN, Wang R, Szabo C (2009) Hydrogen sulfide is an endogenous stimulator of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(51):21972–21977. <https://doi.org/10.1073/pnas.0908047106>
 349. Jang H, Oh MY, Kim YJ, Choi IY, Yang HS, Ryu WS, Lee SH, Yoon BW (2014) Hydrogen sulfide treatment induces angiogenesis after cerebral ischemia. *J Neurosci Res* 92(11):1520–1528. <https://doi.org/10.1002/jnr.23427>
 350. Blackler RW, Gemici B, Manko A, Wallace JL (2014) NSAID-gastroenteropathy: new aspects of pathogenesis and prevention. *Curr Opin Pharmacol* 19:11–16. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2014.05.008>
 351. Motta JP, Flannigan KL, Agbor TA, Beatty JK, Blackler RW, Workentine ML, Da Silva GJ, Wang R, Buret AG, Wallace JL (2015) Hydrogen sulfide protects from colitis and restores intestinal microbiota biofilm and mucus production. *Inflamm Bowel Dis* 21(5):1006–1017. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000345>
 352. Palinkas Z, Furtmuller PG, Nagy A, Jakopitsch C, Pirker KF, Magierowski M, Jasnos K, Wallace JL, Obinger C, Nagy P (2015) Interactions of hydrogen sulfide with myeloperoxidase. *Br J Pharmacol* 172(6):1516–1532. <https://doi.org/10.1111/bph.12769>
 353. Nicotera P, Brune B, Bagetta G (1997) Nitric oxide: inducer or suppressor of apoptosis? *Trends Pharmacol Sci* 18(6):189–190
 354. Kim YM, Bombeck CA, Billiar TR (1999) Nitric oxide as a bifunctional regulator of apoptosis. *Circ Res* 84(3):253–256
 355. Brune B (2005) The intimate relation between nitric oxide and superoxide in apoptosis and cell survival. *Antioxid Redox Signal* 7(3–4):497–507. <https://doi.org/10.1089/ars.2005.7.497>
 356. Guillen MI, Megias J, Clerigues V, Gomar F, Alcaraz MJ (2008) The CO-releasing molecule CORM-2 is a novel regulator of the inflammatory process in osteoarthritic chondrocytes. *Rheumatology (Oxford)* 47(9):1323–1328. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/ken264>
 357. Megias J, Guillen MI, Bru A, Gomar F, Alcaraz MJ (2008) The carbon monoxide-releasing molecule tricarbonyldichlororuthenium(II) dimer protects human osteoarthritic chondrocytes and cartilage from the catabolic actions of interleukin-1beta. *J Pharmacol Exp Ther* 325(1):56–61. <https://doi.org/10.1124/jpet.107.134650>
 358. Urquhart P, Rosignoli G, Cooper D, Motterlini R, Perretti M (2007) Carbon monoxide-releasing molecules modulate leukocyte-endothelial interactions under flow. *J Pharmacol Exp Ther* 321(2):656–662. <https://doi.org/10.1124/jpet.106.117218>
 359. Chiang N, Shinohara M, Dalli J, Mirakaj V, Kibi M, Choi AM, Serhan CN (2013) Inhaled carbon monoxide accelerates resolution of inflammation via unique proresolving mediator-heme oxygenase-1 circuits. *J Immunol* 190(12):6378–6388. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202969>
 360. Motterlini R, Foresti R (2014) Heme oxygenase-1 as a target for drug discovery. *Antioxid Redox Signal* 20(11):1810–1826. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5658>
 361. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43(2):109–142
 362. Armstrong R (2001) The physiological role and pharmacological potential of nitric oxide in neutrophil activation. *Int Immunopharmacol* 1(8):1501–1512

363. Ma L, Wallace JL (2000) Endothelial nitric oxide synthase modulates gastric ulcer healing in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279(2):G341–G346
364. Pilane CM, LaBelle EF (2004) NO induced apoptosis of vascular smooth muscle cells accompanied by ceramide increase. *J Cell Physiol* 199(2):310–315. <https://doi.org/10.1002/jcp.10464>
