



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
Faculdade de Biociências  
Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular

CAROLINE PERES KLEIN

Atividade de Mediadores Lipídicos Derivados de Ácidos Graxos Poli-  
Insaturados sobre Alterações Comportamentais e Bioquímicas em um Modelo  
de Fibromialgia em Camundongos

Porto Alegre  
2014

CAROLINE PERES KLEIN

Atividade de Mediadores Lipídicos Derivados de Ácidos Graxos Poli-  
Insaturados sobre Alterações Comportamentais e Bioquímicas em um Modelo  
de Fibromialgia em Camundongos

Dissertação apresentada como requisito para  
obtenção do grau de Mestre pelo Programa de  
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular  
da Faculdade de Biociências da Pontifícia  
Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador (a)  
Prof. Dra. Maria Martha Campos

Porto Alegre  
2014

Dedico esta dissertação, com sentimento de gratidão e amor à minha família. À minha mãe, minhas irmãs, meu namorado e meus cunhados, que sempre me apoiaram e incentivaram durante o progresso do meu trabalho. Sem deixar de mencionar a minha companheirinha Nala.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, agradeço pela paz, energia e força que encontrei em momentos de desmotivação e fraqueza;

À minha família: à minha mãe Susi, às minhas irmãs Déia e Isa, ao meu noivo Fábio, aos meus cunhados Delson e João, agradeço pelo apoio, incentivo, compreensão e torcida nessa trajetória;

À minha cachorrinha Nala, agradeço pela inesgotável companhia em todos os momentos de leitura e descanso, de alegrias e tristezas;

À minha amiga/ irmã de coração Franciele, agradeço por estar sempre disponível para me auxiliar, aconselhar e dar apoio;

À minha orientadora Prof. Dra Maria Martha Campos, agradeço pela orientação, dedicação e presença constante em todas as etapas de desenvolvimento desta dissertação;

À minha co-orientadora Prof. Dra Alessandra Hübner de Souza, agradeço pela amizade e por compartilhar toda a sua experiência e agregá-la ao meu conhecimento;

Aos colegas do Laboratório de Farmacologia Aplicada Rodrigo, Kesiane, Gustavo, Giuliano, Natália Cignachi, Priscila, Raquel, Paula e, aos colegas do Laboratório de Cultura Celular Natália Nicoleti, André, Marina, Thais, Dani, agradeço por compartilharem comigo seus conhecimentos e experiências.

Aos colegas Izaque e Nathalia Sperotto, do Laboratório de Farmacologia Aplicada, agradeço em especial pela contribuição dada durante o desenvolvimento desta dissertação;

À Prof. Dra Fernanda Bueno Morrone, agradeço por todo o apoio fornecido no laboratório;

Aos amigos do Instituto de Toxicologia Camille, Ariane, Carlos, Fernando, Adílio e Lucas, agradeço pelo companheirismo;

Às amigas e ex-colegas do Laboratório de Farmacologia Aplicada Patrícia Oliboni, Tanya Schwingel, Carolina Gubert, Fabrícia Dietrich e Vanessa Machado, agradeço pelo companheirismo, sinceridade e suporte prestado sempre que necessário;

À Luciana Adolfo, bióloga e histotencóloga do Laboratório de Patologia da Faculdade de Odontologia – PUCRS e, ao Thiago Giuliani, histotecnólogo do hospital São Lucas da PUCRS, agradeço pelo auxílio e dedicação dispensada na confecção das lâminas para histologia e na técnica de imunomarcção;

Ao Prof. Dr Manoel Sant’ana, agradeço por permitir o acesso ao Laboratório de Patologia da Faculdade de Odontologia – PUCRS;

Ao Prof. Dr. Vinicius Duval da Silva, agradeço pela sua contribuição para o conhecimento de técnicas de imagética digital e por permitir a utilização do microscópio, instrumento de seu trabalho, para a captura das imagens de imunohistoquímica;

À Zíngara, agradeço pelo apoio prestado sempre que lhe fosse solicitado;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), agradeço pela bolsa de custeio de Mestrado;

Aos demais professores e colegas do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular – PPGBCM/PUCRS.

## RESUMO

O presente estudo investigou o possível efeito do tratamento central ou sistêmico com os mediadores lipídicos de resolução da inflamação, Resolvina D1 (RvD1), RvD1 ativada pela aspirina (AT-RvD1) e Resolvina D2 (RvD2) sobre mudanças comportamentais e neuroquímicas em um modelo de fibromialgia induzido por reserpina em camundongos. A administração aguda de AT-RvD1 e RvD2 produziu um efeito inibitório significativo sobre a alodínia mecânica e a hipersensibilização térmica nos animais tratados com reserpina, sendo que nenhum efeito foi observado quando os animais foram tratados com RvD1. A administração aguda de pregabalina, fármaco de referência para o tratamento da fibromialgia, apresentou um efeito antinociceptivo similar àquele observado para AT-RvD1 e RvD2. Interessante, a administração repetida e sistêmica de AT-RvD1 e RvD2 também preveniu o comportamento depressivo nos animais que receberam reserpina, de acordo com a avaliação do tempo de imobilidade, enquanto que a administração crônica de pregabalina não apresentou efeito sobre esse parâmetro. A indução de fibromialgia pela reserpina produziu uma redução marcante dos níveis de dopamina e serotonina (5-HT), quando avaliados no cérebro total, medula espinhal, córtex e tálamo. A reserpina também promoveu uma redução nos níveis de glutamato no cérebro total e, um aumento significativo na medula espinhal e no tálamo. O tratamento crônico com RvD2 preveniu a redução de 5-HT no cérebro total e, reverteu o aumento do glutamato no cérebro total e medula espinhal. Por outro lado, AT-RvD1 restaurou os níveis de dopamina no córtex e de 5-HT no tálamo, ao mesmo tempo em que, reduziu os níveis de glutamato no cérebro. Em relação à pregabalina, ela preveniu a redução de dopamina no cérebro total e inibiu o aumento do glutamato no cérebro e na medula espinhal dos animais tratados com reserpina. Nossos resultados fornecem novas evidências quanto aos efeitos da AT-RvD1 e, principalmente RvD2 na redução da dor e, ainda, da depressão, no modelo de fibromialgia induzida por em camundongos.

**Palavras-chave:** resolvinas da série D; fibromialgia; reserpina; neurotransmissores; pregabalina; camundongos.

## ABSTRACT

This study investigated whether the spinal or systemic treatment with the lipid resolution mediators resolvin D1 (RvD1), aspirin-triggered resolvin D1 (AT-RvD1) and resolvin D2 (RvD2) might interfere with behavioral and neurochemical changes in the mouse fibromyalgia-like model induced by reserpine. Acute administration of AT-RvD1 and RvD2 produced a significant inhibition of mechanical allodynia and thermal sensitization in reserpine-treated mice, whereas RvD1 was devoid of effects. A similar antinociceptive effect was obtained by acutely treating animals with the reference drug pregabalin. Noteworthy, the repeated administration of AT-RvD1 and RvD2 also prevented the depressive-like behavior in reserpine-treated animals, according to assessment of immobility time, although the chronic administration of pregabalin failed to affect this parameter. The induction of fibromyalgia by reserpine triggered a marked decrease of dopamine and serotonin (5-HT) levels, as examined in total brain, spinal cord, cortex and thalamus. Reserpine also elicited a reduction of glutamate levels in total brain, and a significant increase in the spinal cord and thalamus. Chronic treatment with RvD2 prevented 5-HT reduction in total brain, and reversed the glutamate increases in total brain and spinal cord. Otherwise, AT-RvD1 led to a recovery of dopamine levels in cortex, and 5-HT in thalamus, whilst it diminished brain glutamate contents. Concerning pregabalin, this drug prevented dopamine reduction in total brain, and inhibited glutamate increase in brain and spinal cord of reserpine-treated animals. Our data provide novel evidence, showing the ability of D-series resolvins AT-RvD1, and mainly RvD2, in reducing painful and depressive symptoms allied to fibromyalgia in mice.

**Keywords:** D-series resolvins; fibromyalgia; reserpine; neurotransmitters; pregabalin; mice.

## LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT – Serotonina  
AA – Ácido Araquidônico  
ACR – *American College of Rheumatology*; Colégio Americano de Reumatologia  
AGPI – Ácido Graxo Poli-insaturado  
AINE – Anti-Inflamatorios Não Esteroidais  
ALX – Receptor para Lipoxina  
ATL – *Aspirin-Triggered Lipoxin*  
AT-Rv – Resolvina Ativada pela Aspirina  
BDNF - Fator de Crescimento Derivado do Cérebro  
BTL – Receptor para Leucotrieno  
CGRP – Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina  
COX – Ciclooxigenase  
COXIB – Inibidor da Ciclooxigenase  
CSF – Fluido Cérebro-Espinal  
CYP450 – Citocromo P450  
Cys-LT – *Cysteinil* Leucotrieno  
DA – Dopamina  
DGLA – Ácido Dihomo-Gama-Linolênico  
DHA – Ácido Docosahexaenoico  
EET – Ácido Epoxieicosatrienoico  
EPA – Ácido Eicosapentaenoico  
FDA – *Food and Drug Administration*  
FLAP – *Five Lipoxygenase-Activator Proteins*  
FM - Fibromialgia  
fMRI - Imagem de Ressonância Magnética Funcional  
GABA – Ácido Gama Amino-Butírico  
HEPE - Ácido Hidroxieicosapentanoico  
HETE – Ácido Hidroxieicosatetraenoico  
HODE – Ácido Hidroxioctadecadienoico  
HPETE – Ácido Hidroperoxieicosatetraenoico  
HPODE – Ácido Hidroperoxioctadecadienoico  
IL – Interleucina



LDL – Lipoproteína de Baixa Densidade  
LFESSQ – *London Fibromyalgia Epidemiological Study Screening Questionnaire*  
LOX – Lipoxigenase  
LPS – Lipopolissacarideo  
LT - Leucotrieno  
LX – Lipoxina  
n3 – Ômega 3  
n6 – Ômega 6  
NA – Noradrenalina  
NGF – Fator de Crescimento Neuronal  
NMDA - N-Metil D-Aspartato  
NO – oxido nítrico  
NPDR – Receptor para Neuroprotectina  
PC – Prostaciclina  
PD -Protectina  
PG - Prostaglandina  
PGHS - Prostaglandina Endoperóxido G/H Sintetase  
PL – Fosfolípido  
PL-A2 – Fosfolipase A2  
POX – Peroxidase  
RE – Reticulo Endoplasmático  
ResoDR – Receptor para Resolvina da Classe D  
ResoER – Receptor para Resolvina da Classe E  
R-HDHA – Ácido Hidroxidocosaheptaenoico  
Rv - Resolvina  
sEH – Enzima Hidroxilase Soluvel  
SNC – Sistema Nervoso Central  
SP – Substância P  
SS – Severity Symptom Scale; Escala de Severidade de Sintomas  
TRP – Receptor de Potencial Transitorio  
TRPA – Receptor de Potencial Transitorio Anquirina  
TRPV – Receptor de Potencial Transitorio Vaniloide  
TX - Tromboxano  
WPI – *Widespread Pain Index*; Índice de Dor Generalizada

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Representa a pesquisa realizada na base de dados do Pubmed, mostrando o aumento no número de publicações sobre o tema “Fibromialgia”.

## SUMÁRIO

|           |  |           |
|-----------|--|-----------|
| <b>1</b>  | <b>INTRODUÇÃO</b> .....  | <b>11</b> |
| 1.1       | FIBROMIALGIA .....   | 11        |
| 1.1.1     | Epidemiologia .....  | 11        |
| 1.1.2     | Diagnóstico .....  | 14        |
| 1.1.3     | Sintomas .....   | 15        |
| 1.1.4     | Fisiopatologia .....   | 16        |
| 1.1.5     | Tratamento farmacológico.....  | 20        |
| 1.2       | MEDIADORES LIPÍDICOS .....   | 22        |
| 1.2.1     | Eicosanoides .....   | 22        |
| 1.2.2     | Ciclooxigenase.....  | 23        |
| 1.2.3     | Lipoxigenases .....  | 25        |
| 1.2.3.1   | Enzima 5-Lipoxigenase.....   | 26        |
| 1.2.3.2   | Enzima 8-Lipoxigenase.....   | 27        |
| 1.2.3.3   | Enzima 12-Lipoxigenase.....  | 28        |
| 1.2.3.4   | Enzima 15-Lipoxigenase.....  | 28        |
| 1.2.3.5   | Biossíntese transcelular de produtos derivados da interação entre LOX .... | 30        |
| 1.2.3.5.1 | Ativação de mediadores lipídicos pela aspirina.....                        | 33        |
| 1.2.1     | Epoxigenase.....   | 34        |
| 1.3       | MEDIADORES PRÓ-RESOLUÇÃO DA INFLAMAÇÃO EM ESTUDOS<br>EXPERIMENTAIS .....   | 35        |
| <b>2</b>  | <b>OBJETIVOS</b> .....   | <b>37</b> |
| 2.1       | OBJETIVO GERAL.....  | 37        |
| 2.2       | OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....  | 37        |
| <b>3</b>  | <b>RESULTADOS</b> .....  | <b>38</b> |
| 3.1       | ARTIGO CIENTÍFICO .....  | 38        |
| 3.2       | .....  | 57        |
| 3.3       | ACKNOWLEDGEMENTS .....   | 57        |
| <b>4</b>  | <b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....  | <b>75</b> |
|           | REFERÊNCIAS .....  | 79        |

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 FIBROMIALGIA

A fibromialgia (FM), conhecida também como uma síndrome, é uma doença de etiologia desconhecida, que apresenta alterações neuroendócrinas e neuroquímicas, caracterizada por uma elevada percepção dolorosa em pontos anatômicos específicos e associada com sintomas de fadiga, distúrbios do sono e cognitivos (1, 2). A sensibilidade à dor na FM apresenta um perfil heterogêneo, com sintomas autonômicos e neuropsiquiátricos, sendo que o sintoma cardinal apresenta-se como dor musculoesquelética generalizada e crônica persistente por mais de três meses (3). A fisiopatologia da FM ainda não está bem estabelecida; porém, acredita-se que haja um funcionamento anormal, ao nível do sistema nervoso central (SNC), no processamento da dor (4).

Poucos medicamentos são atualmente aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o alívio da dor na fibromialgia, uma vez que não existe tratamento definitivo para a mesma (5). No entanto, mesmo esses fármacos, têm efeitos limitados, uma vez que não contemplam todos os sintomas associados à síndrome da fibromialgia (6). Sendo assim, a investigação de substâncias que possam melhorar o desfecho clínico da doença é de grande relevância.

### 1.1.1 Epidemiologia

Estudos epidemiológicos mostram que a doença está distribuída em países de todo o mundo, com taxas de prevalência semelhantes, que variam entre 0,5 – 5% na população geral (1, 7, 8). A determinação da prevalência da FM em diferentes populações também é concordante ao relatar que as características da doença estão presentes principalmente em pacientes com idade média (35-60 anos) e, que a partir desta faixa etária mínima ocorre um aumento proporcional da taxa de prevalência, de acordo com o avanço da idade (1, 9, 10); no entanto, é observado um declínio na taxa de prevalência antes de alcançar a oitava década de idade (11, 12). Sendo assim, indivíduos jovens e idosos estão entre os que comumente apresentam menor número de casos de FM (11, 13).

Embora nos últimos anos as publicações referindo o tema “*fibromyalgia*” no banco de dados do NCBI (PUBMED) tenham aumentado consideravelmente (Fig. 1), poucos estudos epidemiológicos sobre estimativa da prevalência da FM fornecendo um panorama mundial têm sido publicados. Entre os primeiros estudos epidemiológicos, o estudo realizado por Wolfe e col. (1995) nos EUA está entre os principais, onde a estimativa obtida foi de 2% de prevalência na população geral (10).

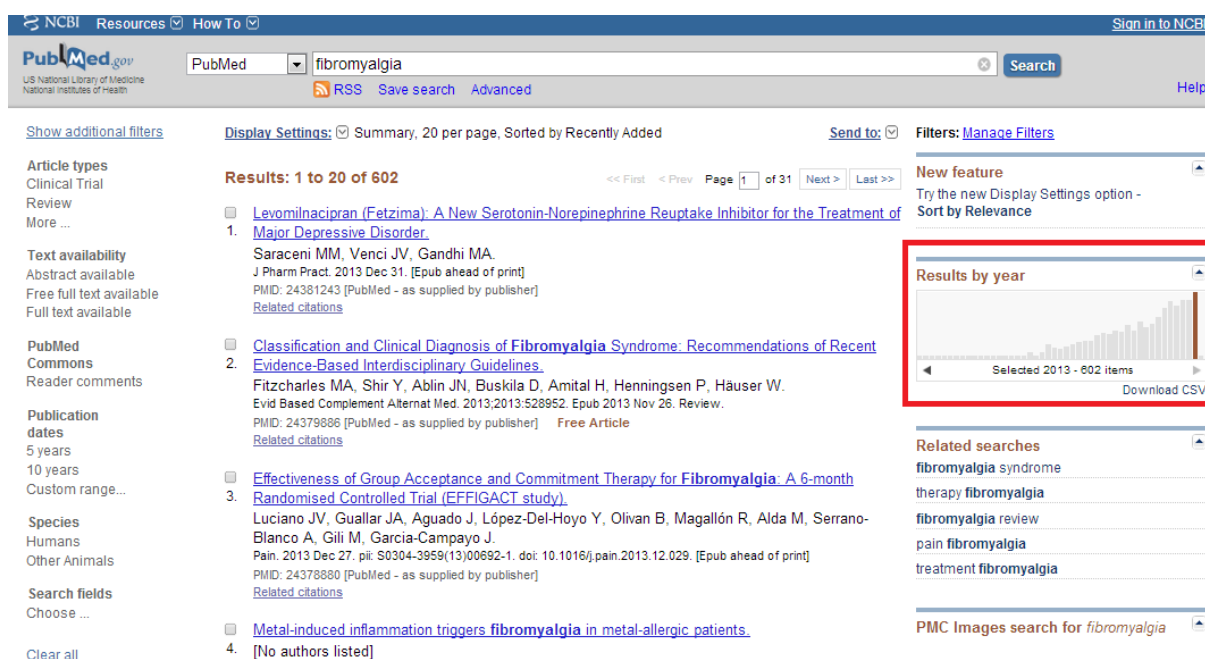


Figura 1: Representa a pesquisa realizada na base de dados do Pubmed, mostrando o aumento no número de publicações sobre o tema “Fibromialgia”.

Recentemente, Rezende e col. (2013) publicaram dados preliminares do estudo epidemiológico da Fibromialgia no Brasil – projeto EpiFibro, que teve início no ano de 2010 – , que se trata de um banco de dados brasileiro que inclui nove estados do Brasil (14). Santos e col. (2010) estimaram uma prevalência de 5,5% em indivíduos residentes na cidade de São Paulo-SP/Brasil, sendo que todos os indivíduos diagnosticados para a doença eram do sexo feminino (15). Similarmente, outro estudo realizado no estado de São Paulo demonstrou resultados semelhantes na prevalência de FM, cuja amostra que foi obtida era restrita aos sistemas públicos de saúde e a uma população de baixo nível socioeconômico (13). Nesse estudo, dos 768 indivíduos participantes, 4,4% foram diagnosticados com FM, sendo todos do sexo feminino.

Países como França, Alemanha, Itália, Portugal e Espanha foram introduzidos no estudo de Branco e col. (2010) para a estimativa da prevalência da FM (12). Foram utilizadas amostras nacionais probabilísticas e representativas de indivíduos da população geral (n = 4517) e de pacientes clínicos de reumatologia (n = 1125), acima de 15 anos de idade. Corroborando as estatísticas determinadas em diferentes estudos (9, 16), a relação de casos positivos para FM entre sexos (mulheres:homens) foi 2,0:1 e 5,2:1; respectivamente, em ambas amostras desse estudo. Além disso, a prevalência de pacientes com FM foi de 14% nas clínicas de reumatologia e, 2,9% na população geral. Porém, a proporção de casos diagnosticados de FM foi diferente entre os países analisados, de 6 – 25% na clínica e 1,4 – 3,7% na população.

Häuser e col. (2009) realizaram uma pesquisa com uma amostra representativa de 258 regiões da Alemanha e reportaram uma taxa de prevalência de FM de 3,8% e, diferentemente de diversos outros estudos, em vários países, esse relatou a presença da doença em uma proporção semelhante para ambos os sexos 3,6% (homens) e 3,7% (mulheres) (17).

Visto que a faixa de variação na prevalência de FM é relativamente grande, dada a comparação entre estudos de diferentes regiões, os resultados obtidos a partir de pesquisas epidemiológicas em populações isoladas não devem ser extrapolados para diferentes estados e países (11, 18). Diferenças nos critérios diagnósticos ou de classificação da FM, diferenças metodológicas e seleção de regiões ou cidades, são pontos questionáveis levantados por Branco e col. (12), ao que diz respeito às estimativas de prevalência da FM.

Fatores sócio-demográficos observados em diferentes estudos apontam unanimemente o sexo feminino como um fator de risco fortemente relacionado com a FM, uma vez que a relação mulheres:homens apresenta-se significativamente maior (19, 20). Häuser e col. (17) reportam que não houve diferenças na prevalência de FM quanto ao sexo, diferentemente da maioria dos estudos relatados na literatura. A diferença que foi observada na prevalência da FM quanto ao gênero pode ter sido resultante de variações metodológicas ou critérios diagnósticos.

A atenção médica recebida por determinados grupos etários e sociais é diferente e a propensão das mulheres em procurar assistência médica com maior frequência do que os homens estão entre os fatores sociodemográficos que influenciam a seleção da amostra (1). Assumpção e col. (13) apontam que a atenuação das barreiras econômicas poderia diminuir os vieses de seleção e, inferem que tais obstáculos devem estar presentes em diversas

idades-alvo de estudos semelhantes. Outra característica frequentemente relatada refere-se ao aumento proporcional da taxa de prevalência de acordo com o aumento da idade, com subsequente declínio (9, 11). Hauser e col. (17) observaram que a idade avançada, baixo nível social e síndromes somatoformes foram preditivos significantes na presença de FM.

Embora muitos estudos tenham tentado encontrar influências de outras variáveis sócio-demográficas para relacioná-las com a FM, ainda não existem evidências para que as mesmas estejam implicadas nas causas da doença (12, 21).

### 1.1.2 Diagnóstico

O diagnóstico da fibromialgia, desde a última década do século XX até recentemente, era determinado de acordo com os critérios de classificação estabelecidos pelo *American College of Rheumatology* (ACR). Ao exame clínico, a doença era caracterizada quando existissem dores musculoesqueléticas generalizadas crônicas presentes em pelo menos 11 ou mais de 18 pontos situados em cada um dos 4 quadrantes do corpo (3). Em 2010, Woolfe e col. (22) publicaram um estudo com critérios diagnósticos preliminares, levando em consideração a mensuração dos sintomas associados à síndrome de FM. O objetivo foi desenvolver critérios simples, de fácil disponibilidade ao uso em unidades de atenção à saúde, bem como criar uma escala de severidade dos sintomas (*Symptom Severity* - SS). A pesquisa foi conduzida em duas fases; a primeira avaliou o índice de extensão da dor (*widespread pain index* – WPI) e, a segunda avaliou se um questionário com um conjunto de variáveis e que seria capaz de contemplar a categorização da FM da mesma forma que a primeira fase (22).

Os índices WPI (correlacionado com a contagem dos *tender points*) e a escala SS (índice que melhor reproduziu a identificação dos pacientes de acordo com o critério ACR e que apresenta 6 variáveis relacionadas: distúrbios do sono, sono não revigorante, fadiga, sintomas somáticos, cognitivos e humor), foram os que melhor definiam a FM. Esses novos critérios desenvolvidos foram aprovados provisoriamente pelo ACR de forma a ampliar o espectro diagnóstico de certas realidades envolvidas na FM, como o reconhecimento de sintomas somáticos e cognitivos, por exemplo (22).

A nova classificação pode ser contemplada por um nível elevado de sintomas, mesmo que a pontuação de WPI ao exame físico não seja suficiente, o que sugere discordância com a antiga classificação. Dessa forma, os critérios diagnósticos para FM

são satisfeitos se coexistirem as três seguintes condições:  $WPI \geq 7$  e  $SS \geq 5$ , ou  $WPI 3-6$  e  $SS \geq 9$ ; sintomas similares por pelo menos 3 meses e ausência de outra doença que poderia explicar a causa da dor (22).

Em 2011, Wolfe e colaboradores (23) publicaram a correção dos critérios diagnósticos para a FM previamente publicados no ano anterior; nesta versão atualizada foi extinguido o critério de uso dos *tender points*, e portanto, sem a necessidade de um examinador. Sendo assim, o critério passou a utilizar somente a escala SS e a levar em conta as dores reportadas pelos próprios pacientes, *self report pain* (23).

Existem outros métodos utilizados para diagnosticar a FM; entre os mais comumente aplicados estão: o *London Fibromyalgia Epidemiological Study Screening Questionnaire* (LFESSQ) – uma ferramenta diagnóstica que inclui dor e fadiga como parâmetros que designam a FM – e o “Critério de Manchester” que utiliza um diagrama para determinar as áreas de dor indicadas pelos pacientes e, assim, estabelecer o diagnóstico (24, 25). Porém, o método diagnóstico mais completo e utilizado para confirmar triagens de identificação de indivíduos com FM na população é aquele determinado pelos critérios de classificação do ACR de 1990, 2010 e 2011 (23), uma vez que o mesmo contempla a ampla gama de sintomas associados e com um nível de grande confiabilidade.

### 1.1.3 Sintomas

O perfil heterogêneo de sintomas apresentados por indivíduo com FM é principalmente marcado pelo sintoma cardinal que se apresenta como dor musculoesquelética generalizada e crônica (26).

Além dos sintomas predominantes de dores, a FM está associada a uma escala categórica de sintomas característicos da doença como alterações cognitivas e somáticas, fadiga diária, ansiedade, alterações no sono, disfunção sexual e episódios depressivos (22), estes como a comorbidade psiquiátrica associada mais frequente, com prevalência entre 20 – 80% (27, 28). E ainda, além da sintomatologia relacionada, a FM pode coexistir com outras condições patológicas, tais como desordens temporomandibulares, síndrome do intestino irritável, cistite intersticial, síndrome da fadiga crônica (29-32).

O prejuízo do desempenho e funcionamento das atividades diárias de indivíduos com FM aparecem, principalmente, como consequência da fadiga. Uma vez que os



sintomas estão presentes coletivamente, sendo raros os casos que se apresentam de forma isolada, esses prejuízos funcionais podem ser decorrentes de uma combinação sintomatológica (29). Na prática clínica, a síndrome da FM é considerada quando além do sintoma “central” de dor multifocal, existe a combinação de diversas alterações somáticas (33, 34). As variáveis diagnósticas mais importantes, determinadas após a reavaliação dos critérios do ACR, além dos WPI, foram as escalas categóricas de sintomas cognitivos, sono “não-revigorante” fadiga e sintomas somáticos (23).

Tendo em vista as inúmeras alterações que podem estar presentes concomitantemente em um indivíduo que apresenta a síndrome de fibromialgia, os sintomas causam um prejuízo físico significativo, reduzindo a qualidade de vida (35, 36).

Essa ampla diversidade de sintomas e divergência nos aspectos patológicos relacionados às diferentes comorbidades que podem estar presentes em indivíduos com FM dificultam o entendimento da origem etiológica da doença, uma vez que os mecanismos fisiopatológicos envolvidos no processamento da dor na FM ainda não foram elucidados.

#### **1.1.4 Fisiopatologia**

A fisiopatologia da FM ainda não está bem estabelecida; porém, acredita-se que haja um funcionamento anormal, ao nível do sistema nervoso central (SNC), no processamento da dor. Existem fortes evidências de que os sintomas cardinais da FM podem ser resultantes de alterações dos *inputs* sensoriais, juntamente com deficiências na inibição endógena da dor (37). O(s) mecanismo(s) envolvido(s) parece(m) atuar nos sistemas inibitórios endógenos da dor, onde os estímulos periféricos nociceptivos, além de características neuropáticas com sintomas, encontram-se aumentados, qualificando as sensações dolorosas como hiperpatia, hiperalgesia e alodínia (38).

Pacientes com FM mostram uma sensibilidade aumentada a uma variedade de estímulos, como calor e frio e pressão mecânica. Nesses pacientes, tais estímulos produzem resposta dolorosa quando aplicados em níveis de intensidade que, normalmente, não evocam dor em indivíduos saudáveis (37, 39), sendo este fenômeno denominado de alodínia.

A fisiopatologia da FM envolve várias anormalidades presentes como indicadores da presença de múltiplos fatores e mecanismos envolvidos na patogênese; fatores como: predisposição genética, variáveis psicossociais e estressores ambientais, aminas

biogênicas, neurotransmissores, hormônios do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, estresse oxidativo e mecanismos de modulação da dor de sensibilização central e funções autonômicas na FM (37, 40).

A modulação anormal do córtex cerebral parece ser um elemento comum entre diferentes tipos de dor crônica, ao invés de representar um elemento específico para a FM, embora o padrão de mudança na modulação do SNC possa depender da etiologia da dor (41).

Nos últimos anos, muitos autores têm relatado a sensibilização central como o mecanismo envolvido na gênese da dor (42). Existe um problema sensorial ou com a amplificação da dor, ao invés de uma condição inflamatória ou estrutural na região anatômica onde o indivíduo está percebendo a dor (38).

Alguns estudos observaram a atividade cerebral em resposta a estímulos dolorosos em indivíduos com ou sem FM, através de exames de imagem (43, 44) e eletrofisiológicos (41, 45) durante a aplicação de pressão para gerar dor. Estes testes foram realizados para determinar as vias nociceptivas envolvidas nesse processo e, desta forma, avaliar se as respostas obtidas seriam diferentes para os indivíduos com FM comparadas àquelas obtidas pelos indivíduos controles.

Jensen e col. (2009) através de seus experimentos, com a aplicação do método de imagem de ressonância magnética funcional (fMRI), observaram que além do aumento da sensação de dor, os pacientes com FM apresentaram deficiência no mecanismo de inibição descendente da dor (44). Esta deficiência estava combinada com uma diminuição na ativação de regiões implicadas na regulação central da dor como o córtex rostral cingulado anterior e o anterior tronco encefálico.

Os resultados obtidos no estudo de Mhala e col. (41) sugerem que mudanças na modulação intracortical, como alterações eletrofisiológicas, estejam relacionadas com os mecanismos fisiopatológicos subjacentes à FM, apoiando a hipótese de que a FM está associada a alterações na excitabilidade cortical.

As mudanças na excitabilidade cortical motora, possivelmente envolvem moduladores GABAérgicos e glutamatérgicos, em pacientes com FM. Dados reportados por Mhala e col. (41) evidenciam alterações objetivas e quantificáveis do cérebro; porém, ainda não é possível integrá-los em um conceito fisiopatológico unificado, mesmo que esses resultados ressaltem o papel de disfunções do SNC na FM. O aumento em fMRI

sugere que esses pacientes podem apresentar uma hipoexcitabilidade global do trato corticospinal, que pode ser resultado de mecanismos espinhais ou supraespinhais.

Em resposta a estímulos nocivos, aminoácidos excitatórios são liberados a partir de uma grande variedade de neurônios na medula espinhal. Os níveis de glutamato estão aumentados significativamente no CSF de pacientes com FM comparados com controles (46). Os mecanismos de dor dependem de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) e de receptores para substância P (SP), localizados em neurônios específicos para nocicepção no corno dorsal da medula espinhal. A substância P é um neuropeptídeo liberado por fibras aferentes primárias não mielinizadas de pequeno diâmetro, chamados nociceptores, quando axônios são estimulados, em resposta a estímulos mecânicos dolorosos (47). Os níveis de SP são elevados no CSF de pacientes com FM, evidenciando um processamento espinhal de entradas nociceptivas (48). Em contraste, níveis normais de SP são encontrados na síndrome da fadiga crônica, demonstrando divergência quanto à patogenia da FM. Um alto nível de SP, portanto, parece ser um marcador biológico na presença de dor crônica, no entanto, a elevação da SP não é específica para a FM (49).

A ativação de receptores NMDA por aminoácidos excitatórios nos neurônios e a liberação central de SP, Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina (CGRP) e fator de Crescimento Neuronal (NGF) contribuem para alterações funcionais em neurônios do corno espinhal dorsal, que aumentam a transmissão nociceptiva para o cérebro. As entradas nociceptivas da medula espinhal para o cérebro produzem anormalidades funcionais nas estruturas cerebrais que processam ou modulam a transmissão da dor (50, 51).

Já foram reportados níveis alterados de NGF e Fator de Crescimento Derivado do Cérebro (BDNF) em pacientes com FM (46); ao contrário, a concentração de NGF no CSF normalmente é baixa ou imensurável em indivíduos saudáveis (52). Portanto, é possível que a concentração de NGF esteja envolvida nos mecanismos responsáveis pela hiperalgesia e alodínia (53).

A síntese *de novo* de NGF, uma neurotrofina, em tecidos inflamados, normalmente é responsável pela *upregulation* da síntese de SP durante condições de dor crônica. Estudos em animais indicam que NGF está envolvido no desenvolvimento da hiperalgesia mecânica e alodínia (54, 55).

A associação entre a ausência de dano tecidual periférico e a distribuição dos pontos dolorosos sugere que a patologia subjacente à dor na FM está localizada no SNC. Mesmo que não exista um sítio evidente de inflamação nos locais dolorosos em pacientes

com FM, o processo inflamatório associado ao dano tecidual é provocado, em grande parte, pela liberação de SP no sítio de injúria(53), porém, a presença de um mecanismo inflamatório na fisiopatologia da FM não foi descrita.

O aumento dos aferentes sensoriais pode caracterizar a FM, de maneira similar às condições da dor neuropática (como sensibilização central) (56). No entanto, os mecanismos da dor neuropática são mais bem conhecidos. Ao contrário, os mecanismos da FM não estão definidos e, portanto, quando se discute sobre a fisiopatologia da dor na FM, muitos pesquisadores referem-se a *central augmentation of sensory input* em vez de sensibilização central. *Central augmentation of sensory input* está associada com o aumento da sensibilidade à dor (57).

Estudos demonstram consistentemente que pacientes com FM apresentam hipoperfusão sanguínea nas áreas caudadas e talâmicas, que estão envolvidas no processamento central de sinais nocivos (58, 59).

A ideia de que possa haver alterações nas vias inibitórias descendentes da dor também é considerada, onde existe um processamento anormal aos níveis espinal e supraespinal, incluindo um déficit no controle descendente (60). A transmissão de *inputs* sensoriais para o cérebro é inibida pela ativação de fibras que descendem de sítios do tronco encefálico para o corno dorsal, primariamente através da liberação de NT e, está associada às variações na dor e humor (noradrenalina – NA – e serotonina – 5-HT); assim, o sistema inibitório da dor é demonstrado por níveis diminuídos desses neurotransmissores no SNC (37).

Os neurotransmissores 5-HT, dopamina (DA) e NA, caracterizados como monoaminas biogênicas, são componentes que têm papel crítico no processamento sensorial e resposta ao estresse, sendo fundamentais nas vias inibitórias da dor (37). Baixas concentrações de DA, NA e 5-HT já foram reportadas no CSF de pacientes com FM em comparação com controles (61). Os pacientes com FM exibem um metabolismo anormal de 5-HT e de seu precursor, o triptofano (62, 63); provavelmente, existe uma deficiência nas vias descendentes da dor, uma vez que a 5-HT contribui para a ativação dessas vias antinociceptivas descendentes, do cérebro para os cornos espinais dorsais (64).

Os níveis do aminoácido triptofano, precursor da 5-HT, e a interleucina-8 (IL-8), citocina pró-inflamatória, aparecem em concentrações diferentes em pacientes com FM quando comparados com controles. O triptofano é encontrado em baixos níveis e, evidências do aumento de IL-8 têm sido consistentemente demonstradas em pacientes com

FM (65). Níveis de IL-6 também foram avaliados e, estes se encontraram em concentrações séricas normais (66, 67). Citocinas anti-inflamatórias encontraram-se diminuídas em pacientes com FM, indicando que baixos níveis destas citocinas protetivas podem ser de risco para a FM (68).

A glia (microglia e astrócitos) da medula espinhal parece contribuir para a sensibilidade anormal da dor através da liberação de varias substâncias neuroativas, como prostaglandinas, aminoácidos excitatórios, NGF e óxido nítrico (NO) (69).

Embora não exista evidência direta, a ativação da microglia pode contribuir para a fisiopatologia da FM (70, 71), pois sua ativação conduz a mudanças no tálamo, as quais também parecem estar presentes em exames de imagem neurológicos em pacientes com FM (72, 73). A combinação da ativação da microglia às mudanças no tálamo pode disparar uma hipoexcitabilidade neuronal resultando em um processamento anormal de entrada ascendente e com diminuição das vias descendentes inibitórias em FM com subsequente desenvolvimento de dor crônica (74).

Como observado, os dados atuais sobre a patogênese da FM estão ainda se expandindo, no que diz respeito a moléculas e moduladores químicos. Com avanços e melhora no entendimento da fisiopatologia da FM e doenças relacionadas pode ser esperado que tratamentos mais eficazes sejam validados e tornem-se disponíveis. Para tanto, é necessária a execução de muitas pesquisas que visem desvendar os aspectos fisiopatológicos de base da FM e, só então, será possível fazer uma abordagem terapêutica que tenha abrangência de resolução de todos os sintomas apresentados na FM.

### **1.1.5 Tratamento farmacológico**

Os sintomas da FM podem ser reduzidos por meio de abordagens terapêuticas multidisciplinares combinadas como a prática de exercícios aeróbicos, terapia cognitivo-comportamental e terapias farmacológicas (inibidores da recaptção da serotonina e noradrenalina [duloxetina, milnacipran] e ligantes dos receptores alfa 2-delta das subunidades dos canais de cálcio [pregabalina]) (74).

Baseando-se na premissa de que a sensibilização do SNC está envolvida na fisiopatologia e no processamento da dor na FM, ensaios clínicos randomizados foram conduzidos a fim de avaliar a eficácia e a segurança de medicamentos que interferem no processamento da dor (75, 76).

Uma revisão realizada por Smith e col. (74) foca nas estratégias farmacológicas para o tratamento da FM, seja nos agentes aprovados ou não pela FDA.

As estratégias para a terapia farmacológica testam a hipótese de que a FM pode apresentar mecanismos que se sobrepõem às comorbidades presentes nos pacientes com a Síndrome de FM (77) e, se baseiam na evidência de os pacientes com FM apresentam baixos níveis de aminas biogênicas no CSF e, a partir de estudos com agentes farmacológicos que levavam ao aumento de 5-HT e NA (antidepressivos tricíclicos, duloxetine, milnacipran, tramadol) foi mostrado que estes agentes poderiam ser eficazes para o tratamento da FM(78).

Outra estratégia farmacológica adotada, como o uso do fármaco pramipexole, baseou-se na evidência de que existe uma desregulação na neurotransmissão do sistema dopaminérgico em pacientes com FM (79).

A maioria dos antidepressivos tricíclicos eleva os níveis de 5-HT e NA através do bloqueio direto de sua recaptação na fenda sináptica; estes transmissores se ligam a múltiplos receptores e, portanto, têm muitos efeitos adversos. Em geral, funcionam moderadamente como agentes analgésicos na maioria dos estados de dor (74).

A pregabalina, análogo do ácido gama butírico (GABA), e os inibidores da recaptação de 5-HT e NA, duloxetine (5) e milnacipran, são aprovados pela FDA para o tratamento da FM (38).

Em 2005, Holman & Myers realizaram um estudo onde avaliaram os benefícios do fármaco pramipexole sobre os sintomas da FM, uma vez que pode existir uma desregulação na neurotransmissão do sistema dopaminérgico em pacientes com FM. Pramipexole é um agonista dopaminérgico e se mostrou eficaz na redução da dor e do sono em pacientes com FM (79).

Geralmente, para determinação dos prós e contras associados ao uso de fármacos como pregabalina, duloxetine, pramipexole e outros, são levados em consideração requisitos de avaliação para os benefícios dos mesmos, como redução da dor, redução da fadiga e depressão e eventos adversos. Baseando-se nisso, a escolha do tratamento a ser empregado para cada paciente pode atender às necessidades individuais, conforme o quadro clínico associado à FM (38).

No entanto, nenhuma medicação foi capaz de controlar suficientemente todos os sintomas da FM. Embora o FDA tenha concedido recentemente a aprovação para pregabalina, duloxetine e milnacipran (38) para o alívio da dor na FM, não existe

tratamento definitivo para a mesma (74, 80). No entanto, esses três fármacos são aqueles que apresentam maior eficácia em indivíduos com FM, quando comparados a outros agentes farmacológicos, apesar da diferença no modo de ação entre ambos, (38, 81).

Porém, mesmo essas drogas, têm efeitos limitados, uma vez que elas não contemplam todos os sintomas associados à síndrome da FM (6). Sendo assim, a investigação de substâncias que possam melhorar o desfecho clínico da doença é de grande relevância.

## 1.2 MEDIADORES LIPÍDICOS

### 1.2.1 Eicosanoides

Os eicosanoides fazem parte de uma ampla família de mediadores lipídicos derivados de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) que contêm em sua estrutura química 20 carbonos na cadeia principal e são chamados de ácidos eicosatetraenoicos (C20:4). O precursor para a síntese dos AGPI omega-6 (n-6) é o ácido graxo essencial ácido linoleico (C18:2 n-6) e, em particular, o produto derivado desses AGPI n-6 é o ácido araquidônico (AA), ou araquidonato, que serve como substrato para a produção dos eicosanoides (82, 83). Por outro lado, o precursor para a síntese dos AGPI n-3 é o ácido graxo essencial alfa-linolênico (C18:3 n-3), cujos produtos derivados são: ácido eicosapentaenoico (EPA; C20:5 n-3) e ácido docosahexaenoico (DHA; C22:6 n-3) (83).

Essa família de mediadores lipídicos é muito heterogênea, característica que está relacionada tanto com a estrutura química, estabilidade, biossíntese e espectro das atividades biológicas às quais estão envolvidas (84).

Eicosanoides é como se chamam os mediadores lipídicos endógenos biologicamente ativos, cuja ativação dos eicosanoides ocorre imediatamente à sua síntese, a partir da conversão enzimática do AA, EPA ou DHA derivado dos fosfolipídios de membrana, atuando como moléculas sinalizadoras que controlam diversos eventos celulares (85). A ativação ocorre tanto em processos de dano celular, ou até mesmo em processos metabólicos fisiológicos (86), onde os fosfolipídios de membrana liberam o lipídio de membrana que se encontra na face citoplasmática da membrana que servirá

como substrato para a produção de eicosanoides, incluindo leucotrienos e prostanoides (87).