365. Ridnour LA, Thomas DD, Switzer C, Flores-Santana W, Isenberg JS, Ambs S, Roberts DD, Wink DA (2008) Molecular mechanisms for discrete nitric oxide levels in cancer. *Nitric Oxide Biol Chem* 19(2):73–76. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2008.04.006>
366. Burke AJ, Sullivan FJ, Giles FJ, Glynn SA (2013) The yin and yang of nitric oxide in cancer progression. *Carcinogenesis* 34(3):503–512. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgt034>
367. Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, Wang H, Abumrad N, Eaton JW, Tracey KJ (2000) Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* 405(6785):458–462. <https://doi.org/10.1038/35013070>
368. Bernik TR, Friedman SG, Ochani M, DiRaimo R, Ulloa L, Yang H, Sudan S, Czura CJ, Ivanova SM, Tracey KJ (2002) Pharmacological stimulation of the cholinergic antiinflammatory pathway. *J Exp Med* 195(6):781–788
369. Guarini S, Altavilla D, Cainazzo MM, Giuliani D, Bigiani A, Marini H, Squadrito G, Minutoli L, Bertolini A, Marini R, Adamo EB, Venuti FS, Squadrito F (2003) Efferent vagal fibre stimulation blunts nuclear factor-kappaB activation and protects against hypovolemic hemorrhagic shock. *Circulation* 107(8):1189–1194
370. van Westerloo DJ, Giebelen IA, Florquin S, Daalhuisen J, Bruno MJ, de Vos AF, Tracey KJ, van der Poll T (2005) The cholinergic anti-inflammatory pathway regulates the host response during septic peritonitis. *J Infect Dis* 191(12):2138–2148. <https://doi.org/10.1086/430323>
371. Ghia JE, Blennerhassett P, El-Sharkawy RT, Collins SM (2007) The protective effect of the vagus nerve in a murine model of chronic relapsing colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 293(4):G711–G718. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00240.2007>
372. Rosas-Ballina M, Ochani M, Parrish WR, Ochani K, Harris YT, Huston JM, Chavan S, Tracey KJ (2008) Splenic nerve is required for cholinergic antiinflammatory pathway control of TNF in endotoxemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(31):11008–11013. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803237105>
373. Inoue T, Abe C, Sung SS, Moscalu S, Jankowski J, Huang L, Ye H, Rosin DL, Guyenet PG, Okusa MD (2016) Vagus nerve stimulation mediates protection from kidney ischemia-reperfusion injury through alpha7nAChR+ splenocytes. *J Clin Invest* 126(5):1939–1952. <https://doi.org/10.1172/JCI83658>
374. Huston JM, Ochani M, Rosas-Ballina M, Liao H, Ochani K, Pavlov VA, Gallowitsch-Puerta M, Ashok M, Czura CJ, Foxwell B, Tracey KJ, Ulloa L (2006) Splenectomy inactivates the cholinergic antiinflammatory pathway during lethal endotoxemia and polymicrobial sepsis. *J Exp Med* 203(7):1623–1628. <https://doi.org/10.1084/jem.20052362>
375. Mina-Osorio P, Rosas-Ballina M, Valdes-Ferrer SI, Al-Abed Y, Tracey KJ, Diamond B (2012) Neural signaling in the spleen controls B-cell responses to blood-borne antigen. *Mol Med* 18:618–627. <https://doi.org/10.2119/molmed.2012.00027>
376. Levine YA, Koopman FA, Faltys M, Caravaca A, Bendele A, Zitnik R, Vervoordeldonk MJ, Tak PP (2014) Neurostimulation of the cholinergic anti-inflammatory pathway ameliorates disease in rat collagen-induced arthritis. *PLoS One* 9(8):e104530. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104530>
377. Leib C, Goser S, Luthje D, Ottl R, Tretter T, Lasitschka F, Zittlich S, Pfitzer G, Katus HA, Kaya Z (2011) Role of the cholinergic antiinflammatory pathway in murine autoimmune myocarditis. *Circ Res* 109(2):130–140. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.245563>