Mediadores lipídicos como os prostanoides prostaglandinas (PGs), prostaciclina (PCs) e tromboxanos (TXs), os leucotrienos (LTs), o ácido hidroperoxieicosatetraenoico (HPETE) e ácido hidroxieicosatetraenoico (HETE) e ácido epoxieicosatrienoico (EET's) são gerados por três diferentes vias de oxidação dos AGPI: via das lipoxigenases, via das ciclooxigenases e via das epoxigenases ou citocromo P450 (CYP450); onde cada uma será responsável pela formação de metabólitos ativos com funções especializadas e diferentes mecanismos de ação (82). Além disso, nos últimos anos foi descoberta a existência de outros mediadores lipídicos biologicamente ativos, adicionais à produção dos mediadores supracitados, que também sofrem ação dessas enzimas oxidativas. Esses novos mediadores também estão envolvidos em eventos celulares, são as substâncias formadas através da interação de duas células e sobre ação de duas enzimas, são as lipoxinas (LX), resolvinas (Rv), protectinas (PD) e maresinas (Mar) (88-90).

### **1.2.2 Ciclooxigenase**

A reação para a produção dos eicosanoides a partir da via da ciclooxigenase (COX) é catalisada pela enzima prostaglandina endoperóxido G/H sintetase (PGHS), mais popularmente conhecida como enzima ciclooxigenase (COX) (91-93). Existem duas isoformas da enzima COX/PGHS (-1 e -2) e ambas catalisam a mesma reação de conversão do AA ou EPA em PG. COX-1 é constitutivamente expressa nos tecidos, e COX-2 é altamente induzível e geralmente está presente em baixos níveis nos tecidos, a menos que sua produção aumentada seja induzida por citocinas e/ou fatores de crescimento (94).

A enzima COX está localizada principalmente na membrana do retículo endoplasmático (RE), embora também seja encontrada na membrana nuclear e em outros locais citoplasmáticos (95, 96). Ela contém três domínios e é bifuncional, pois apresenta dois sítios catalíticos [sítio peroxidase (POX), o qual contém um grupo heme prostético, essencial para sua atividade biológica e sítio ciclooxigenase (COX)] com localização distinta, porém dispostos estruturalmente de forma que ambos os sítios se mantenham conectados (93, 94). A reação catalisada pelo sítio COX requer um dos três AGPI e a molécula de oxigênio (O<sub>2</sub>) como substratos, enquanto que a catálise realizada pelo sítio



POX requer um hidroperóxido e um “co-substrato”, que atuará como agente redutor (97). E ainda, para a conversão dos AGPI a PG também é necessário que ocorra reações de ciclização (97, 98).

A primeira etapa da reação irá converter o AGPI a um intermediário endoperóxido instável, a PG-G, através da inserção de moléculas de O<sub>2</sub> e eventos de rearranjos estruturais da cadeia. Na segunda etapa, a PG-G é reduzida pelas mesmas enzimas a outro endoperóxido instável, a PG-H. O endoperóxido PG-H é convertido a diversos membros das PG por diferentes isomerases e oxidoredutases, os quais irão exercer diversos efeitos fisiológicos (93, 94, 98, 99).

Existem três séries (série 1-3) de prostanoídes derivados das reações de catálise dos AGPI. As séries 1 e 3 são sintetizadas a partir de DGLA (ácido dihomo-gama-linolênico), um AGPI n-6, e EPA, respectivamente, enquanto a série 2 dos prostanoídes são sintetizadas a partir do AA. A partir do AGPI utilizado como substrato, os endoperóxidos intermediários também terão suas séries correspondentes : PG-G1, -2, -3 e PG-H1, -2 e -3 (100). Entre os integrantes da família dos prostanoídes, com atividade *in vivo*, estão: TX-A, as PG-D, -E, -F, e as PGI (101). As PG exercem suas ações através da sua ligação a receptores acoplados à proteína G (GPCR) (94).

Sabe-se pouco sobre as atividades dos mediadores derivados do AGPI DLGA, e sua atividade ainda não está bem esclarecida, uma vez que, existem descritos na literatura efeitos divergentes no organismo para esses prostanoídes (102, 103).

Os isômeros das PG atuam como mediadores lipídicos para manter a homeostase corporal, em diversos processos fisiológicos e patológicos, como pirogênese (93), nocicepção (104), inflamação (105), agregação plaquetária (106) ou inibição da mesma (107), divisão celular (108), vaso- e broncodilatação (109, 110) ou vaso- e broncoconstrição (111), entre outros.

Os diferentes tipos AGPI que dão origem aos prostanoídes competem pela ação das mesmas enzimas (112). Em condições normais, a proporção de consumo na dieta de AGPI n-6 é maior que o de AGPI n-3; porém, quando EPA e DHA estão presentes, eles são preferencialmente utilizados como substratos pelas enzimas COX e LOX, uma vez que são mais susceptíveis a peroxidação lipídica. Essa evidência sugere que existe um processo enzimático substrato-dependente, que desloca a via de formação do produto. As PG formadas pelos AGPI n-3, que, de certa forma substituem aquelas PG que seriam formadas

pelos AGPI n-6, pode explicar as ações antiinflamatórias e efeitos cardioprotetores da dieta rica em AGPI n-3 (113, 114).

Embora quimicamente estáveis, *in vivo*, a meia-vida das PG é muito curta, sendo de segundos a minutos (93); exercem suas ações no mesmo local em que foram sintetizadas e na vizinhança próxima (ação parácrina). E ainda, existem evidências substanciais de que as PG estão envolvidas na indução da liberação de citocinas e, conseqüente infiltração de células inflamatórias até um local inflamado (115).

Como discutido anteriormente, as enzimas COX-1 e -2 são fontes de produção de PG. Em reações catalisadas por COX-1, as PG exercem funções como citoproteção epitelial gástrica e homeostasia, enquanto que COX-2, que é induzida por estímulo inflamatório, hormônios e fatores de crescimento, lipopolissacarídeos (LPS) de bactérias, é a maior fonte de PG em doenças inflamatórias e doenças proliferativas como o câncer. No entanto, ambas as enzimas contribuem para a liberação de PG durante a inflamação (91). Em resumo, PG sustentam funções homeostáticas e medeiam mecanismos patogênicos, incluindo a resposta inflamatória (91).

E ainda, a biossíntese da enzima COX-1 pode ser bloqueada preferencialmente por fármacos antiinflamatórios não esteroidais (AINES) (91, 116), enquanto a enzima COX-2 pode ser bloqueada por inibidores seletivos de COX-2 (COXIBs) (117-119), além dos AINES (120). Estes fármacos suprimem vários sintomas associados à inflamação, e que presumivelmente são mediados pela ação das PG (115). Ademais a expressão da COX-2 é inibida por antiinflamatórios esteroidais, como a dexametasona (121).

### **1.2.3 Lipoxigenases**

A via da lipoxigenase (LOX) utiliza mecanismos de oxidação do AA e EPA similares àqueles observados na via da COX. Porém, ambas as enzimas empregam diferentes estratégias para catalisar e ativar os substratos dos AGPI. Esses AG, liberados da membrana celular pela ação da enzima fosfolipase A2 (PL-A2), são metabolizados pela enzima LOX que produz um grupo de mediadores lipídicos (93).

As enzimas LOX são objeto de numerosos mecanismos regulatórios; nas células em repouso, a enzima está associada ao citoplasma ou nucleoplasma. Entretanto, após a ativação ela é translocada para a membrana nuclear de forma dependente de cálcio. (122).

Existem várias isoformas de LOX em mamíferos que catalisam a inserção do O<sub>2</sub> nos AGPI, nas posições 5, 8, 12 ou 15, de acordo com o carbono em que é inserido o átomo de O<sub>2</sub>, onde o produto inicial de cada reação é o ácido hidroperoxieicosatetraenoico (5-, 12- ou 15-*S*-HPETE), o qual é reduzido ao ácido hidroxieicosatetraenóico (5-, 12-, ou 15-*S*-HETE) (101), LT, lipoxinas, hepoxilinas (123).

Na via mais comum, que envolve o AA como substrato para produção dos mediadores lipídicos, as enzimas 5-, 8- e 12-LOX têm características pró-inflamatórias e pró-carcinogênicas, enquanto a isoforma 15-LOX é anti-inflamatória e anti-carcinogênica (124).

#### 1.2.3.1 Enzima 5-Lipoxigenase

A enzima 5-LOX utiliza o AA como substrato para produzir mediadores denominados leucotrienos (LT), os quais foram encontrados pela primeira vez em leucócitos, de onde derivou o seu nome (125). Essa enzima catalisa a peroxidação do AA, transformando-o em ácido 5*S*- hidroperoxieicosatetraenoico (5*S*-HPETE) e ácido 5*S*-hidroxieicosatetraenoico (5*S*-HETE) (126); 5-LOX pode metabolizar o produto hidroperóxido a um epóxido, formando os leucotrienos, especificamente o LT-A<sub>4</sub> (125, 127, 128). Este processo requer a atividade de uma enzima FLAP (*Five Lipoxigenase-Activator Proteins*), que ativa a enzima 5-LOX e promove a sua translocação para a membrana nuclear (124).

Nessa via, o AA é convertido pela 5-LOX em LT-A<sub>4</sub>, e este, por sua vez, é convertido enzimaticamente nos compostos bioativos como o LT-B<sub>4</sub>, o LT-C<sub>4</sub>, LT-D<sub>4</sub> e LT-E<sub>4</sub> (129). Os LT bioativos LT-C<sub>4</sub>, LT-D<sub>4</sub> e LT-E<sub>4</sub> são denominados cisteinil LT (Cys-LT), para distingui-los daqueles LT que não contém a cisteína – LT-B<sub>4</sub> (125).

LTs atuam pela ligação a receptores específicos que estão localizados na porção externa da membrana plasmática de células estruturais e inflamatórias, estimulando respostas celulares que são rápidas e de curta duração. Suas ações são mediadas por receptores acoplados a proteína G, BLT1 e -2 para LT-B<sub>4</sub> e Cys-LT1 e -2 para Cys-LT's (128, 129). O receptor BLT1 se liga ao LTB<sub>4</sub> com alta afinidade, e o BLT2 se liga ao LTB<sub>4</sub> e muitos outros LT com baixa afinidade; da mesma forma, os receptores Cys-LT1 e -2 reconhecem Cys-LT com diferentes afinidades (130).

A expressão da enzima 5-LOX nas células polimorfonucleares, em monócitos/macrófagos, em mastócitos, linfócitos B, células dendríticas e células espumosas do tecido aterosclerótico, permite que os produtos dessa via atuem como mediadores inflamatórios causando quimiotaxia de fagócitos e aumento da permeabilidade vascular (129).

Além disso, os LT apresentam outras ações biológicas e têm sido reconhecidos como fatores importantes em inúmeros processos patológicos: incluindo doenças alérgicas (como asma, dermatite atópica e encefalomielite alérgica), doenças inflamatórias locais e sistêmicas (lesão traumática da medula espinhal, artrite reumatoide, psoríase e doenças cardiovasculares) envelhecimento, câncer em diversos órgãos e desenvolvimento normal do SNC (131-133). O ácido 5S-HETE e LTB<sub>4</sub> são pró-carcinogênicos e inibem a apoptose de células tumorigênicas (134).

O EPA também serve como substrato para a enzima 5-LOX, dando origem a produtos da série 5 de LT. Os eicosanoides produzidos a partir de EPA são biologicamente menos ativos que aqueles derivados do AA (135).

#### *1.2.3.2 Enzima 8-Lipoxigenase*

A enzima 8-LOX, dentre as LOX, é a que recebe menor atenção. Ela está presente em camundongos e apresenta grande homologia com a enzima 15-LOX de humanos, embora seus produtos e atividades sejam distintos. A enzima 8-LOX produz o ácido 8S-HETE em camundongos após a indução de irritação da epiderme (136). A expressão desse mediador não está presente em condições normais da epiderme, porém após alguns estímulos, a enzima 8-LOX é rapidamente liberada pelos queratinócitos atuando de forma autócrina ou parácrina (137).

O ácido 8S-HETE tem papel importante na diferenciação de queratinócitos - induz efeitos genotóxicos e contribui para a mutagênese de células tumorais. Quando presente em níveis elevados, aumenta a incidência de tumores e, ainda, acelera o desenvolvimento dos mesmos (137, 138).

### 1.2.3.3 Enzima 12-Lipoxigenase

A enzima 12-LOX é apresentada sob quatro isoformas: *platelet-type 12S-LOX*, *leukocyte-type 12S-LOX*, *epidermal-type 12S-LOX* e *12R-LOX*; são encontradas nas plaquetas, eosinófilos, células endoteliais, queratinócitos, entre outras (139, 140).

A conversão do AA pela enzima 12S-LOX em ácido 12S-HPETE e, este, a ácido 12-HETE, ocorre após algum estímulo inflamatório, onde citocinas pró-inflamatórias rapidamente induzem a translocação da enzima 12S-LOX (141).

A conversão de 12S-HPETE em 12S-HETE nos tecidos pode também contribuir para o potencial invasor de tumores derivados de vários tipos de linhagens de células tumorais, onde a habilidade de um tumor em gerar 12S-HETE está correlacionada com o seu potencial metastático (142-144).

O ácido 12S-HETE está presente em condições patológicas de estresse oxidativo e disfunção mitocondrial e é conhecido como um mediador pró-oxidante, anti-apoptótico e capaz de causar citotoxicidade (145). Além disso, tem ação sobre as células da musculatura lisa, com atividade de vasoconstrição (146) e envolvimento em doenças vasculares (147). Ainda, exercem ação sobre as células das ilhotas pancreáticas, afetando a produção de insulina e, conseqüentemente causando hiperglicemia (148).

Existe também a enzima 12R-LOX, que por sua vez produz o estereoisômero 12R-HETE. No entanto, essa enzima e seu substrato são menos estudados que as outras isoformas das enzimas LOX; essa enzima foi encontrada pela primeira vez em pele humana. Alguns dados indicam que 12R-HETE promove a proliferação de células da linhagem tumoral do câncer de cólon (124).

### 1.2.3.4 Enzima 15-Lipoxigenase

Existem duas isoformas da enzima 15-LOX, 15-LOX-1 (*reticulocyte/leukocyte-type*) e -2 (*epidermal-type*); caracterizadas pela diferença de suas distribuições nos tecidos e pelo substrato (149). O substrato preferido para a 15-LOX-1 é o ácido linoleico e para a -2 é o AA; a primeira converte o ácido linoleico a ácido 13S-hidroperoxioctadecadienoico (13S-HPODE) e este a ácido 13S- hidroxioctadecadienoico (13S-HODE), mas também pode utilizar o AA como substrato e o converter a 15S-HPETE e ainda, em pequenas

quantidades a 12S-HPETE. A segunda converte quase que exclusivamente o AA em 15S-HPETE, e este pela ação de uma peroxidase é transformado a 15S-HETE (124) ou, então, pela ação de uma epoxigenase, forma as lipoxinas a partir de LTA4 liberado por células vizinhas (149, 150).

Os ácidos 13S-HODE e 15S-HETE são conhecidos por atuarem como mediadores pró-apoptóticos, anticarcinogênicos e imunomoduladores; porém, diferentes padrões de expressão sugerem que eles tenham papéis biológicos distintos, sinérgicos e/ou antagônicos sobre diferentes tipos celulares (149, 151). Eles também exibem efeitos distintos sobre variados tipos de células tumorais (152). O complexo arranjo dos produtos originados pela atividade catalítica das enzimas 15-LOX são tecido-específicos e com ações pró- e anti-inflamatórias. Estão envolvidas tanto na promoção, como na resolução da inflamação (153).

As enzimas 12-LOX *leukocyte-type* e 15-LOX -1 formam produtos similares de um substrato comum e por isso, muitas vezes são descritas como 12/15-LOX (153).

A expressão da enzima 15-LOX-1 contribui para a resolução da inflamação e para a diferenciação terminal de células normais. Promove eventos anticarcinogênicos, incluindo diferenciação e apoptose, inibe a inflamação crônica, angiogênese e metástase (154). Essa isoforma é expressa pela maioria dos tecidos normais e está presente em baixas concentrações em vários tipos de carcinomas humanos, indicando um perfil anticarcinogênico (155).

O produto 13S-HODE da via 15-LOX-1 restaura a apoptose em células de câncer, processo este que aparece diminuído e é crítico para os eventos de carcinogênese (156, 157). O aumento nos níveis de 13S-HODE em cultura de glioma demonstrou um papel pró-apoptótico para 15-LOX-1 (158). Além disso, enzima 15-LOX-1 está envolvida no processo de oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL), evento que é responsável por iniciar a aterosclerose (159).

Seguindo o mesmo padrão de expressão da enzima 15-LOX-1 quanto ao processo carcinogênico, a expressão da isoforma da 15-LOX-2 perde seu poder de expressão nos tecidos tumorais, enquanto está presente nos tumores benignos, assim como nos tecidos normais (123). Alguns estudos sugerem que a enzima funciona como um regulador negativo de alguns tipos de células tumorais (160, 161).

A enzima 15-LOX-2 e seus produtos, 15S-HETE e 12S-HETE têm mostrado induzir a proliferação e migração em células endoteliais (124); um apresenta efeito oposto ao outro

no processo inflamatório e angiogênese, onde 15S-HPETE tem atividade angiostática e 15S-HETE é pró-angiogênico (162).

Existe um balanço dinâmico na atividade das LOX, sendo que interações antagônicas podem ocorrer entre 5- e 15-LOX e, entre 12- e 15-LOX, em vários modelos experimentais. Essas interações envolvem efeitos diretos dos produtos de 15-LOX-1(13-S-HODE) e -2 e (15-HETE) sobre 5- e/ou 12-LOX ou seus respectivos produtos (124).

#### 1.2.3.5 *Biossíntese transcelular de produtos derivados da interação entre LOX*

A análise da interação entre as enzimas 5-LOX e 15-LOX e seus produtos permitiram a descoberta das lipoxinas (LX), as quais foram inicialmente isoladas de leucócitos. O nome “lipoxina” foi dado visto que sua síntese ocorre através da interação entre lipoxigenases (*lipoxigenase interaction products*) (163).

As LX são mediadores lipídicos formados pela oxidação enzimática direta dos PL de membrana, através de um envolvimento entre metabolismo transcelular (interação célula-célula) do AA em um sítio de inflamação, normalmente no endotélio vascular, onde ocorre interação leucócitos-plaquetas e/ou interação leucócitos-células endoteliais e, só então, a conversão do AA a LX (163). Essa interação exige o envolvimento de pelo menos duas LOX (164).

O produto 15S-HETE é um intermediário-chave na formação das lipoxinas, as quais requerem a ação sequencial das enzimas 15-LOX e 5-LOX ou de 5-LOX e 12-LOX, esta última observada em menor proporção.. As lipoxinas derivadas do ácido 15S-HETE, pela enzima 15-LOX, ou mesmo pelas enzimas 5-LOX de neutrófilos ou *platelet*-12-LOX, são denominadas de lipoxina A4 (LX-A4) e seu isômero posicional -B4 (LX-B4) (163, 165).

Na dupla lipoxigenação pela enzima 15-LOX que ocorre sobre a molécula do AA, o produto 15S-HETE formado, é rapidamente convertido pela enzima 5-LOX de neutrófilos a LX. Esse evento, conseqüentemente, reduz a taxa de síntese de LT (106). Por outro lado, a dupla oxigenação que ocorre no AA pela enzima 5-LOX forma o LT-A4, o qual será liberado da célula, leva à formação de LX-A4 pela enzima-12-LOX de células aderentes adjacentes (166, 167).

As LX são rapidamente geradas para atuar de forma autócrina e/ou parácrina e sofrem rápida inativação metabólica (168). As ações anti-inflamatórias das LX são mediadas através da sua ligação de alta afinidade a seus receptores ALX/FPR2, que são

acoplados à proteína G. No entanto, este receptor não apresenta especificidade à LX, apresentando diversos agonistas, incluindo lipídeos e peptídeos com diferentes afinidades, o que leva à ativação de diferentes vias de sinalização (169, 170).

As LX são biossintetizadas *in vivo* nos sítios inflamatórios e, portanto, são potentes mediadores anti-inflamatórios, além de mediadores pró-resolução da inflamação, atuando como imunomodulares e contra as ações pró-inflamatórias das PG e LT (169). As LX atuam também limitando a quimiotaxia, adesão e transmigração de neutrófilos e são potentes quimioatratadores de monócitos, promovendo a captação dos corpos apoptóticos de neutrófilos por macrófagos (171, 172). Portanto, as LX são uma classe de mediadores lipídicos que atuam no controle e programação da resposta inflamatória inata aguda e na sua resolução (173).

Além das LX, existem outros mediadores lipídicos especializados que estão envolvidos também no papel duplo de resposta antiinflamatória e pró-resolução da inflamação de forma similar às LX. Esses mediadores são denominados resolvinas (Rv – *resolution phase interaction products*) e protectinas (PD) e foram identificados pela primeira vez em exudatos inflamatórios em fase de resolução (174, 175). Ambas as moléculas são sintetizadas dos AGPI n-3, EPA e DHA, pelas enzimas 5-, 12- e 15-LOX (176).

As Rv são derivadas tanto do ácido DHA como do EPA, e conforme sua origem elas podem pertencer a diferentes séries de Rv. As Rv sintetizadas a partir do DHA pertencem a série D das Rv (RvD) e as sintetizadas a partir do EPA pertence a série E das Rv (RvE); por outro lado, as protectinas também são derivadas do DHA (PD) (175).

Os membros bioativos das resolvinas e protectinas compreendem uma família de cinco séries químicas de mediadores lipídicos, as quais compartilham estruturas e apresentam propriedades anti-inflamatórias complementares: 18R-Rv do EPA, 17R-AT-Rv (*aspirin-triggered- AT*) do DHA, 17S-Rv do DHA (RvD1– RvD6), PD do DHA, e 17R-AT-PD (177).

A síntese das RvD e PD envolve a via 15-LOX, enquanto a síntese das RvE envolve a via 5-LOX - para a síntese de ambas pode haver envolvimento da enzima COX-2 e aspirina (177, 178).

Existem seis isômeros das Rv da série D: RvD1, -2, -3, -4, -5 e -6, dos quais, os biologicamente ativos são RvD1-4 (179). Derivadas também do DHA, as protectinas apresentam apenas uma isoforma biologicamente ativa, a PD1, que pode ser chamada de



neuroPD1, visto a sua atividade de neuroproteção quando produzida em tecidos neurais (175, 179).

As RvD são sintetizadas envolvendo oxigenações sequenciais de DHA pelas enzimas 15-LOX das células endoteliais, seguida da ação da enzima 5-LOX de neutrófilos, formando 17S-hidroxi-RvD (RvD1-6). No entanto, as PD são sintetizadas por células mononucleares pela conversão de DHA em um mediador contendo componente docosatrieno (DT) pela ação sequencial de 15-LOX e 5-LOX a intermediários epóxidos, os quais sofrem ação enzimática para formar esse componente trieno, dando origem às PD (180). As PD são distinguidas das RvD justamente pela presença deste conjugado trieno de dupla ligação e por sua potente bioatividade tecido-específica (181).

Existem dois isômeros das Rv da série E: RvE1 e RvE2. Na presença da enzima COX-2 em células endoteliais, ocorre a conversão de EPA em ácido 18R-hidroxi-eicosapentanoico (18R-HEPE), o qual é liberado para os leucócitos adjacentes para a subsequente conversão pela enzima 5-LOX em RvE1 ou -2 (174, 181, 182).

Os receptores para a ligação desses mediadores são ligante-específicos e acoplados à proteína G, sendo que os receptores para RvD, RvE e NPD são chamados ResoDR-1, ResoER-1 e NPDR, respectivamente (177).

Ambas, RvD1 e -2 e RvE, são potentes reguladoras da infiltração de neutrófilos em tecidos como cérebro e pele (175, 179); também estão envolvidas na função granulocítica e clearance dos neutrófilos e reduzem a liberação de citocinas pró-inflamatórias, aumentando a fagocitose de corpos apoptóticos pelos macrófagos. Assim, esses mediadores são potentes reguladores da inflamação (183-185).

Assim como as LX, ao limitar a inflamação, as Rv antagonizam o receptor BTL1 e, portanto, reduzem as ações dos LT (186).

A dieta rica em AGPI n-3 pode fornecer benefícios para manter a homeostase de um organismo, através da produção aumentada dos mediadores lipídicos derivados desses AGPI, como as Rv e as PD, que podem promover efeitos anticarcinogênicos, antiinflamatórios, imunomodulatórios e citoprotetivos, especialmente no desenvolvimento e função neuronal (187).

#### 1.2.3.5.1 Ativação de mediadores lipídicos pela aspirina

A aspirina é o principal fármaco antiinflamatório não esteroideal (AINE) que, ao entrar em contato com a enzima COX-2, a torna acetilada em um resíduo de serina próximo ao seu sítio ativo/catalítico, impedindo o acesso do AA e/ou DHA. A acetilação da enzima COX-2 não a inativa completamente, como ocorre quando a COX-1 é acetilada. A COX-2 acetilada realiza uma reação incompleta, convertendo o AA ou DHA em 15R-HETE (configuração R) (188).

Essa inativação parcial da COX-2 redireciona a transformação do AA para a síntese de 15R-HETE e posterior formação de 15-epi-isômeros (chamados de *aspirin-triggered - AT*), diminuindo a síntese de PG (189). A formação destes mediadores ocorre através da interação célula-célula, como neutrófilos e células endoteliais (190, 191).

Acredita-se que, em parte, os efeitos antiinflamatórios e antiálgicos da aspirina são mediados pela indução da formação desses compostos “*aspirin-triggered*”, além da inibição da síntese de PG (192). Todos esses compostos AT são moléculas que apresentam maior estabilidade, maior resistência à inativação metabólica e maior potência na bioatividade antiinflamatória, quando comparados com as moléculas nativas, aquelas não derivadas da reação catalisada pela enzima COX-2 acetilada (184). As *aspirin-triggered* apresentam perfil antiinflamatório e pró-resolução da inflamação.

Quando o AGPI é o AA, este é metabolizado pela enzima COX-2 acetilada, na presença de aspirina, e, em seguida, o produto 15R-HETE é metabolizado pela enzima 15-LOX (153, 193), através da interação célula-célula é formado a 15R-epi-lipoxin (15-epi-LX) (190), chamada lipoxina ativadas pela aspirina (ATL; *aspirin-triggered lipoxin*) (192, 194).

As ATL são análogos, isômeros endógenos, metabolicamente estáveis das LX-A4 e -B4, cujas sínteses são iniciadas pela enzima COX-2 acetilada ao invés de 15-LOX. Estes mediadores medeiam suas bioatividades via receptor ALX (190), e exercem potente atividade anti-inflamatória inibindo o recrutamento de neutrófilos nos sítios de inflamação, a degranulação de neutrófilos e, a liberação de citocinas pró-inflamatórias, ao mesmo, promovendo a quimiotaxia de monócitos e macrófagos (195-197).

Outro AGPI precursor para a formação de mediadores *aspirin-triggered* é o AGPI n-3 DHA. A catálise do DHA pela COX-2 acetilada gera primeiramente o intermediário 17R-HDHA, o qual é sequencialmente oxigenado pela 5-LOX dando origem ao produto

17-epi-resolvina D1 (17-epi-RvD1), também conhecido como *aspirin-triggered resolvin D1*(AT-RvD1) (175).

Assim como RvD1 e ATL, as AT-RvD1 são potentes mediadores locais gerados durante a fase de resolução da inflamação e exibem potente ação antiinflamatória e imunomoduladora, inibindo a infiltração de neutrófilos e promovendo a quimiotaxia de monócitos (175, 179).

### 1.2.1 Epoxigenase

A via da epoxigenase, também conhecida como via do citocromo P450 (CYP450), forma os ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs), 20-hidroxi-eicosatetraenoico (20-HETE) (181) e ainda, pode produzir 12R-HETE (124). A enzima CYP450 metaboliza os AGPI AA, EPA e DHA derivados dos PL de membrana (198).

Em humanos, já foram estabelecidas 57 CYP450 funcionais com diferentes papéis no metabolismo (199); diferentes reações (oxidativas, peroxidativas e redutoras) (200) e diferentes substratos químicos endógenos, como esteroides, PG e AG, e xenobióticos (201, 202).

O produto oxigenado resultante da metabolização pela CYP é dependente da isoforma envolvida na catálise (203). Como produtos da oxidação do AA pelas enzimas CYP podem ser formadas quatro isoformas do ácido EET (5,6-, 8,9-, 11,12- e 14,15-EET), os quais funcionam como mediadores lipídicos (198, 204) que são rapidamente hidrolisados pelas enzimas hidroxilases epóxido solúveis (sEH) em seus metabólitos correspondentes, os quais são biologicamente menos ativos (198, 205-207) ou podem formar o ácido 20-HETE, o qual está altamente expresso no rim e atua como segundo mensageiro de vários hormônios e fatores de crescimento (208).

O ácido EET tem efeitos antiinflamatórios na vasculatura e no rim, além de efeitos antinociceptivos e protetores sobre o miocárdio e cérebro (206, 207). Os EET possuem efeitos vasodiladores, pro-angiogênicos e anti-apoptóticos (198).

Os epóxidos derivados de EPA após a ação da CYP contam com 5 isômeros (5,6-, 8,9, 11,12-, 14,15-, e 17,18-EET), enquanto que epóxidos derivados de DHA contam com 6 isômeros (4,5-, 7,8-, 10,11-, 13,14-, 16,17-, e 19,20-EDP) (204).

As implicações biológicas nas quais os metabólitos de EPA e DHA dependentes de CYP estão envolvidos parecem ter efeitos de proteção vascular e cardioproteção (209).

### 1.3 MEDIADORES PRÓ-RESOLUÇÃO DA INFLAMAÇÃO EM ESTUDOS EXPERIMENTAIS

A descoberta dos mediadores lipídicos pró-resolução é bastante recente; na última década, estudos experimentais *in vitro* e *in vivo* vêm tentando elucidar os mecanismos celulares e moleculares dessas moléculas envolvidas com a inflamação e/ou resolução da inflamação (210). Vários processos biológicos envolvendo tais mediadores já foram esclarecidos através desses modelos experimentais e, adicionalmente, esses mediadores têm sido o foco da atenção para inibição da dor consequente ao processo inflamatório.

Modelos animais induzindo diferentes tipos de patologias tem contribuído para novos conhecimentos acerca das atividades exercidas pelos mediadores pró-resolução da inflamação. Entre eles, podemos destacar: 1) modelo de pancreatite crônica, onde RvD1 foi capaz de reverter o comportamento nociceptivo, mas não o comportamento de ansiedade nem a atividade locomotora e explorativa dos ratos (211); 2) modelo de declínio cognitivo induzido por cirurgia, onde AT-RvD1 foi administrada sistemicamente de forma profilática apresentando atividade de proteção contra neuroinflamação, disfunção sináptica e declínio cognitivo (212); 3) modelo de edema de pata induzido pela injeção do agonista des-Arg<sup>9</sup>-BK em animais pré-tratados com LPS, onde a administração intraperitoneal de RvE1 inibiu a expressão dos receptores B<sub>1</sub> de cininas, além de prevenir a infiltração de neutrófilos no sítio de inflamação (213); 4) modelo de sepse, onde a RvD2 apresentou potente papel imunomodulador de neutrófilos, controlando seu recrutamento ao sítio de inflamação, diminuindo a sua interação com células endoteliais, modulando a expressão do receptor para moléculas de adesão (185).

Além dos estudos descritos acima, muitos outros, não menos importantes, demonstram diferentes efeitos das resolvinas sobre modelos experimentais de diversas doenças como diabetes (214), lesão pulmonar aguda (215), inflamação das vias aéreas (216), inflamação ocular (217), dermatite atópica (218), asma alérgica (219), entre outros.

Interessantemente, alguns estudos demonstraram que a administração de mediadores lipídicos pró-resolução da inflamação contribui também para a redução da nocicepção em modelos animais (220, 221). Além disso, os diferentes tipos de mediadores da resolução da inflamação exercem suas ações de formas distintas sobre diferentes tipos de receptores, como já demonstrado (220). Park e col. (2011) investigaram as ações da RvD1, -D2 e -E1 sobre os receptores de potencial transitório (TRP). Os mediadores

testados inibiram marcadamente o potencial doloroso exercido pelos receptores TRPV1 e TRPA1. A atividade de inibição do receptor TRPV1 foi demonstrada de forma bastante eficaz após a administração de RvD2. No entanto, a RvE1 mostrou menor eficácia e a RvD1 não mostrou efeito, nem mesmo em altas concentrações. Ao analisar os efeitos sobre o potencial do receptor TRPA1, foi observado que RvD2 o inibiu com alta eficácia, a RvD1 com eficácia moderada, enquanto, a RvE1 não exerceu nenhum efeito (220).

Pode-se dizer que os dados anteriormente descritos foram complementares àqueles obtidos em um estudo que analisou o potencial inibitório da RvD1 sobre os receptores TRPA1, TRPV3 TRPV4. Tal estudo investigou o efeito da RvD1 sobre a nocicepção induzida pela inflamação e demonstrou que os efeitos sensoriais gerados pela ativação dos TRP foram inibidos pela RvD1, sugerindo potente atividade antinociceptiva para este mediador lipídico (222).

Através da indução de colite inflamatória em camundongos, Bento e col. (2011) avaliaram a atividade de três mediadores pró-resolução da inflamação: 17S-hydroxy- DHA (precursor da série D das resolvinas), RvD2 e AT-RvD1. Os dados mostraram efeitos anti-inflamatórios sistêmicos nesse modelo de colite, atribuídos aos mediadores testados. Os autores sugerem que tais efeitos estão associados com a diminuição do infiltrado de neutrófilos, bem como, com a inibição da liberação de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias, e da expressão de moléculas de adesão em neutrófilos (221).

Adicionalmente às contribuições dos modelos experimentais, estudos *in vitro* agregam maior conhecimento acerca dos efeitos de tais mediadores (216, 223, 224).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a ação de mediadores lipídicos derivados de ácidos graxos poli-insaturados em um modelo de fibromialgia em camundongos, utilizando testes comportamentais de nocicepção e depressão.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar os efeitos analgésicos de mediadores lipídicos derivados de ácidos graxos poli-insaturados sobre a alodínia mecânica em camundongos.

- Investigar o efeito inibitório de mediadores lipídicos derivados de ácidos graxos poli-insaturados no comportamento depressivo nos camundongos e na atividade locomotora.

- Avaliar os efeitos dos tratamentos com os mediadores pró-resolução sobre a expressão do marcador neuronal c-Fos.

- Avaliar os níveis de neurotransmissores centrais: serotonina, dopamina e glutamato.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 ARTIGO CIENTÍFICO

## **EFFECTS OF D-SERIES RESOLVINS ON BEHAVIORAL AND NEUROCHEMICAL CHANGES IN A FIBROMYALGIA-LIKE MODEL IN MICE**

Artigo submetido ao periódico *Neuropharmacology*  
Fator de Impacto: 4,114

*Neuropharmacology*

*Title: EFFECTS OF D-SERIES RESOLVINS ON BEHAVIORAL AND  
NEUROCHEMICAL CHANGES IN A FIBROMYALGIA-LIKE MODEL IN MICE*

*Authors: Caroline Klein; Nathalia Sperotto; Izaque Maciel; Carlos Leite; Alessandra de  
Souza; Maria Martha Campos*

*Article Type: Research Paper*

*Dear Dr. Maria Martha Campos,*

*Your submission entitled "EFFECTS OF D-SERIES RESOLVINS ON BEHAVIORAL AND  
NEUROCHEMICAL CHANGES IN A FIBROMYALGIA-LIKE MODEL IN MICE" has  
been received by Neuropharmacology.*

*You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial  
System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/neuropharm/>*

*Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.*

*Thank you for submitting your work to this journal. Please do not hesitate to contact me if  
you have any queries.*

*Kind regards,*

*Neuropharmacology*

\*\*\*\*\*

*For any technical queries about using EES, please contact Elsevier Author Support at  
[authorsupport@elsevier.com](mailto:authorsupport@elsevier.com)*

## EFFECTS OF D-SERIES RESOLVINS ON BEHAVIORAL AND NEUROCHEMICAL CHANGES IN A FIBROMYALGIA-LIKE MODEL IN MICE

Caroline P. Klein<sup>a</sup>, Nathalia D. M. Sperotto<sup>b</sup>, Izaque S. Maciel<sup>c</sup>, Carlos E. Leite<sup>d</sup>,  
Alessandra H. Souza<sup>d</sup>, Maria M. Campos<sup>a,c,d,e</sup>

<sup>a</sup>Postgraduate Program in Cellular and Molecular Biology, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS, Brazil.

<sup>b</sup>Faculty of Pharmacy, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS, Brazil.

<sup>c</sup>Postgraduate Program in Medicine and Health Sciences, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>d</sup>Institute of Toxicology and Pharmacology, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS, Brazil.

<sup>e</sup>School of Dentistry, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS, Brazil.

**\*Corresponding Author:** Maria Martha Campos, School of Dentistry and Institute of Toxicology and Pharmacology, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga, 6681, Partenon, 90619-900, Porto Alegre, Brazil. Phone number: 55 51 3320 3562; Fax number: 55 51 3320 3626; E-mail: camposmmartha@yahoo.com; maria.campos@puers.br



## **Abstract**

This study investigated whether the spinal or systemic treatment with the lipid resolution mediators resolvin D1 (RvD1), aspirin-triggered resolvin D1 (AT-RvD1) and resolvin D2 (RvD2) might interfere with behavioral and neurochemical changes in the mouse fibromyalgia-like model induced by reserpine. Acute administration of AT-RvD1 and RvD2 produced a significant inhibition of mechanical allodynia and thermal sensitization in reserpine-treated mice, whereas RvD1 was devoid of effects. A similar antinociceptive effect was obtained by acutely treating animals with the reference drug pregabalin. Noteworthy, the repeated administration of AT-RvD1 and RvD2 also prevented the depressive-like behavior in reserpine-treated animals, according to assessment of immobility time, although the chronic administration of pregabalin failed to affect this parameter. The induction of fibromyalgia by reserpine triggered a marked decrease of dopamine and serotonin (5-HT) levels, as examined in total brain, spinal cord, cortex and thalamus. Reserpine also elicited a reduction of glutamate levels in total brain, and a significant increase in the spinal cord and thalamus. Chronic treatment with RvD2 prevented 5-HT reduction in total brain, and reversed the glutamate increases in total brain and spinal cord. Otherwise, AT-RvD1 led to a recovery of dopamine levels in cortex, and 5-HT in thalamus, whilst it diminished brain glutamate contents. Concerning pregabalin, this drug prevented dopamine reduction in total brain, and inhibited glutamate increase in brain and spinal cord of reserpine-treated animals. Our data provide novel evidence, showing the ability of D-series resolvins AT-RvD1, and mainly RvD2, in reducing painful and depressive symptoms allied to fibromyalgia in mice.

**Keywords:** D-series resolvins; fibromyalgia; reserpine; neurotransmitters; pregabalin; mice.

## 1. Introduction

Fibromyalgia represents a frequent disorder mostly prevalent in women, characterized by chronic musculoskeletal pain allied to a series of other clinical alterations (Wolfe et al., 2010). The hallmark symptom is the chronic widespread pain, but the patients also present fatigue, depression, cognitive dysfunctions and sleep disturbances (Ceko et al., 2012; Wolfe et al., 2010). Of note, fibromyalgia has been associated to other painful syndromes, in which the symptoms overlap, such as temporomandibular disorder (Alonso-Blanco et al., 2012), irritable bowel syndrome (Feng et al., 2012), interstitial cystitis (Nickel et al., 2010) or chronic fatigue syndrome (Staud, 2012). The treatment of fibromyalgia is rather complex, involving both pharmacological and non-pharmacological approaches. The therapy relies on the long-term use of antidepressants and/or anticonvulsive agents, associated to regular physical exercise and cognitive behavior therapy (Bateman et al., 2013; Carta et al., 2013; Mease et al., 2011). Nevertheless, the available options display limited effects, being related to adverse reactions, compromising the life quality of individuals. Thus, there is a current need for identifying novel alternatives for the treatment of fibromyalgia, as well as to better characterize this syndrome.

The mechanisms underlying fibromyalgia are not totally understood, although clinical studies indicate abnormalities of nociception transmission, as the patients experience reduced pain threshold with exaggerated pain sensation, likely dependent on central sensitization (Gracely et al., 2002; Jensen et al., 2012; Petersel et al., 2011; Smith et al., 2011; Staud, 2012). These sensorial alterations are linked to diminished levels of monoamines, and increased production of excitatory neurotransmitters throughout brain (Harris, 2010; Schmidt-Wilcke and Clauw, 2011). Furthermore, some studies point out the relevance of inflammatory pathways in the pathogenesis of fibromyalgia, considering that

cytokines are implicated in both induction and maintenance of pain (Kadetoff et al., 2012; Uceyler et al., 2011; Uceyler et al., 2006).

Resolvins of E and D series represent a group of mediators widely implicated in the resolution phase of inflammation, which are derived from the  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA), respectively (Bento et al., 2011; Ji et al., 2011; Serhan and Chiang, 2013). Noteworthy, it has been recently suggested that resolvins are able to modulate nociceptive transmission, supposedly by preventing the production of pro-inflammatory cytokines, beyond the activation of transient receptor potential (TRP) channels (Ji et al., 2011; Sisignano et al., 2013). As could be expected on the basis of their potent anti-inflammatory effects, D-series resolvins, namely resolvin D1 (RvD1), aspirin-triggered resolvin D1 (AT-RvD1) and resolvin D2 (RvD2) has been recently demonstrated to trigger marked analgesic actions in rodent models of inflammatory nociception, including arthritis, pancreatitis and postoperative pain (Abdelmoaty et al., 2013; Huang et al., 2011; Lima-Garcia et al., 2011; Park et al., 2011; Quan-Xin et al., 2012; Xu et al., 2010). However, to our knowledge, there is no previous report regarding the effects of these mediators in fibromyalgia.

The present study was aimed to examine whether the spinal or systemic administration of DHA-derived resolvins might modulate painful and depression-like alterations in a mouse model of fibromyalgia induced by reserpine administration in mice. Our data provide novel evidence on the ability of AT-RvD1, and mainly RvD2, in modulating fibromyalgia-related behavioral alterations and central neurotransmitter levels. These results help to further understand the relevance of inflammation in fibromyalgia, and open new avenues for the treatment of that disorder.