378. Mao X, Xing H, Mao A, Jiang H, Cheng L, Liu Y, Quan X, Li L (2014) Netrin-1 attenuates cardiac ischemia reperfusion injury and generates alternatively activated macrophages. *Inflammation* 37(2):573–580. <https://doi.org/10.1007/s10753-013-9771-3>
379. Ly NP, Komatsuzaki K, Fraser IP, Tseng AA, Prodhon P, Moore KJ, Kinane TB (2005) Netrin-1 inhibits leukocyte migration in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(41):14729–14734. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506233102>
380. Aherne CM, Collins CB, Eltzschig HK (2013) Netrin-1 guides inflammatory cell migration to control mucosal immune responses during intestinal inflammation. *Tissue Barriers* 1(2):e24957. <https://doi.org/10.4161/tisb.24957>
381. Schlegel M, Kohler D, Korner A, Granja T, Straub A, Giera M, Mirakaj V (2016) The neuroimmune guidance cue netrin-1 controls resolution programs and promotes liver regeneration. *Hepatology* 63(5):1689–1705. <https://doi.org/10.1002/hep.28347>
382. Elajami TK, Colas RA, Dalli J, Chiang N, Serhan CN, Welty FK (2016) Specialized proresolving lipid mediators in patients with coronary artery disease and their potential for clot remodeling. *FASEB J* 30(8):2792–2801. <https://doi.org/10.1096/fj.201500155R>
383. Mirakaj V, Gatidou D, Potzsch C, Konig K, Rosenberger P (2011) Netrin-1 signaling dampens inflammatory peritonitis. *J Immunol* 186(1):549–555. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002671>
384. Serhan CN, Takano T, Gronert K, Chiang N, Clish CB (1999) Lipoxin and aspirin-triggered 15-epi-lipoxin cellular interactions anti-inflammatory lipid mediators. *Clin Chem Lab Med* 37(3):299–309. <https://doi.org/10.1515/CCLM.1999.052>

385. Pouliot M, Serhan CN (1999) Lipoxin A4 and aspirin-triggered 15-epi-LXA4 inhibit tumor necrosis factor- α -initiated neutrophil responses and trafficking: novel regulators of a cytokine-chemokine axis relevant to periodontal diseases. *J Periodontol Res* 34(7):370–373
386. Maddox JF, Serhan CN (1996) Lipoxin A4 and B4 are potent stimuli for human monocyte migration and adhesion: selective inactivation by dehydrogenation and reduction. *J Exp Med* 183(1):137–146
387. Serhan CN, Jain A, Marleau S, Clish C, Kantarci A, Behbehani B, Colgan SP, Stahl GL, Merched A, Petasis NA, Chan L, Van Dyke TE (2003) Reduced inflammation and tissue damage in transgenic rabbits overexpressing 15-Lipoxygenase and endogenous anti-inflammatory lipid mediators. *J Immunol* 171(12):6856–6865
388. Sugimoto MA, Ribeiro ALC, Costa BRC, Vago JP, Lima KM, Carneiro FS, Ortiz MMO, Lima GLN, Carmo AF, Rocha RM, Perez DA, Reis AC, Pinho V, Miles LA, Garcia CC, Teixeira MM, Sousa LP (2017) Plasmin and plasminogen induce macrophage reprogramming and regulate key steps of inflammation resolution via annexin A1. *Blood* 129(21):2896–2907. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-09-742825>
389. Bhardwaj RS, Schwarz A, Becher E, Mahnke K, Aragane Y, Schwarz T, Luger TA (1996) Pro-opiomelanocortin-derived peptides induce IL-10 production in human monocytes. *J Immunol* 156(7):2517–2521
390. La M, Cao TV, Cerchiaro G, Chilton K, Hirabayashi J, Kasai K, Oliani SM, Chernajovsky Y, Perretti M (2003) A novel biological activity for galectin-1. *Am J Pathol* 163(4):1505–1515
391. Bizzarro V, Belvedere R, Piazz FD, Parente L, Petrella A, Hotchin NA (2012) Annexin A1 induces skeletal muscle cell migration acting through formyl peptide receptors. *PLoS One* 7(10):e48246. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048246>
392. Campbell EL, Louis NA, Tomassetti SE, Canny GO, Arita M, Serhan CN, Colgan SP (2007) Resolvin E1 promotes mucosal surface clearance of neutrophils: a new paradigm for inflammatory resolution. *FASEB J* 21(12):3162–3170. <https://doi.org/10.1096/fj.07-8473com>
393. Haworth O, Cernadas M, Yang R, Serhan CN, Levy BD (2008) Resolvin E1 regulates interleukin 23, interferon- β and lipoxin A4 to promote the resolution of allergic airway inflammation. *Nat Immunol* 9(8):873–879. <https://doi.org/10.1038/ni.1627>
394. Jin Y, Arita M, Zhang Q, Saban DR, Chauhan SK, Chiang N, Serhan CN, Dana R (2009) Anti-angiogenesis effect of the novel antiinflammatory and pro-resolving lipid mediators. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50(10):4743–4752. <https://doi.org/10.1167/iovs.08-2462>
395. Dalli J, Winkler JW, Colas RA, Arnardottir H, Cheng CYC, Chiang N, Petasis NA, Serhan CN (2013) Resolvin D3 and aspirin-triggered resolvin D3 are potent immunoresolvents. *Chem Biol* 20(2):188–201. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2012.11.010>
396. Kebir DE, Gjorstrup P, Filep JG (2012) Resolvin E1 promotes phagocytosis-induced neutrophil apoptosis and accelerates resolution of pulmonary inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(37):14983–14988. <https://doi.org/10.1073/pnas.1206641109>
397. Pope NH, Salmon M, Davis JP, Chatterjee A, Su G, Conte MS, Ailawadi G, Upchurch GR (2016) D-series resolvins inhibit murine abdominal aortic aneurysm formation and increase M2 macrophage polarization. *FASEB J* 30(12):4192–4201. <https://doi.org/10.1096/fj.201600144RR>
398. Bazan NG, Eady TN, Khoutorova L, Atkins KD, Hong S, Lu Y, Zhang C, Jun B, Obenaus A, Fredman G, Zhu M, Winkler JW, Petasis NA, Serhan CN, Belayev L (2012) Novel aspirin-triggered neuroprotectin D1 attenuates cerebral ischemic injury after experimental stroke. *Exp Neurol* 236(1):122–130. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.04.007>
399. Mukherjee PK, Chawla A, Loayza MS, Bazan NG (2007) Docosanoids are multifunctional regulators of neural cell integrity and fate: significance in aging and disease. *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids* 77(5–6):233–238. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2007.10.022>
400. Mukherjee PK, Marcheselli VL, Barreiro S, Hu J, Bok D, Bazan NG (2007) Neurotrophins enhance retinal pigment epithelial cell survival through neuroprotectin D1 signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(32):13152–13157. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705949104>
401. Serhan CN, Yang R, Martinod K, Kasuga K, Pillai PS, Porter TF, Oh SF, Spite M (2009) Maresins: novel macrophage mediators with potent antiinflammatory and proresolving actions. *J Exp Med* 206(1):15–23. <https://doi.org/10.1084/jem.20081880>
402. Edenius C, Haeggström J, Lindgren JA (1988) Transcellular conversion of endogenous arachidonic acid to lipoxins in mixed human plateletgranulocyte suspensions. *Biochem Biophys Res Commun* 157(2):801–807
403. Perretti M, Leroy X, Bland EJ, Montero-Melendez T (2015) Resolution pharmacology: opportunities for therapeutic innovation in inflammation. *Trends Pharmacol Sci* 36(11):737–755. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2015.07.007>