## 2. Material and methods

### 2.1. Reagents

The following drugs and reagents were used: reserpine was purchased from Sigma Aldrich Chemical Company (St. Louis MO, USA); DHA-derived mediators were purchased from Cayman Chemical Company (Ann Arbor, USA); Pregabalin (Lyrica) was obtained from Pfizer (UK). Resolvin D1 (RvD1), aspirin-triggered resolvin D1 (AT-RvD1) and resolvin D2 (RvD2) were maintained at  $-80^{\circ}\text{C}$  and diluted immediately before using in phosphate-buffered solution (PBS) to the working dose. Reserpine was diluted extemporaneously in 0.5% acetic acid (PA; V/V in distilled water). Pregabalin was diluted just before experiments in sterile saline (NaCl 0.9%) solution.

### 2.2. Animals

Adult male Swiss mice weighing 25 – 30 g (obtained from the Central Animal Facility of the Federal University of Pelotas, Brazil) were used for pharmacological, behavioral and biochemical studies. Animals were housed under conditions of optimum light, temperature and humidity (12 h light-dark cycle,  $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , under 60 to 70% humidity), with food and water provided *ad libitum*. All research procedures and care of the animals were conducted in accordance with the National Institutes for Health (NIH) guidelines and were approved by the Animal Care and Ethics Committees (protocol number 12/00311) of Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), Brazil. All efforts were made to minimize animal suffering, and to keep the number of animals at the minimum to demonstrate consistent effects for the treatments. The number of animals used in each experiment is indicated in the Legends to the Figures.

### *2.3. Induction of fibromyalgia-like model in mice*

Fibromyalgia-like model was accomplished according to the method described by Nagakura et al. (2009) for rats, which was adapted for mice (de Souza et al.; 2014). Briefly, amine depletion was induced by the administration of reserpine (0.25 mg/kg), given by subcutaneous route (s.c.), once a day, during 3 consecutive days. Reserpine was dissolved in a 5-% acetic acid solution in distilled water (V/V). Control groups received vehicle, employing the same schedule of administration. The animals were subjected to the behavioral tests on the 4<sup>th</sup> day.

The dose and the time of treatments with reserpine were selected on the basis of previous pilot experiments and on the study of Nagakura et al. (2009). This scheme of treatment displayed behavioral changes in mice that were consistent with fibromyalgia symptoms, without inducing marked alterations of motor coordination (data not shown).

### *2.4. Drugs treatment protocols*

To verify the effects of DHA-derived mediators in the behavioral changes elicited by reserpine, the animals were acutely treated with RvD1, AT-RvD1 or RvD2, given by intravenous (i.v.) or intrathecal (i.t.) routes, dosed 30 min before the experimental sessions. Pregabalin was used as a positive control drug. Negative control groups received saline solution (NaCl 0.9 %, 10 ml/kg) at the same schemes of administration. Treatments were given as follows: lipid mediators (300 ng/mice, i.v.; or 40-80 ng/site, in 5 µl, i.t.), or pregabalin (20 mg/kg, i.v.; or 200 µg/site, in 5 µl, i.t.).

In a separate experimental set, we evaluated the effects of repeated administration of DHA-derived mediators, given by i.v. route. For this purpose, different groups of mice received the correspondent treatment: saline (10 ml/kg), pregabalin (20 mg/kg), RvD1, AT-RvD1 or RvD2 (all 300 ng/mouse), during three consecutive days, 30 min after daily

reserpine injection. At the 4<sup>th</sup> day, mice also received the respective drug treatment, dosed 30 min before behavioral evaluation.

The i.t. injections were performed according to the method described by Quintao et al. (2008) with some modifications. The needle (26 G1/2) was connected to a 10- $\mu$ l microsyringe and introduced through the skin; a volume of 5  $\mu$ l of saline solution (control) or containing resolvins or pregabalin was injected between the L5 and L6 vertebral spaces. The i.v. injections were performed through the retro-orbital venous plexus. In both cases, the animals were slightly anesthetized with isoflurane plus oxygen (3 % each).

The doses of resolvins or pregabalin were determined on the basis of previous publications and pilot experiments (Bento et al., 2011; Huang et al., 2011; Wallin et al., 2002). On the adopted schedules of treatment, none of the lipid mediators elicited any effect *per se* (data not shown).

Immediately after the behavioral tests, mice were euthanized through isofluorane inhalation, in order to perform biochemical and immunohistochemical assays, as described in the next sections.

## 2.5. Behavioral tests

### 2.5.1. Mechanical allodynia

Mechanical allodynia thresholds were measured using the up-down paradigm, originally described by Dixon (1980) and the method described by de Souza et al. (2013) for mice. Following the appropriate protocols of treatment, mice were acclimatized during 30 min in individual clear plexiglass boxes on an elevated wire mesh platform to allow access to the plantar surface of the hindpaws. Von Frey filaments of increasing stiffness (0.02–10 g) were applied to the hindpaw plantar surface with a pressure high enough to bend the filament. The absence of a paw lifting after 5 s led to using the next filament with

increased weight, whereas paw lifting indicated a positive response and led to using the next weaker filament. The stimulation continued for a total of 6 measurements, including the one before the first paw-lifting response had been made, or until 4 consecutive positive (assigned a score of 0.030) or 4 consecutive negative (assigned a score of 6.76) responses occurred. The 50% mechanical paw withdrawal threshold response was then calculated from the resulting scores as described previously by Chaplan et al. (1994), using the following formula:  $threshold\ 50\% = \log\ of\ the\ last\ hair\ used - (K \cdot mean)$ ; where K is the constant based on Dixon Table, and mean refers to the mean difference (in log units) between stimuli (for mice 0.44). The paw withdraw threshold was expressed in grams (g) and was evaluated before (basal records) and at the 4<sup>th</sup> day after induction of fibromyalgia. A significant decrease in paw withdraw threshold compared to baseline values was considered as mechanical allodynia.

### 2.5.2. Hot-plate

The hot plate test is used for determining the central antinociceptive effects of drugs (Le Bars et al., 2001). Nociceptive behavior in response to thermal stimulus in the hot-plate test was accomplished according the method described by Hunskaar et al. (1986), with slightly modifications. The surface of the hot plate was heated to a constant temperature of  $50 \pm 0.1^\circ\text{C}$ . Following appropriate treatments, mice were placed on the hot plate apparatus (Ugo Basile, Italy), which consists of a metal plate surrounded by a clear acrylic cage. The latency (s) to respond with hindpaw licking, hindpaw flick, or jump (whichever came first) was measured. Trials were terminated if the animals did not respond within 30 s to prevent any tissue damage.

### 2.5.3. *Forced swimming test*

The methodology used was the same described by Maciel et al. (2013). The experiments were carried out using a cylinder (18.5 cm diameter, 25 cm height) filled with water to the height of 17 cm. Water was maintained at 23-25°C. Mice were placed into the water and immobility was defined as absence of all movements except motions required for keeping the mouse's head above the water. The time during which mice remained immobile was quantified in seconds during a period of 6 min.

### 2.6. *Determination of neurotransmitters by LC-MS/MS*

The variations of dopamine, 5-HT and glutamate levels in reserpine-induced fibromyalgia were analyzed in brain and spinal cord samples according the method described by Gonzalez et al. (2011), with minor modifications. In these experiments, the total brain, the isolated thalamus and cortex, and the spinal cord were evaluated in animals submitted to the repeated treatment with lipid mediators. The samples were stored at -80 °C until the moment of extraction. The samples were homogenized in a 10-fold volume of formic acid (0.1 M) and centrifuged at 20,000 x g for 20 min at 4 °C. After, the supernatant was filtered (0.22 µm filter) and injected into an equipment UHPLC 1290/MS 6460 TQQQ-Agilent (all HPLC components and MassHunter software are from Agilent Technologies®). Chromatographic separations were performed using a Zorbax Eclipse Plus C18 2.1 x 50 mm 1.8-µm column. The flow rate of methanol (eluent A): formic acid 0.05% with 1 mM of heptafluorobutyric acid (HFBA) (eluent B) mobile phase was 0.2 ml/min, with a column temperature of 30°C. A gradient was used, starting at 95 % of eluent B constant for 0.5 min, and subsequently decreasing to 0 % in 3.5 min. Five microliters of samples were injected into the UHPLC system. The monitored transitions were: dopamine (154>137 and 154>91), serotonin (177>160) and glutamate (148>130 and



148>84). The results were expressed as the percentages of variation (previously obtained in nanograms/gram of tissue for dopamine and serotonin, and micrograms/gram of tissue for glutamate) in relation to control saline/saline-treated group (considered as 100%).

### 3. Results

#### 3.1. *Effects of acute treatment with AT-RvD1 or RvD2 on reserpine-related mechanical allodynia*

Initially, to assess the possible effects of  $\omega$ 3-DHA-derived lipid mediators in spinal or peripheral nociception processing in reserpine-treated mice, RvD1, AT-RvD1 or RvD2 were acutely administered i.t. or i.v., and the paw withdrawal threshold was measured by using von Frey filaments. Our data demonstrated that s.c. injection of reserpine significantly diminished the paw withdrawal threshold in relation to control mice (Fig. 1). Acute treatment with RvD1 had no significant effect on mechanical allodynia induced by reserpine, when dosed i.v. (300 ng/mouse; Fig. 1A) or i.t. (40 to 80 ng/site) (Fig. 1D). Concerning AT-RvD1, this lipid failed to significantly affect the mechanical allodynia allied to reserpine administration, when given by i.v. route (300 ng/mouse; Fig. 1B). Otherwise, AT-RvD1 was able to significantly reverse this parameter when administered i.t., at the dose of 80 ng/site, although it did not display any significant effect according to assessment at the dose of 40 ng/site. Of note, the treatment with RvD2 produced a marked inhibition of reserpine-induced mechanical allodynia, when administered by either i.v. (300 ng/mouse; Fig. 1C) or i.t. (40 ng/site; Fig. 1F) pathways. The anti-allodynic effect of RVD2 was comparable to that observed for the positive control drug pregabalin, administered i.v. (20 mg/kg) or i.t. (200  $\mu$ g/site) (Figure 1A to 1F).

#### 3.2. *Effectiveness of AT-RvD1 or RvD2 on reserpine-evoked thermal nociception*

Next, we investigated whether resolution lipid mediators might interfere with processing of thermal nociception by using the hot plate test. The administration of reserpine resulted in a significant reduction of latency (s) to respond to heat stimulus in this experimental model. As expected, the positive control drug pregabalin dosed by either i.v.

(20 mg/kg) or i.t. (200 µg/site) routes significantly inhibited the thermal nociception induced by reserpine (Fig. 2A to 2F). The systemic i.v. administration of AT-RvD1 or RvD2 (both 300 ng/mouse) was able to widely prevent thermal nociception in reserpine-treated mice (Fig. 2B and 2C, respectively), whereas the same i.v. dose RvD1 did not elicit significant effects (Fig. 2A). Concerning the protocols of i.t. administration, RvD2 was effective in reversing thermal nociception at the dose of 40 ng/site (Fig. 2F), although AT-RvD1 displayed significant antinociceptive effects only at 80 ng/site (Fig. 2E). Nonetheless, i.t. RvD1 (even at 80 ng/site) was devoid of significant effects in the hot-plate test (Fig. 2D).

### 3.3. Assessment of lipid mediators in the forced swimming test

The repeated s.c. administration of reserpine resulted in a significant increase of immobility time, in both the forced swimming test (Fig. 3) and the tail suspension model (Suppl. Fig. 2). This alteration was accompanied by a significant reduction of general locomotor activity in the open-field, considering the crossing or rearing counts (Suppl. Fig. 1). These parameters were not modified by pregabalin, dosed i.v. (20 mg/kg) or i.t. (200 µg/site). A partial reduction of immobility time in the forced swimming test was observed following the i.t. injection of RvD1 (80 ng/site; Fig. 3D), AT-RvD1 (40 ng/site; Fig. 3E) and RvD2 (40 ng/site; Fig. 3F), although no significant differences were achieved. For the i.v. treatments, all the tested resolvins failed to affect the immobility times (Fig. 3A, 3B and 3C). Noteworthy, the i.t. administration of RvD2 (40 ng/site) was able to partially reverse reserpine-induced decrease of locomotor activity in the open-field test (Suppl. Fig. 1I). Systemic (i.v.) or spinal (i.t.) treatments with  $\omega$ 3-DHA-derived lipid mediators evaluated in the present study did not elicit any unspecific central effect *per se*, as evaluated in the open-field arena (data not shown).

### *3.4. Effects of chronic treatment with $\omega$ 3-DHA-derived lipid mediators on reserpine-induced fibromyalgia-like model*

In another set of experiments, we verified the effects of chronic treatment with  $\omega$ 3-DHA-derived lipid mediators on reserpine-related nociception and immobility behaviors. As depicted in Fig. 4A, the repeated i.v. administration of AT-RvD1 and RvD2 (both 300 ng/mice), given daily, during 4 days, was able to significantly prevent the mechanical allodynia induced by reserpine, reaching an inhibition that was similar to that observed for the positive control drug pregabalin (20 mg/kg, i.v.). Additionally, the treatment with AT-RVD1 and RvD2 resulted in a marked inhibition of reserpine-induced thermal nociception (Fig. 4B) or increased immobility time (Fig. 4C), according to evaluation in the hot-plate and the forced swimming tests, respectively. Pregabalin also prevented thermal nociception, whereas this drug failed to significantly affect the immobility time (Fig. 4B and 4C). Concerning RvD1, the repeated administration of this lipid mediator (300 ng/mice) was not able to affect either the mechanical or the thermal nociception caused by reserpine, although it visibly reduced the immobility time (Fig. 4A to 4C). The tested resolvins also partially interfered with reserpine-induced diminishment of crossing and rearing numbers in the open-field test, although statistical difference was not achieved (all 300 ng/mouse; Suppl. Fig. 3). Furthermore, none of the protocols of treatment tested in this study displayed significant effects on spinal cord c-Fos expression (Suppl. Table 1 and Suppl. Fig. 4).

### *3.5. Modulation of central and spinal neurotransmitters after chronic administration of RvD2 or AT-RVD1 in reserpine-treated mice*

In this experimental set, the effects of repeated i.v. administration of RvD2 and AT-RvD1 (both 300 ng/mice), or pregabalin (20 mg/kg), were evaluated on the changes in the levels of dopamine, 5-HT and glutamate in reserpine-treated mice. Data was calculated as the percentage of variation in relation to saline-treated negative control group and is summarized in Table 1.

Reserpine-evoked fibromyalgia-like behavior was allied to a significant reduction of dopamine and 5-HT levels in all evaluated structures, including total brain, spinal cord, cortex and thalamus, in comparison to saline-treated control mice. In addition, it was possible to observe a significant diminishment of glutamate levels in the total brain and cortex of reserpine-treated animals, while this mediator was found significantly increased in the spinal cord and thalamus. The administration of RvD2 significantly prevented the loss of 5-HT in total brain, and reversed the glutamate changes in total brain and spinal cord. Concerning the treatment with AT-RvD1, this lipid mediator significantly restored the levels of dopamine in cortex, and 5-HT in thalamus, whilst it significantly inhibited the changes of glutamate contents in the total brain. Finally, pregabalin significantly prevented losses of dopamine in the total brain and changed glutamate levels in the total brain and spinal cord of reserpine-treated animals. However, the treatment with pregabalin was associated to a further elevation of glutamate, according to evaluation of thalamus.

#### 4. Discussion

Fibromyalgia is a complex painful syndrome, accompanied by a series of psychological and behavioral alterations, mostly affecting women, with prevalence rates varying from 1.4 % to 4.4 %. This condition seriously compromises the life quality of individuals, presenting great socioeconomic impacts (Busse et al., 2013). Moreover, the treatment of fibromyalgia is commonly prolonged, and associated with poor outcomes (Marcus et al., 2013). Therefore, additional research on the pathophysiology of fibromyalgia represents a matter of current interest.

To gain further insights into the mechanisms implicated in fibromyalgia, a set of experimental animal models have been developed during the last years (Desantana et al., 2013). In 2009, Nagakura et al. (Brederson et al., 2011; Nagakura et al., 2009; Ogino et al., 2013) validated a rat model of fibromyalgia, in which the animals are repeatedly treated with reserpine in order to deplete the monoamine stores, mimicking a series of behavioral and biochemical alterations allied to fibromyalgia (Brederson et al., 2011; Nagakura et al., 2009; Ogino et al., 2013). In the present study, we employed this model adapted to mice, to assess the potential effects of  $\omega$ 3-derived resolvins of D series, in comparison to the reference drug pregabalin.

The analgesic effectiveness of D-series resolvins has been investigated beforehand in different rodent models of inflammatory pain (Ji et al., 2011; Sommer and Birklein, 2010). Herein, we clearly demonstrate that RvD2 greatly inhibited either the mechanical or thermal nociception in the fibromyalgia-like model in reserpine-treated mice. Of note, RvD2 displayed marked analgesic effects when administered by systemic (300 ng/mouse) or epidural routes (40 ng/site), exhibiting a profile similar to that observed for the reference drug pregabalin. However, the systemic i.v. administration of AT-RvD1 (300 ng/mouse) failed to alter the mechanical allodynia in reserpine-treated mice, whereas it produced a

significant inhibition of thermal sensitivity. Furthermore, only higher spinal doses of this mediator (80 ng/site) displayed significant effects in mechanical and thermal nociception. Concerning RvD1, this lipid molecule completely failed to modify the mechanical or thermal sensitization in the fibromyalgia-like model induced by reserpine, independent on the route of administration. Thus, we might propose that RvD2 is likely more effective than AT-RvD1 in preventing painful changes allied to fibromyalgia, whilst RvD1 is devoid of effects. This proposition is in accordance with a previous study conducted by Park et al. (2011), which indicated a superior analgesic effectiveness for RvD2, given by peripheral or spinal routes of administration, in comparison to equivalent doses of RvD1 and RvE1, indicating distinct mechanisms of action for the tested resolvins. In addition, our results are somewhat in accordance with previous literature data showing beneficial analgesic effects for AT-RvD1 in complete Freund's adjuvant (CFA)-induced arthritis or in the carrageenan inflammation model (Abdelmoaty et al., 2013; Bang et al., 2012; Lima-Garcia et al., 2011). Otherwise, the present results are quite divergent from previous reports showing marked analgesic effects for spinally-administrated RvD1 in rodent models of postoperative pain and chronic pancreatitis, at a range of doses varying from 10 to 500 ng/site (Huang et al., 2011; Quan-Xin et al., 2012). RvD1 was also found effective in preventing nociception elicited by formalin, carrageenan or CFA, when dosed by different pathways of administration (Bang et al., 2012; Xu et al., 2013). Nevertheless, the possible absence of analgesic effects for RvD1 in reserpine-treated mice observed by us might well be related to the puzzled mechanisms implicated in fibromyalgia.

In our study, we opted for using pregabalin as the positive control drug, considering its therapeutic benefits and the reasonable side effects (Smith and Moore, 2012). Clinical trials demonstrate that pregabalin monotherapy alleviated painful symptoms, sleep alterations and fatigue in patients diagnosed with fibromyalgia (Malemud, 2009; Roth et

al., 2013). However, pregabalin does not seem to display antidepressant effects *per se* in fibromyalgia-affected individuals (Kim et al., 2013), although it has been described to improve the effects of classical antidepressant drugs in affective disorders (Karaiskos et al., 2013), and to reduce depression in mice submitted to chronic restraint stress (Valente et al., 2012). In this study, we clearly demonstrate that reserpine-induced fibromyalgia in mice was associated to a marked increase of immobility time, as verified in two distinct models of depression-like behavior, namely forced swimming and tail suspension tests, confirming and extending previous data provided by Nagakura et al. (2009). However, the increased immobility time in reserpine-treated animals was not significantly modified by pregabalin, or by any tested D-series resolvin, when these substances were administered acutely by i.v. or i.t routes.

Analyzing our results in the light of literature data, it is tempting to suggest that AT-RvD1, and mainly RvD2, might represent interesting alternatives for treating painful complications related to fibromyalgia, with outcomes comparable to those seen for pregabalin. Notwithstanding, the clinical chronic use of pregabalin has been correlated to the occurrence of some adverse effects, including dizziness, somnolence and peripheral edema (Malemud, 2009). On the other hand, on the basis of pre-clinical assays, resolvins appear to be well-tolerated and devoid of side effects, what might be a clear advantage from a translational point of view (Ji et al., 2011; Sommer and Birklein, 2010). To gain further insights into this hypothesis, we carried out an additional set of experiments, by testing the effects of repeated i.v. administration of D-series resolvins in the reserpine-induced model of fibromyalgia. Our results revealed that both RvD2 and AT-RvD1 produced marked analgesic effects in either mechanical allodynia or thermal sensitivity, similarly to that observed for pregabalin. Strikingly, the long-term administration of RvD2 and AT-RvD1 also reduced the immobility times in the forced swimming test, with a



partial effect for RvD1, revealing additional benefits for these molecules in the control of fibromyalgia-related symptoms, when compared to pregabalin. To our knowledge, there are no previous studies dealing with the effects of resolvins in pre-clinical models of depression. However, data obtained by us can be supported by literature data showing antidepressant-like effects for prolonged diet supplementation with DHA in mice (Jiang et al., 2012).