404. Serhan CN (2005) Lipoxins and aspirin-triggered 15-epi-lipoxins are the first lipid mediators of endogenous anti-inflammation and resolution. *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids* 73(3–4):141–162. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2005.05.002>
405. Serhan CN (2007) Resolution phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and pro-resolving lipid mediators and pathways. *Annu Rev Immunol* 25(1):101–137. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141647>
406. Isobe Y, Arita M, Iwamoto R, Urabe D, Todoroki H, Masuda K, Inoue M, Arai H (2013) Stereochemical

- assignment and anti-inflammatory properties of the omega-3 lipid mediator resolvin E3. *J Biochem* 153(4):355–360. <https://doi.org/10.1093/jb/mvs151>
407. Capdevila JH, Wei S, Helvig C, Falck JR, Belosludtsev Y, Truan G, Graham-Lorence SE, Peterson JA (1996) The highly stereoselective oxidation of polyunsaturated fatty acids by cytochrome P450BM-3. *J Biol Chem* 271:22663–22671
408. Serhan CN, Fredman G, Yang R, Karamnov S, Belayev LS, Bazan NG, Zhu M, Winkler JW, Petasis NA (2011) Novel proresolving aspirin-triggered DHA pathway. *Chem Biol* 18(8):976–987. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2011.06.008>
409. Serhan CN, Yang R, Martinod K, Kasuga K, Pillai PS, Porter TF, Oh SF, Spite M (2009) Maresins: novel macrophage mediators with potent antiinflammatory and proresolving actions. *J Exp Med* 206(1):15–23. <https://doi.org/10.1084/jem.20081880>
410. Dalli J, Zhu M, Vlasenko NA, Deng B, Haeggström JZ, Petasis NA, Serhan CN (2013) The novel 13,14-epoxy-maresin is converted by human macrophages to maresin 1 (MaR1), inhibits leukotriene A hydroxylase (LTA H), and shifts macrophage phenotype. *FASEB J* 27(7):2573–2583. <https://doi.org/10.1096/fj.13-227728>
411. Dalli J, Chiang N, Serhan CN (2014) Identification of 14-series sulfido-conjugated mediators that promote resolution of infection and organ protection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(44):E4753–E4761. <https://doi.org/10.1073/pnas.1415006111>
412. Gobetti T, Cooray SN (2016) Annexin A1 and resolution of inflammation: tissue repairing properties and signalling signature. *Biol Chem* 397(10):981–993. <https://doi.org/10.1515/hsz-2016-0200>
413. Li Y, Cai L, Wang H, Wu P, Gu W, Chen Y, Hao H, Tang K, Yi P, Liu M, Miao S, Ye D (2011) Pleiotropic regulation of macrophage polarization and tumorigenesis by formyl peptide receptor-2. *Oncogene* 30(36):3887–3899. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.112>
414. Luger TA, Kalden DH, Scholzen TE, Brzoska T (2000) Alpha-melanocyte-stimulating hormone as a mediator of tolerance induction. *Pathobiology* 67(5-6):318–321. <https://doi.org/10.1159/000028089>
415. Chan LF, Metherell LA, Clark AJL (2011) Effects of melanocortins on adrenal gland physiology. *Eur J Pharmacol* 660(1):171–180. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.11.041>
416. Magenis RE, Smith L, Nadeau JH, Johnson KR, Mountjoy KG, Cone RD (1994) Mapping of the ACTH, MSH, and neural (MC3 and MC4) melanocortin receptors in the mouse and human. *Mamm Genome* 5:503–508
417. Mountjoy KG, Mortrud MT, Low MJ, Simerly RB, Cone RD (1994) Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain. *Mol Endocrinol* 8(10):1298–1308
418. Patel HB, Montero-Melendez T, Greco KV, Perretti M (2011) Melanocortin receptors as novel effectors of macrophage responses in inflammation. *Front Immunol* 2:41. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2011.00041>