It was demonstrated that altered monoamine levels throughout the CNS of reserpine-treated animals is the main responsible for the nociceptive changes observed in this experimental fibromyalgia-like model (Nagakura et al., 2009). Furthermore, compelling evidence indicates that DHA dietary led to a significant increase of dopamine, 5-HT and 5-hydroxyindoleacetic acid levels in isolated mouse hypothalamus (Jiang et al., 2012). Therefore, we decided to evaluate to what extent the repeated systemic administration of resolvins of D-series might alter monoamine and glutamate levels in some brain regions and in the spinal cord of reserpine-treated mice. As expected and extending previous results (Nagakura et al., 2009), fibromyalgia-like behavior elicited by reserpine was accompanied by a marked decrease of dopamine and 5-HT levels in all evaluated structures, including total brain, spinal cord, cortex and thalamus. The administration of reserpine was also associated to low levels of glutamate in the total brain and cortex, while this excitatory neurotransmitter was greatly augmented in the spinal cord and thalamus. Remarkably, RvD2 administration prevented the loss of 5-HT in total brain, and reversed glutamate changes in total brain and spinal cord. Moreover, AT-RvD1 was able to restore the levels of dopamine in cortex, 5-HT in thalamus, and glutamate in total brain. Additionally, the administration of pregabalin significantly prevented losses of dopamine in the total brain, and inhibited the elevation of glutamate in the total brain and spinal cord of reserpine-treated mice. The different modulatory effects obtained for the

tested resolvins and for the positive control drug pregabalin might help to explain most behavioral data obtained by us: (i) the marked analgesic effects observed for RvD2 can be related to the reduction of glutamate production in the spinal cord and total brain; (ii) the antidepressant-like effects of both RvD2 and AT-RvD1 can be secondary to the modulation of 5-HT brain levels; (iii) the lack of antidepressant effects for pregabalin might be linked to the absence of 5-HT modulation. We examined the activation of c-Fos in the same protocol of chronic treatment with resolvins, but no significant differences were observed among the experimental groups, reinforcing the notion that modulation of neurotransmitters is the main feature of the model employed in this study.

Altogether, our results show, for the first time, that AT-RvD1, and mainly RvD2, might represent further alternatives to control fibromyalgia-related symptoms, especially in cases of poor clinical outcomes. Certainly, novel studies are required to better explore the mechanisms implicated in the analgesic and antidepressant effects displayed by resolvins of D-series in fibromyalgia, but it is possible to infer that regulation of specific TRP channels might take part in this process, likely resulting in regulation of neurotransmitter levels.

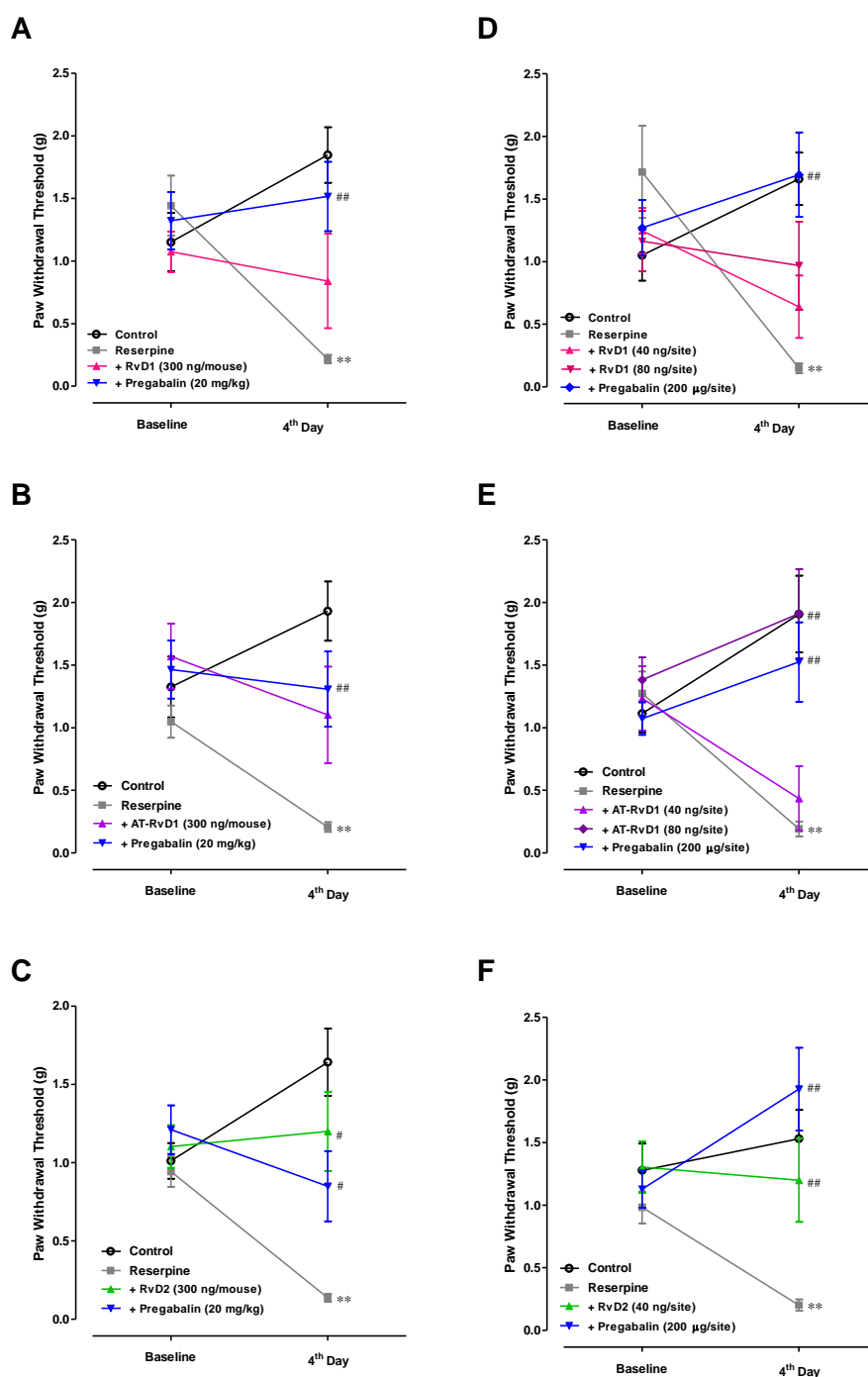
3.2

### **3.3 Acknowledgements**

This work was supported by CNPq and PUCRS, in addition to a FINEP research grant “Implantação, Modernização e Qualificação de Estrutura de Pesquisa da PUCRS” (PUCRSINFRA) # 01.11.0014-00. C.P.K. is a Msc. Postgraduate student in Cellular and Molecular Biology, receiving grants from CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

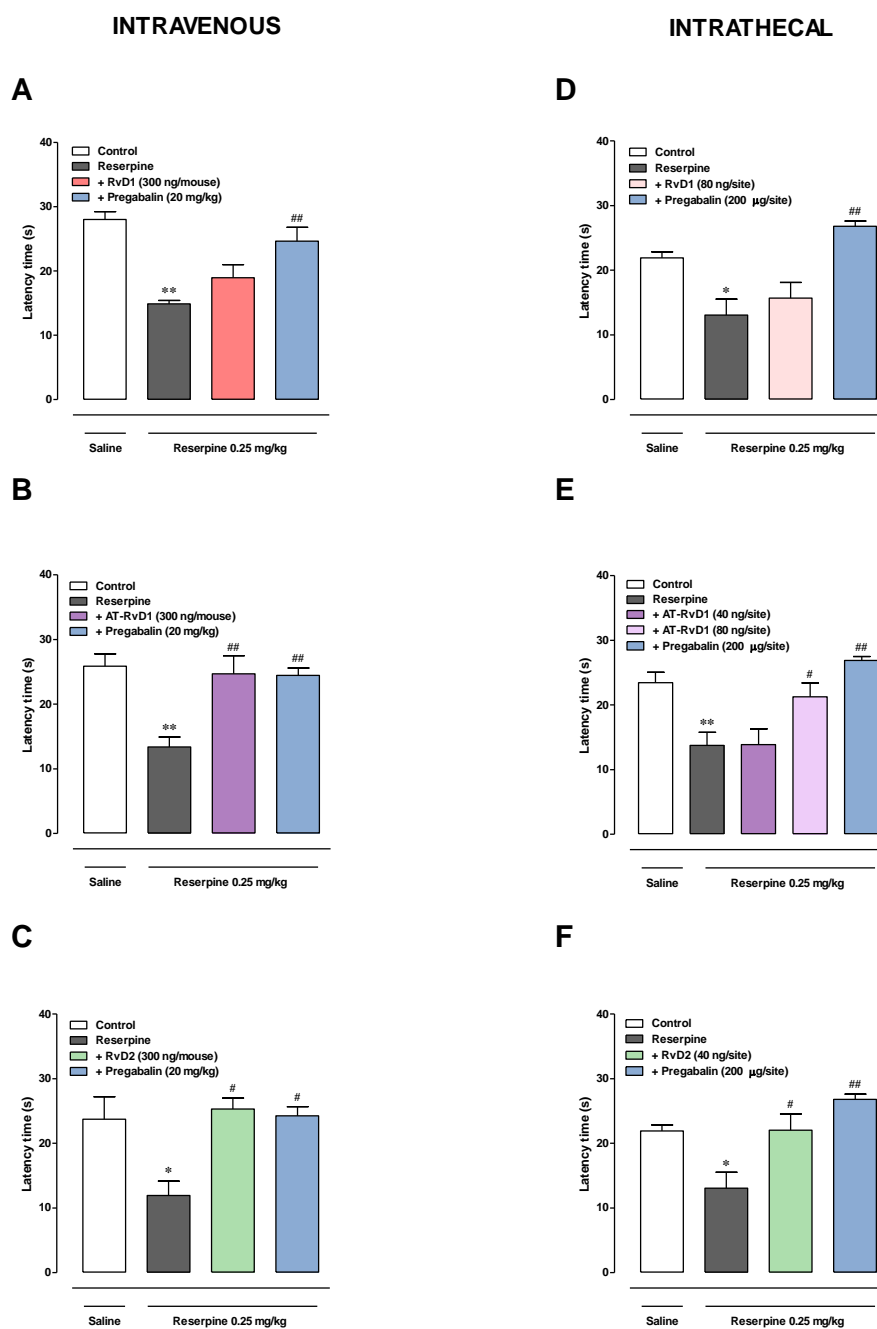
The authors have no conflicts of interest.

Figure 1.



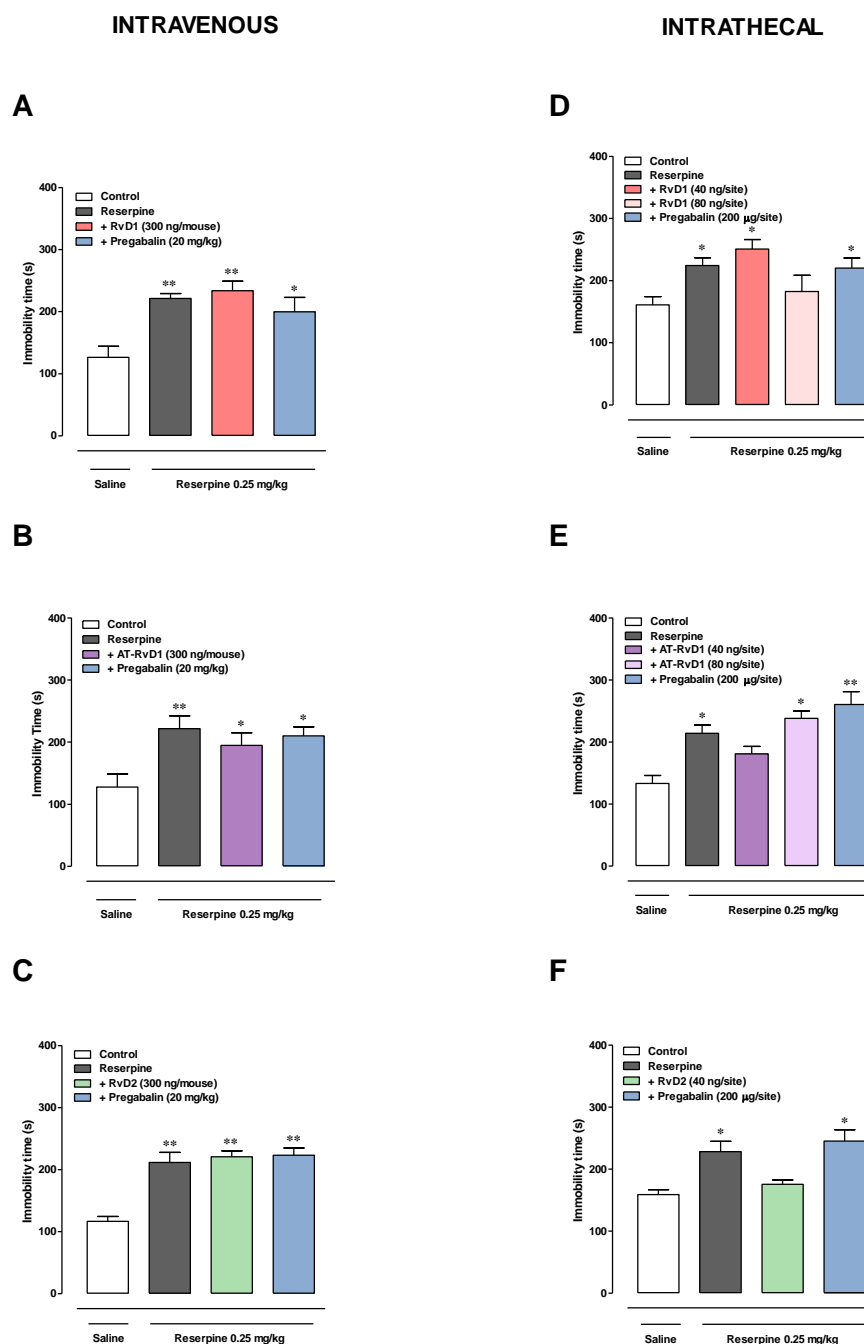
**Fig. 1.** Anti-allodynic effects of  $\omega$ 3-DHA-derived lipid mediators in the fibromyalgia-like model induced by reserpine in mice. Effects of acute treatment with RvD1 (A and D), AT-RvD1 (B and E) or RvD2 (C and F) dosed by intravenous (A-C) or intrathecal (D-F) routes on hindpaw withdrawal threshold (g) to tactile stimulation. Pregabalin was used as a positive control drug. Mechanical hypersensitivity was assessed before (baseline) and at the 4<sup>th</sup> day after onset of reserpine administration (0.25 mg/kg, s.c., once a day for three days). Each point represents the mean and the vertical lines indicate the standard error mean (SEM). \*\* $p < 0.01$  compared to control saline/saline group indicating development of mechanical allodynia; # $p < 0.05$  and ## $p < 0.01$  compared to reserpine/saline group. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test. (A)  $n = 9$  to 11 mice/group; (B)  $n = 5$  to 10 mice/group; (C)  $n = 9$  to 10 mice/group; (D)  $n = 4$  to 8 mice/group; (E)  $n = 9$  to 12 mice/group; (F)  $n = 16$  to 20 mice/group.

Figure 2.



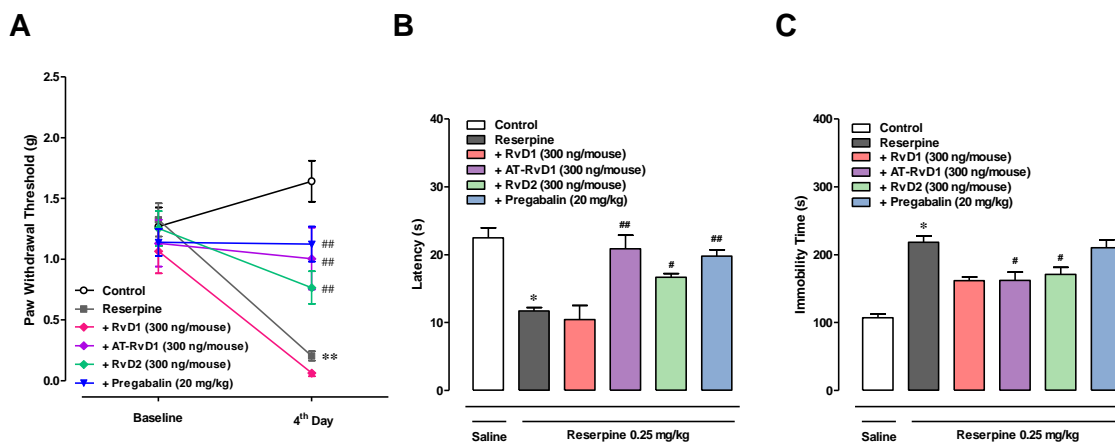
**Fig. 2.** Antinociceptive effects of  $\omega$ 3-DHA-derived lipid mediators in reserpine-treated mice. Effects of acute treatment with RvD1 (A and D), AT-RvD1 (B and E) or RvD2 (C and F) dosed by intravenous (A-C) or intrathecal (D-F) routes on latency time (s) in response to thermal stimulation. Pregabalin was used as a positive control drug. Thermal hyperalgesia was assessed in the hot-plate test, at the 4<sup>th</sup> day after onset of reserpine administration (0.25 mg/kg, s.c., once a day for three days), 30 min after administration of the mediators. Each point represents the mean and the vertical lines indicate the standard error mean (SEM). \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  compared to control saline/saline group indicating development of thermal sensitivity; # $p < 0.05$  and ## $p < 0.01$  compared to reserpine/saline group. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test. (A)  $n = 3$  to 4 mice/group; (B)  $n = 3$  to 6 mice/group; (C)  $n = 3$  mice in each group; (D)  $n = 3$  to 5 mice/group; (E)  $n = 4$  to 7 mice/group; (F)  $n = 3$  to 4 mice/group.

Figure 3.



**Fig. 3.** Effects of  $\omega$ 3-DHA-derived lipid mediators on depressive behavior in reserpine-treated animals. Effects of acute treatment with RvD1 (A and D), AT-RvD1 (B and E) or RvD2 (C and F) dosed by intravenous (A-C) or intrathecal (D-F) routes in the forced swimming test. Immobility time (s) was assessed 4<sup>th</sup> day after onset of reserpine administration (0.25 mg/kg, s.c., once a day for three days), 30 min after administration of the mediators. Each point represents the mean and the vertical lines indicate the standard error mean (SEM). \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  compared to control saline/saline group indicating development of depressive behavior. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test. (A)  $n = 9$  to 11 mice/group; (B)  $n = 9$  to 10 mice/group; (C)  $n = 9$  to 12 mice/group; (D)  $n = 5$  to 9 mice/group; (E)  $n = 4$  to 8 mice/group; (F)  $n = 7$  to 12 mice/group.

Figure 4.



**Fig. 4.** Effects of chronic treatment with different  $\omega$ 3-DHA-derived lipid mediators in the fibromyalgia-like model induced by reserpine. Effects of RvD1, AT-RvD1 or RvD2 administered intravenously during 4 days on behavioral tests in mice: (A) tactile response threshold assessed by von Frey hairs, (B) latency of thermal hyperalgesia in the hot plate test, and (C) immobility time in the forced swimming test. Behavior tests were assessed at 4<sup>th</sup> day after onset of reserpine administration (0.25 mg/kg, s.c., once a day for three days), 30 min after the last administration of the mediators. Each point represents the mean and the vertical lines indicate the standard error mean (SEM). \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  compared to control saline/saline group; # $p < 0.05$  and ## $p < 0.01$  compared to reserpine/saline group. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test. (A)  $n = 4$  to 20 mice/group; (B)  $n = 4$  to 18 mice/group; (C)  $n = 4$  to 17 mice/group.

**Table 1.** Effects of chronic intravenous administration of AT-RvD1 or RvD2 on the levels of different neurotransmitters in mouse brain and spinal cord of reserpine-treated mice

|                    | Reserpine 0,25 mg/kg (once a day for 3 days) |                     |                      |                     |
|--------------------|--|---------------------|----------------------|---------------------|
|                    | Saline                                       | Resolvin D2         | AT-Resolvin D1       | Pregabalin          |
|                    | (% of variation)                             | (% of variation)    | (% of variation)     | (% of variation)    |
| <b>Total Brain</b> |  |                     |                      |                     |
| 5-HT               | -74,5 ± (6,73)**                             | - 65,27 ± (1,56)##  | - 71,19 ± (0,52)     | -72,40 ± (2,21)     |
| Dopamine           | - 87,16 ± ( 4,49)**                          | - 86,86 ± (2,50)    | - 81,37 ± ( 0,94) #  | - 78,20 ± (6,62) ## |
| Glutamate          | - 77,63 ± (7,09)**                           | + 16,81 ± (4,67) ## | - 37,38 ± (11,59) ## | - 36,29 ± (6,47) ## |
| <b>Spinal Cord</b> |  |                     |                      |                     |
| 5-HT               | - 68,63 ± (5,93)**                           | -75,79 ± (1,80)     | - 72,72 ± (2,52)     | - 73,57 ± (2,14)    |
| Dopamine           | - 46,41 ± ( 9,23)**                          | - 58,77 ± (10,31)   | - 39,75 ± (6,83)     | - 49,88 ± (2,06)    |
| Glutamate          | + 3,84 ± (4,96)**                            | - 15,89 ± (11,24) # | - 5,81 ± (7,51)      | - 19,32 ± (5,80) #  |
| <b>Cortex</b>      |  |                     |                      |                     |
| 5-HT               | - 55,17 ± (0,90)**                           | - 50,17 ± (5,58)    | - 57,41 ± (7,56)     | - 61,20 ± (1,95)    |
| Dopamine           | - 61,47 ± (4,39)**                           | - 70,13 ± (4,61) ## | - 51,32 ± (3,78) ##  | - 65,75 ± (0,57)    |
| Glutamate          | - 11,92 ± (4,48)**                           | - 19,85 ± (3,65) #  | - 6,38 ± ( 2,57)     | - 17,50 ± (3,62)    |
| <b>Thalamus</b>    |  |                     |                      |                     |
| 5-HT               | - 67,54 ± (4,65)**                           | - 72,69 ± (3,83)    | - 35,19 ± (10,38) ## | - 69,63 ± (5,91)    |
| Dopamine           | ND   | ND                  | ND                   | ND                  |
| Glutamate          | + 38,32±(10,25)**                            | + 10,49 ± (11,33)   | + 14,30 ± (32,89)    | + 82,45 ± (20,50) # |

Data are presented as the mean ± SEM of the percentages of variation in relation to control saline treated animals (minus or plus signals indicate reduction of increase, respectively). Neurotransmitters were measured in brain and spinal cord tissues removed at 4<sup>th</sup> day after onset of reserpine administration (0.25 mg/kg, s.c., once a day for three days). ND, not detectable; \*\* $p < 0.01$  compared to control saline/saline group (considered 100%); #  $p < 0.05$  and ##  $p < 0.01$  compared to reserpine/saline group. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test. Number of animals ranged from 4 to 7/group.