419. Cummings RD, Liu FT (2009) Galectins. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD et al (eds) *Essentials of glycobiology*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. Chapter 33. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1944/>
420. Cooper D, Norling LV, Perretti M (2008) Novel insights into the inhibitory effects of Galectin-1 on neutrophil recruitment under flow. *J Leukoc Biol* 83(6):1459–1466. <https://doi.org/10.1189/jlb.1207831>
421. Brancaleone V, Mitidieri E, Flower RJ, Cirino G, Perretti M (2014) Annexin A1 mediates hydrogen sulfide properties in the control of inflammation. *J Pharmacol Exp Ther* 351(1):96–104. <https://doi.org/10.1124/jpet.114.217034>
422. Wang Y, Jia J, Ao G, Hu L, Liu H, Xiao Y, Du H, Alkayed NJ, Liu CF, Cheng J (2014) Hydrogen sulfide protects blood-brain barrier integrity following cerebral ischemia. *J Neurochem* 129(5):827–838. <https://doi.org/10.1111/jnc.12695>
423. Kimura H (2011) Hydrogen sulfide: its production and functions. *Exp Physiol* 96(9):833–835. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2011.057455>
424. Cekic C, Linden J (2016) Purinergic regulation of the immune system. *Nat Rev Immunol* 16(3):177–192. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.4>
425. Dickenson JM, Reeder S, Rees B, Alexander S, Kendall D (2003) Functional expression of adenosine A2A and A3 receptors in the mouse dendritic cell line XS-106. *Eur J Pharmacol* 474(1):43–51
426. Gallowitsch-Puerta M, Pavlov VA (2007) Neuro-immune interactions via the cholinergic anti-inflammatory pathway. *Life Sci* 80(24–25):2325–2329. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2007.01.002>
427. Ly NP, Komatsuzaki K, Fraser IP, Tseng AA, Prodhon P, Moore KJ, Kinane TB (2005) Netrin-1 inhibits leukocyte migration in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(41):14729–14734. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506233102>
428. Lee CT, Teles R, Kantarci A, Chen T, McCafferty J, Starr JR, Brito LC, Paster BJ, Van Dyke TE (2016) Resolvin E1 reverses experimental periodontitis and dysbiosis. *J Immunol* 197(7):2796–2806. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600859>
429. Wang H, Anthony D, Yatmaz S, Wijburg O, Satzke C, Levy B, Vlahos R, Bozinovski S (2017) Aspirin-triggered resolvin D1 reduces pneumococcal lung infection and inflammation in a viral and bacterial coinfection pneumonia model. *Clin Sci (Lond)* 131(18):2347–2362. <https://doi.org/10.1042/CS20171006>

430. Rajasagi NK, Reddy PB, Mulik S, Gjorstrup P, Rouse BT (2013) Neuroprotectin D1 reduces the severity of herpes simplex virus-induced corneal immunopathology. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 54(9):6269–6279. <https://doi.org/10.1167/iops.13-12152>
431. Wang H, Yu M, Ochani M, Amella CA, Tanovic M, Susarla S, Li JH, Wang H, Yang H, Ulloa L, Al-Abed Y, Czura CJ, Tracey KJ (2003) Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature* 421(6921):384–388. <https://doi.org/10.1038/nature01339>

10. ANEXO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

COMPROVANTE

Comprovamos o recebimento da solicitação de uso de animais para o projeto intitulado "efeito da indução da resolução inflamação sobre o desenvolvimento da resposta nociceptiva em um modelo de artrite induzida por antígeno (AIA)", protocolo do CEUA: 51/2018 sob a responsabilidade de Vanessa Pinho da Silva que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino).

Belo Horizonte, 15/06/2018.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br