## References

- Abdelmoaty, S., Wigerblad, G., Bas, D.B., Codeluppi, S., Fernandez-Zafra, T., El-Awady el, S., Moustafa, Y., Abdelhamid Ael, D., Brodin, E., Svensson, C.I., 2013. Spinal Actions of Lipoxin A4 and 17(R)-Resolvin D1 Attenuate Inflammation-Induced Mechanical Hypersensitivity and Spinal TNF Release. *PloS one* 8, e75543.
- Alonso-Blanco, C., Fernandez-de-Las-Penas, C., de-la-Llave-Rincon, A.I., Zarco-Moreno, P., Galan-Del-Rio, F., Svensson, P., 2012. Characteristics of referred muscle pain to the head from active trigger points in women with myofascial temporomandibular pain and fibromyalgia syndrome. *The journal of headache and pain* 13, 625-637.
- Bang, S., Yoo, S., Yang, T.J., Cho, H., Hwang, S.W., 2012. 17(R)-resolvin D1 specifically inhibits transient receptor potential ion channel vanilloid 3 leading to peripheral antinociception. *British journal of pharmacology* 165, 683-692.
- Bateman, L., Palmer, R.H., Trugman, J.M., Lin, Y., 2013. Results of switching to milnacipran in fibromyalgia patients with an inadequate response to duloxetine: a phase IV pilot study. *Journal of pain research* 6, 311-318.
- Bento, A.F., Claudino, R.F., Dutra, R.C., Marcon, R., Calixto, J.B., 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, 1957-1969.
- Brederson, J.D., Jarvis, M.F., Honore, P., Surowy, C.S., 2011. Fibromyalgia: mechanisms, current treatment and animal models. *Current pharmaceutical biotechnology* 12, 1613-1626.
- Busse, J.W., Ebrahim, S., Connell, G., Coomes, E.A., Bruno, P., Malik, K., Torrance, D., Ngo, T., Kirmayr, K., Avrahami, D., Riva, J.J., Struijs, P., Brunarski, D., Burnie, S.J., LeBlanc, F., Steenstra, I.A., Mahood, Q., Thorlund, K., Montori, V.M., Sivarajah, V., Alexander, P., Jankowski, M., Lesniak, W., Faulhaber, M., Bala, M.M., Schandelmaier, S., Guyatt, G.H., 2013. Systematic review and network meta-analysis of interventions for fibromyalgia: a protocol. *Systematic reviews* 2, 18.
- Carta, M., Ruggiero, V., Sancassiani, F., Cutrano, F., Manca, A., Peri, M., Fais, A., Cacace, E., 2013. The Use of Antidepressants in the Long-Term Treatment Should not Improve the Impact of Fibromyalgia on Quality of Life. *Clinical practice and epidemiology in mental health : CP & EMH* 9, 120-124.
- Ceko, M., Bushnell, M.C., Gracely, R.H., 2012. Neurobiology underlying fibromyalgia symptoms. *Pain research and treatment* 2012, 585419.
- Chaplan, S.R., Bach, F.W., Pogrel, J.W., Chung, J.M., Yaksh, T.L., 1994. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *Journal of neuroscience methods* 53, 55-63.
- de Souza, A.H., Castro, C.J., Jr., Rigo, F.K., de Oliveira, S.M., Gomez, R.S., Diniz, D.M., Borges, M.H., Cordeiro, M.N., Silva, M.A., Ferreira, J., Gomez, M.V., 2013. An evaluation of the antinociceptive effects of Phalpa1beta, a neurotoxin from the spider *Phoneutria nigriventer*, and omega-conotoxin MVIIA, a cone snail *Conus magus* toxin, in rat model of inflammatory and neuropathic pain. *Cellular and molecular neurobiology* 33, 59-67.
- de Souza, A.H., da Costa Lopes, A.M., Castro, C.J. Jr., Pereira, E.M., Klein, C.P., da Silva C.A. Jr., da Silva J.F., Ferreira, J., Gomez, M.V., 2014. The effects of Ph $\alpha$ 1 $\beta$ , a spider toxin, calcium channel blocker, in a mouse fibromyalgia model. *Toxicon* 81C, 37-42.
- Desantana, J.M., da Cruz, K.M., Sluka, K.A., 2013. Animal models of fibromyalgia. *Arthritis research & therapy* 15, 222.
- Dixon, W.J., 1980. Efficient analysis of experimental observations. *Annual review of pharmacology and toxicology* 20, 441-462.
- Feng, B., La, J.H., Schwartz, E.S., Gebhart, G.F., 2012. Irritable bowel syndrome: methods, mechanisms, and pathophysiology. *Neural and neuro-immune mechanisms of visceral hypersensitivity in irritable bowel syndrome. American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 302, G1085-1098.
- Gonzalez, R.R., Fernandez, R.F., Vidal, J.L., Frenich, A.G., Perez, M.L., 2011. Development and validation of an ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass-spectrometry



- (UHPLC-MS/MS) method for the simultaneous determination of neurotransmitters in rat brain samples. *Journal of neuroscience methods* 198, 187-194.
- Gracely, R.H., Petzke, F., Wolf, J.M., Clauw, D.J., 2002. Functional magnetic resonance imaging evidence of augmented pain processing in fibromyalgia. *Arthritis and rheumatism* 46, 1333-1343.
- Harris, R.E., 2010. Elevated excitatory neurotransmitter levels in the fibromyalgia brain. *Arthritis research & therapy* 12, 141.
- Huang, L., Wang, C.F., Serhan, C.N., Strichartz, G., 2011. Enduring prevention and transient reduction of postoperative pain by intrathecal resolvin D1. *Pain* 152, 557-565.
- Hunskar, S., Berge, O.G., Hole, K., 1986. A modified hot-plate test sensitive to mild analgesics. *Behavioural brain research* 21, 101-108.
- Jensen, K.B., Loitole, R., Kosek, E., Petzke, F., Carville, S., Fransson, P., Marcus, H., Williams, S.C., Choy, E., Mainguy, Y., Vitton, O., Gracely, R.H., Gollub, R., Ingvar, M., Kong, J., 2012. Patients with fibromyalgia display less functional connectivity in the brain's pain inhibitory network. *Molecular pain* 8, 32.
- Ji, R.R., Xu, Z.Z., Strichartz, G., Serhan, C.N., 2011. Emerging roles of resolvins in the resolution of inflammation and pain. *Trends in neurosciences* 34, 599-609.
- Jiang, L.H., Liang, Q.Y., Shi, Y., 2012. Pure docosahexaenoic acid can improve depression behaviors and affect HPA axis in mice. *European review for medical and pharmacological sciences* 16, 1765-1773.
- Kadetoff, D., Lampa, J., Westman, M., Andersson, M., Kosek, E., 2012. Evidence of central inflammation in fibromyalgia-increased cerebrospinal fluid interleukin-8 levels. *Journal of neuroimmunology* 242, 33-38.
- Karaiskos, D., Pappa, D., Tzavellas, E., Siarkos, K., Katirtzoglou, E., Papadimitriou, G.N., Politis, A., 2013. Pregabalin augmentation of antidepressants in older patients with comorbid depression and generalized anxiety disorder-an open-label study. *International journal of geriatric psychiatry* 28, 100-105.
- Kim, S.C., Landon, J.E., Solomon, D.H., 2013. Clinical characteristics and medication uses among fibromyalgia patients newly prescribed amitriptyline, duloxetine, gabapentin or pregabalin. *Arthritis care & research*.
- Le Bars, D., Gozariu, M., Cadden, S.W., 2001. Animal models of nociception. *Pharmacological reviews* 53, 597-652.
- Lima-Garcia, J.F., Dutra, R.C., da Silva, K., Motta, E.M., Campos, M.M., Calixto, J.B., 2011. The precursor of resolvin D series and aspirin-triggered resolvin D1 display anti-hyperalgesic properties in adjuvant-induced arthritis in rats. *British journal of pharmacology* 164, 278-293.
- Maciel, I.S., Silva, R.B., Morrone, F.B., Calixto, J.B., Campos, M.M., 2013. Synergistic effects of celecoxib and bupropion in a model of chronic inflammation-related depression in mice. *PloS one* 8, e77227.
- Malemud, C.J., 2009. Focus on pain mechanisms and pharmacotherapy in the treatment of fibromyalgia syndrome. *Clinical and experimental rheumatology* 27, S86-91.
- Marcus, D.A., Bernstein, C.D., Haq, A., Breuer, P., 2013. Including a Range of Outcome Targets Offers a Broader View of Fibromyalgia Treatment Outcome: Results from a Retrospective Review of Multidisciplinary Treatment. *Musculoskeletal care*.
- Mease, P.J., Dundon, K., Sarzi-Puttini, P., 2011. Pharmacotherapy of fibromyalgia. *Best practice & research. Clinical rheumatology* 25, 285-297.
- Nagakura, Y., Oe, T., Aoki, T., Matsuoka, N., 2009. Biogenic amine depletion causes chronic muscular pain and tactile allodynia accompanied by depression: A putative animal model of fibromyalgia. *Pain* 146, 26-33.
- Nickel, J.C., Tripp, D.A., Pontari, M., Moldwin, R., Mayer, R., Carr, L.K., Doggweiler, R., Yang, C.C., Mishra, N., Nordling, J., 2010. Interstitial cystitis/painful bladder syndrome and associated medical conditions with an emphasis on irritable bowel syndrome, fibromyalgia and chronic fatigue syndrome. *The Journal of urology* 184, 1358-1363.

- Ogino, S., Nagakura, Y., Tsukamoto, M., Watabiki, T., Ozawa, T., Oe, T., Shimizu, Y., Ito, H., 2013. Systemic administration of 5-HT<sub>2C</sub> receptor agonists attenuates muscular hyperalgesia in reserpine-induced myalgia model. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 108, 8-15.
- Park, C.K., Xu, Z.Z., Liu, T., Lu, N., Serhan, C.N., Ji, R.R., 2011. Resolvin D2 is a potent endogenous inhibitor for transient receptor potential subtype V1/A1, inflammatory pain, and spinal cord synaptic plasticity in mice: distinct roles of resolvin D1, D2, and E1. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31, 18433-18438.
- Petersel, D.L., Dror, V., Cheung, R., 2011. Central amplification and fibromyalgia: disorder of pain processing. *Journal of neuroscience research* 89, 29-34.
- 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 gastroenterology* 12, 148.
- Quintao, N.L., Passos, G.F., Medeiros, R., Paszcuk, A.F., Motta, F.L., Pesquero, J.B., Campos, M.M., Calixto, J.B., 2008. Neuropathic pain-like behavior after brachial plexus avulsion in mice: the relevance of kinin B1 and B2 receptors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28, 2856-2863.
- Roth, T., Arnold, L.M., Garcia-Borreguero, D., Resnick, M., Clair, A.G., 2013. A review of the effects of pregabalin on sleep disturbance across multiple clinical conditions. *Sleep medicine reviews*.
- Schmidt-Wilcke, T., Clauw, D.J., 2011. Fibromyalgia: from pathophysiology to therapy. *Nature reviews. Rheumatology* 7, 518-527.
- Serhan, C.N., Chiang, N., 2013. Resolution phase lipid mediators of inflammation: agonists of resolution. *Current opinion in pharmacology* 13, 632-640.
- Sisignano, M., Bennett, D.L., Geisslinger, G., Scholich, K., 2013. TRP-channels as key integrators of lipid pathways in nociceptive neurons. *Progress in lipid research* 53C, 93-107.
- Smith, H.S., Harris, R., Clauw, D., 2011. Fibromyalgia: an afferent processing disorder leading to a complex pain generalized syndrome. *Pain physician* 14, E217-245.
- Smith, M.T., Moore, B.J., 2012. Pregabalin for the treatment of fibromyalgia. *Expert opinion on pharmacotherapy* 13, 1527-1533.
- Sommer, C., Birklein, F., 2010. Fighting off pain with resolvins. *Nature medicine* 16, 518-520.
- Staud, R., 2012. Peripheral and central mechanisms of fatigue in inflammatory and noninflammatory rheumatic diseases. *Current rheumatology reports* 14, 539-548.
- Uceyler, N., Hauser, W., Sommer, C., 2011. Systematic review with meta-analysis: cytokines in fibromyalgia syndrome. *BMC musculoskeletal disorders* 12, 245.
- Uceyler, N., Valenza, R., Stock, M., Schedel, R., Sprotte, G., Sommer, C., 2006. Reduced levels of antiinflammatory cytokines in patients with chronic widespread pain. *Arthritis and rheumatism* 54, 2656-2664.
- Valente, M.M., Bortolotto, V., Cuccurazzu, B., Ubezio, F., Meneghini, V., Francese, M.T., Canonico, P.L., Grilli, M., 2012. alpha2delta ligands act as positive modulators of adult hippocampal neurogenesis and prevent depression-like behavior induced by chronic restraint stress. *Molecular pharmacology* 82, 271-280.
- Wallin, J., Cui, J.G., Yakhnitsa, V., Schechtmann, G., Meyerson, B.A., Linderth, B., 2002. Gabapentin and pregabalin suppress tactile allodynia and potentiate spinal cord stimulation in a model of neuropathy. *Eur J Pain* 6, 261-272.
- Wolfe, F., Clauw, D.J., Fitzcharles, M.A., Goldenberg, D.L., Katz, R.S., Mease, P., Russell, A.S., Russell, I.J., Winfield, J.B., Yunus, M.B., 2010. The American College of Rheumatology preliminary diagnostic criteria for fibromyalgia and measurement of symptom severity. *Arthritis care & research* 62, 600-610.
- Xu, M.X., Tan, B.C., Zhou, W., Wei, T., Lai, W.H., Tan, J.W., Dong, J.H., 2013. Resolvin D1, an endogenous lipid mediator for inactivation of inflammation-related signaling pathways in

- microglial cells, prevents lipopolysaccharide-induced inflammatory responses. *CNS neuroscience & therapeutics* 19, 235-243.
- Xu, Z.Z., Zhang, L., Liu, T., Park, J.Y., Berta, T., Yang, R., Serhan, C.N., Ji, R.R., 2010. Resolvins RvE1 and RvD1 attenuate inflammatory pain via central and peripheral actions. *Nature medicine* 16, 592-597, 591p following 597.

## Supplementary Material and Methods

### *Open field test*

The mice were evaluated in the open field test at 4<sup>th</sup> day after the onset of treatments. The experiments were conducted as originally described by (Holland and Weldon, 1968). Mice were individually placed in the center of an acrylic box (40 x 60 x 50 cm), with the floor divided into 12 squares, in a sound-attenuated room, under low-intensity light. The number of squares crossed with the four paws was registered during a period of 5 min.

### *Tail-suspension test*

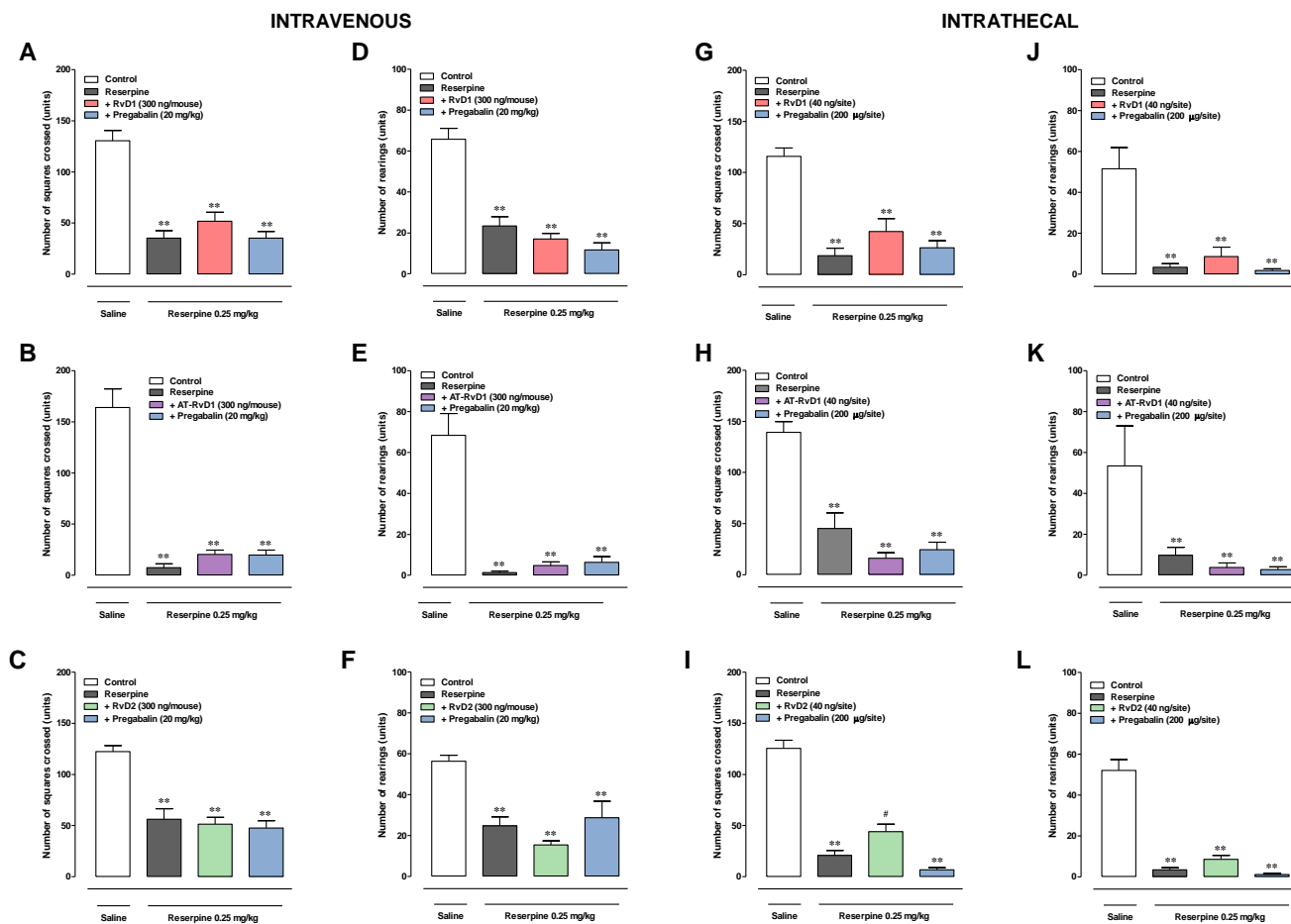
To assess the depression-like behavior, we employed the tail suspension test, as originally described by (Steru et al., 1985), additionally to the forced swimming test. The animals were suspended 50 cm above the floor by means of an adhesive tape, which was placed approximately 1 cm from the tip of the tail. The time during which mice remained immobile was quantified and expressed over a period of 6 min (in s).

### *Immunohistochemistry*

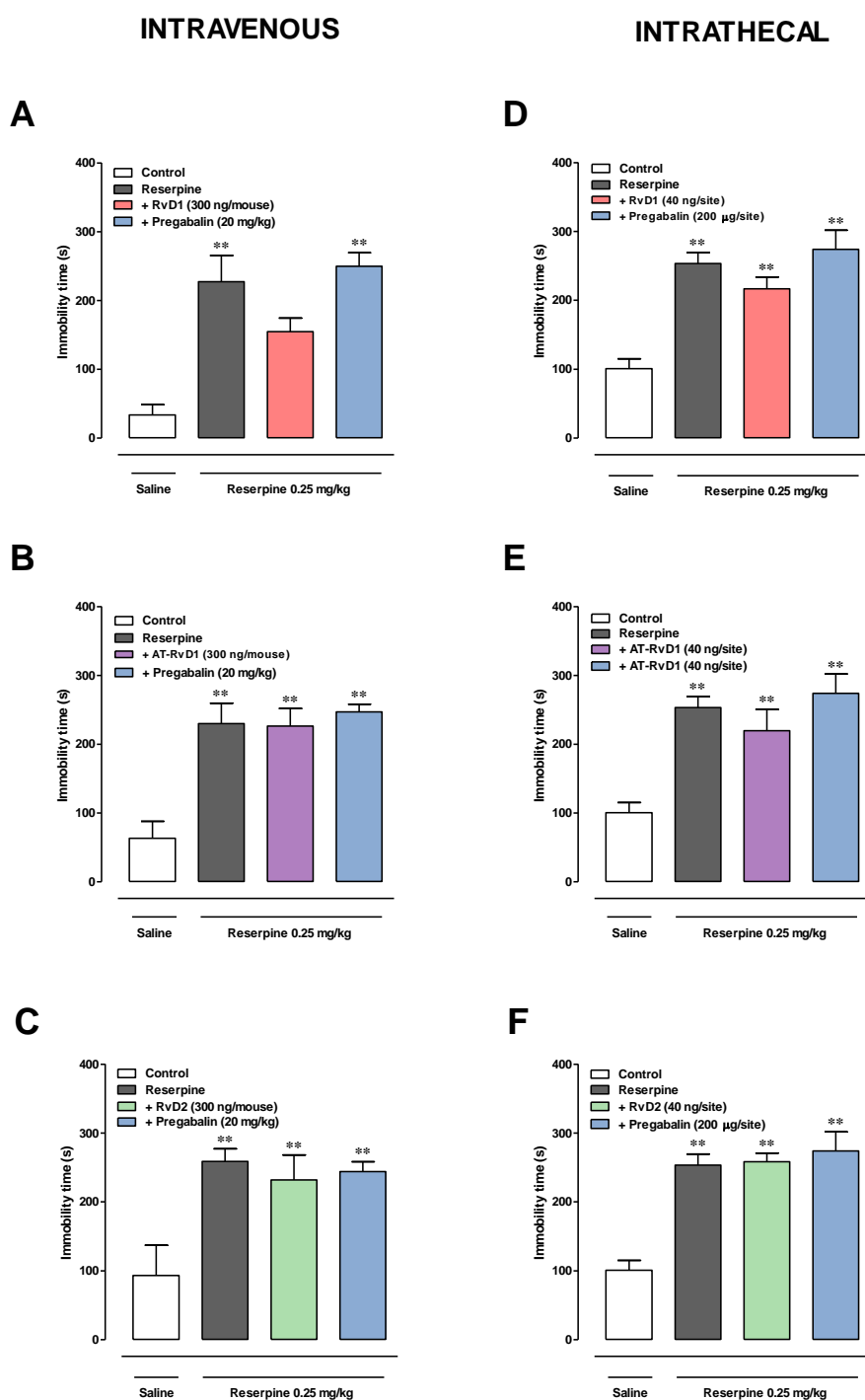
Spinal cord samples were harvested at the 4<sup>th</sup> day following behavioral tests and fixed in buffered neutral formalin. Sections of 4  $\mu$ m were mounted onto gelatine-coated slides. Rabbit polyclonal antibody raised against c-Fos (1:700, Abcam) was diluted in Tris-buffered saline containing 0.3% Triton X-100, 2% donkey serum and 1% BSA, and the sections were incubated overnight at room temperature, before being incubated for 2 h with biotinylated donkey anti-rabbit antibody (1:1000; Amersham Pharmacia Biotech Europe, Freiburg, Germany), for 2 h with avidin-biotin peroxidase complex (1:1000; Vectastain ABC kit, Vector laboratories, Burlingame, CA, USA), and finally revealed with diaminobenzidine via the nickel-enhanced glucose-oxidase method. The procedure also

included negative controls with omission of the primary antibody, which did not show any immunoreactions. The images were captured by a digital camera (CoolSNAP™ Media Cybernetics, Inc.) connected to an optical microscope (Zeiss Axioskop DS-5 M-L1, Nikon, NY, USA), at 200-x magnification, and analyzed through the Image NIH Image J 1.36b Software. The number of c-Fos positive cells was quantified and expressed as percentage of positive cells per field. For this series of experiments, we have used 4 to 7 animals per group.

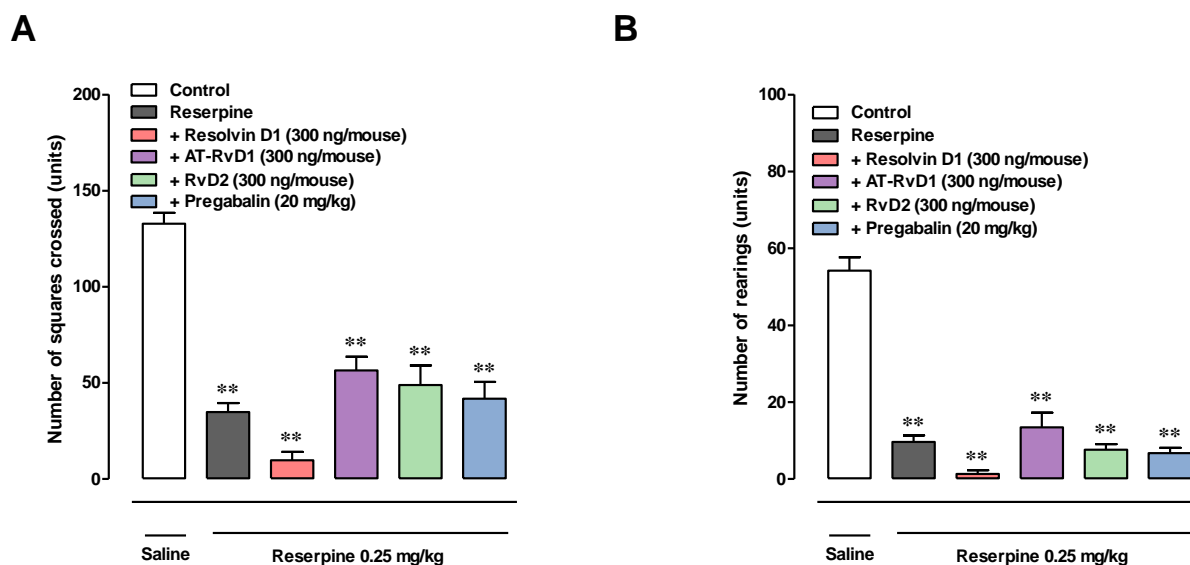
## Figures for Supplementary Material



**Suppl. 1.** Effects of  $\omega$ 3-DHA-derived lipid mediators on the locomotor activity in the fibromyalgia-like model induced by reserpine in mice. Effects of acute treatment with RvD1 (A and D), AT-RvD1 (B and E) or RvD2 (C and F) dosed by intravenous (A-C) or intrathecal (D-F) routes in the open field test. Pregabalin was used as a positive control drug. Spontaneous locomotor activity was assessed at the 4<sup>th</sup> day after onset of reserpine administration (0.25 mg/kg, s.c., once a day for three days). Each point represents the mean and the vertical lines indicate the standard error mean (SEM). \*\* $p < 0.01$  compared to control saline/saline group; # $p < 0.05$  compared to saline/reserpine group. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test. (A)  $n = 6$  to 7 mice/group; (B)  $n = 4$  to 5 mice/group; (C)  $n = 7$  to 10 mice/group; (D)  $n = 6$  to 7 mice/group; (E)  $n = 4$  to 5 mice/group; (F)  $n = 7$  to 10 mice/group; (G)  $n = 4$  to 6 mice/group; (H)  $n = 4$  mice in each group; (I)  $n = 9$  to 13 mice/group; (J) 4 to 6 mice/group; (K)  $n = 4$  mice in each group; (L)  $n = 9$  to 13 mice/group.

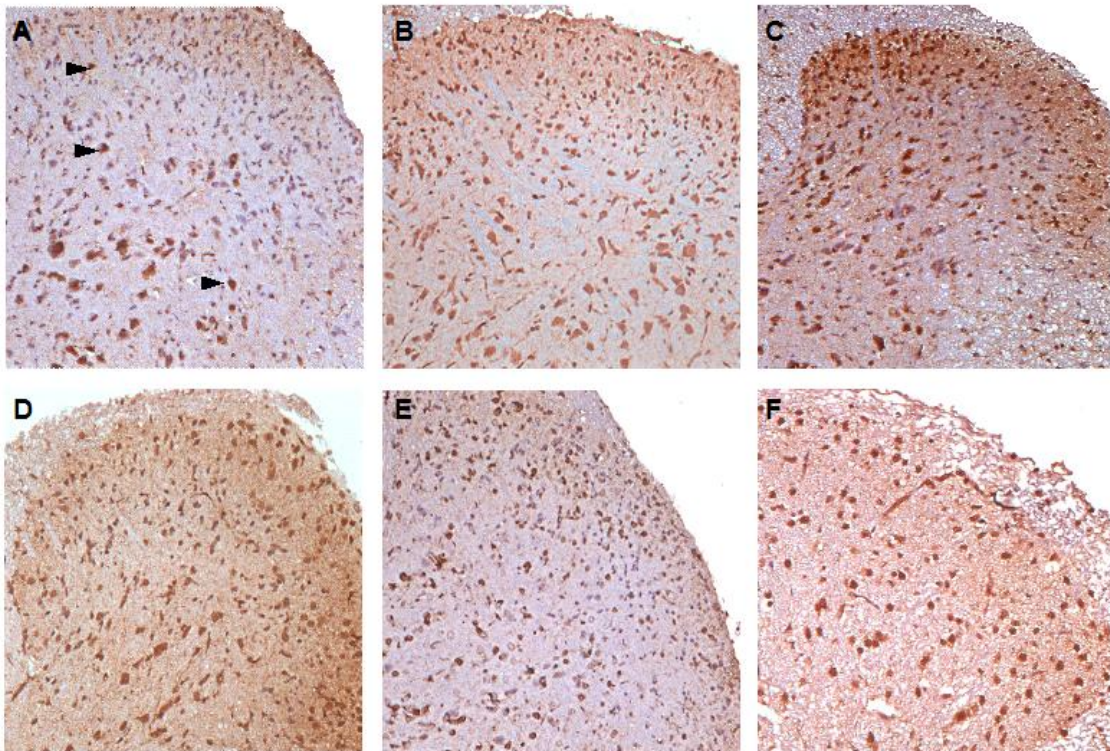


**Suppl. 2.** Effects of  $\omega$ 3-DHA-derived lipid mediators on depressive behavior in the fibromyalgia-like model induced by reserpine in mice. Effects of acute treatment with RvD1 (A and D), AT-RvD1 (B and E) or RvD2 (C and F) dosed by intravenous (A-C) or intrathecal (D-F) routes in the tail suspension test. Immobility time (s) was assessed at the 4<sup>th</sup> day after onset of reserpine administration (0.25 mg/kg, s.c., once a day for three days), 30 min after the administration of mediators. Each point represents the mean and the vertical lines indicate the standard error mean (SEM).  $**p < 0.01$  compared to control saline/saline group; Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test. (A)  $n = 4$  mice in each group; (B)  $n = 4$  to 5 mice/group; (C)  $n = 5$  to 6 mice/group; (D)  $n = 4$  to 5 mice/group; (E)  $n = 4$  mice in each group; (F)  $n = 4$  mice in each group.



**Suppl. 3.** Effects of chronic treatment with  $\omega$ 3-DHA-derived lipid mediators on the locomotor activity in the fibromyalgia-like model induced by reserpine in mice. Effects of RvD1, AT-RvD1 or RvD2 administered intravenously during 4 days on: (A) crossing and (B) rearing in the open field test. Behavior tests were assessed at 4<sup>th</sup> day after onset of reserpine administration (0.25 mg/kg, s.c., once a day for three days), 30 min after the last administration of the mediators. Each point represents the mean and the vertical lines indicate the standard error mean (SEM). \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  compared to control saline/saline group. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA. (A)  $n = 4$  to 19 mice/group; (B)  $n = 4$  to 19 mice/group.





**Suppl. 4.** Representative images of immunohistochemistry analysis for c-Fos: effects of chronic intravenous administration of  $\omega$ 3-DHA-derived lipid mediators on expression of c-Fos marker in spinal cord of reserpine-treated mice. Representative images (panel A to F). (A) Control group; (B) reserpine + saline group; (C) reserpine-mice treated with RvD1; (D) reserpine-mice treated with AT-RvD1; (E) reserpine-mice treated with RvD2; (F) reserpine-mice treated with pregabalin.

### Table for Supplementary Material

**Suppl. Table 1.** Effects of chronic intravenous administration of  $\omega$ 3-DHA-derived lipid mediators on expression of c-Fos in spinal cord of reserpine-treated mice.

|                     | Reserpine 0,25 mg/kg (once a day for 3 days) |                  |                  |                  |                 |                  |
|---------------------|--|------------------|------------------|------------------|-----------------|------------------|
|                     | Control                                      | Saline           | Resolvin D1      | AT-Resolvin D1   | Resolvin D2     | Pregabalin       |
| Mean $\pm$ SEM (%)* | 14.46 $\pm$ 2.41                             | 14.38 $\pm$ 2.53 | 11.38 $\pm$ 4.24 | 13.76 $\pm$ 1.62 | 8.55 $\pm$ 2.01 | 13.68 $\pm$ 2.28 |

Data are presented as the mean  $\pm$  SEM of the percentages of positive c-Fos immunolabeled cells per total area. C-Fos expression was measured in spinal cord tissue removed at the 4<sup>th</sup> day after the onset of reserpine administration (0.25 mg/kg, s.c., once a day for three days). Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test, although no significant difference was observed. Number of animals ranged from 4 to 7/group.

### **Supplementary References**

- Holland, H.C., Weldon, E., 1968. A note on a new technique of recording ambulation in the open field test and its validation. *Acta psychologica* 28, 293-300.
- Steru, L., Chermat, R., Thierry, B., Simon, P., 1985. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology* 85, 367-370.

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Por muitos anos a apresentação clínica da fibromialgia como uma verdadeira patologia foi desacreditada (225). No entanto, com a evolução e a crescente busca pela descoberta de novos tratamentos e mecanismos fisiopatológicos pela academia (44, 73, 226-230), a visão sobre a fibromialgia como uma verdadeira entidade patológica clínica tem colocado abaixo antigas concepções (231), embora ainda existam aqueles que não acreditam (225).

A fibromialgia foi primeriramente descrita em 1904 e denominada fibrosite (232); esse termo abrangia o conceito de doença reumática muscular inflamatória. Em função de não terem sido encontradas anormalidades no tecido musculoesquelético nem indícios de inflamação tecidual e, ainda, de ter sido notada uma alta frequência de outras síndromes somáticas funcionais nos pacientes com fibrosite (233), tal conceito foi trocado para fibromialgia, cujo termo refere dor musculoesquelética sem tentar definir nenhum mecanismo fisiopatológico (38).

Acompanhando as crescentes contribuições da pesquisa para esclarecer os mecanismos subjacentes à fibromialgia e, visto que a presença de sintomas como fadiga, distúrbios cognitivos e do sono estavam intimamente associados à presença do sintoma de dor crônica generalizada, em 2010 o Colégio Americano de Reumatologia (ACR) estabeleceu novo critério diagnóstico para fibromialgia (22). Esse critério eliminou os *tender points*, e passou a considerar uma escala de sintomas além de levar em conta a dor reportada pelo próprio paciente e, dessa forma, abrangendo aqueles pacientes com fibromialgia que não eram abrangidos pelo antigo critério (22).

Embora o entendimento da fisiopatologia da fibromialgia tenha progredido se sabe pouquíssimo sobre suas bases etiológicas. Visto a diversidade de sintomas associados à fibromialgia e a presença concomitante de outras síndromes diz-se que a fibromialgia é uma doença multifatorial e de perfil heterogêneo (234, 235) e, portanto, a disponibilidade de um tratamento efetivo representa uma lacuna na clínica. Os medicamentos atualmente disponíveis são escassos e contemplam apenas alguns dos sintomas e, mesmo assim, nem todos os pacientes respondem tão bem ao tratamento (225, 236-239).

Tendo em vista as limitações de conhecimento sobre a causa e tratamento da fibromialgia, é de grande importância que grupos e estudos continuem pesquisando

mecanismos e potencial terapêutico de substâncias para o tratamento dessa doença. Intimamente relacionado, modelos experimentais que mimetizam a doença são igualmente importantes para desvendar os mecanismos fisiopatológicos bem como investigar a eficácia de diferentes tratamentos (240). Visando contribuir para essa área, nosso grupo de pesquisa adaptou o modelo de fibromialgia em ratos induzido por reserpina descrito por Nagakura e col. (2009) a um modelo de fibromialgia em camundongos (*Swiss*) (241).

Primeiramente, procuramos estabelecer a melhor dose de reserpina capaz de induzir mudanças comportamentais similares aos sintomas apresentados por pacientes com fibromialgia, sem comprometer a capacidade motora dos animais. A dose de 0,25 mg/Kg de reserpina foi escolhida entre as doses testadas (0,125 mg/Kg, 0,25 mg/Kg, 0,5 mg/Kg e 1 mg/Kg), com um regime de aplicação em 3 dias consecutivos sob via subcutânea.

No quarto dia após a injeção de reserpina, foram realizados testes comportamentais e após a realização destes, foram obtidos tecidos cerebrais e de medula espinhal para análises bioquímicas. Através da avaliação da alodínia mecânica, utilizando os filamentos Von Frey pelo método *up and down*, os animais tratados com reserpina mostraram um comportamento nociceptivo caracterizado pela diminuição do limiar de resposta ao estímulo utilizado quando comparado ao controle. O efeito da reserpina sobre o teste da placa quente foi similar, onde houve diminuição do limiar de resposta. Quando submetidos ao teste de campo aberto, os animais tiveram sua atividade locomotora e de exploração bastante reduzidos em relação ao controle. Por último, no teste do nado forçado o tempo de imobilidade dos animais aumentou significativamente em relação ao controle, demonstrando que a reserpina induziu um comportamento depressivo. Com bases nos dados apresentados, podemos concluir que a indução do modelo de fibromialgia com reserpina contemplou os principais sintomas associados à doença, como nocicepção e depressão.

Evidências têm direcionado as atenções à ideia de que a origem da fibromialgia pode estar relacionada a uma amplificação central da percepção da dor, especialmente relacionada a alterações do sistema neuroquímico do sistema nervoso central (234). Interessantemente, a escolha do uso de reserpina se baseou nas suas ações farmacológicas de depletar mediadores neuroquímicos como as aminas biogênicas (serotonina, dopamina e noradrenalina) e de, conseqüentemente, induzir o sintoma de depressão, que é altamente prevalente em pacientes fibromiálgicos (241). No presente estudo, os neurotransmissores serotonina, dopamina e glutamato foram mensurados no cérebro e foram reduzidos pela

injeção de reserpina no cérebro dos animais; na medula espinhal os níveis de serotonina e dopamina também foram diminuídos, enquanto que os níveis de glutamato aumentaram. Com base nesses dados, podemos concluir que o mecanismo relacionado aos mediadores neuroquímicos contribui para a causa da fibromialgia nesse modelo animal.

Com este estudo procuramos também investigar a excitabilidade da célula nervosa na medula espinhal dos camundongos através da análise imunohistoquímica utilizando a proteína c-Fos como marcador da atividade neuronal. Nenhuma diferença foi observada entre os animais que receberam reserpina e os animais controle. Portanto, até aqui podemos sugerir que o comportamento do tipo fibromialgia nesse modelo é causado pela modificação nos níveis dos neurotransmissores.

Adicionalmente e paralelamente ao estudo apresentado, com o objetivo de contribuir para a investigação de novas terapias para o tratamento da fibromialgia, tratamos os animais que receberam reserpina com mediadores lipídicos derivados de ômega-3 que apresentam atividades pró-resolução da inflamação e analgésica, como já descritas por outros autores (220, 221), e utilizamos a pregabalina (droga aprovada pelo FDA para o tratamento da fibromialgia) como controle para o tratamento.

A atividade dos mediadores RvD1, AT-RvD1 e RvD2 foi investigada por meio de duas rotas e dois regimes de tratamento: endovenosa (e.v) ou intratecal (i.t), tratados de forma aguda ou sub-crônica. Os mediadores que apresentaram efeitos mais pronunciados de reversão dos comportamentos causados pela injeção de reserpina foram: 1) RvD2 no regimes agudo (300 ng/animal via e.v ou 40 ng/5 µl i.t; ) foi capaz de inibir o comportamento nociceptivo, embora sem efeito sobre o comportamento depressivo, e no regime crônico (300 ng/animal via e.v, por 4 dias) foi capaz de reverter o quadro nociceptivo e depressivo dos animais; 2) AT-RvD1 no regimes agudo (300 ng/animal via e.v ou 40 ng/5 µl i.t) não foi capaz de inibir o comportamento nociceptivo ou depressivo, enquanto uma maior dose via i.t (80 ng/5 µl) reverteu a hipersensibilidade no teste da placa quente, e quanto ao regime crônico (300 ng/animal via e.v, por 4 dias) foi capaz de reverter o quadro nociceptivo e depressivo dos animais. Por outro lado, qualquer regime terapêutico de administração de RvD1 não influenciou nenhum dos comportamentos causados pela injeção de reserpina, com exceção do teste do nado forçado, onde a RvD1 (300 ng/ animal, por 4 dias) reduziu o tempo de imobilidade dos animais.

A análise quantitativa dos neurotransmissores no cérebro total, córtex, tálamo e medula espinhal após o tratamento com RvD2 ou AT-RvD1 mostrou resultados mistos,

onde os valores dos níveis de neurotransmissores variaram diferentemente entre os tecidos e nos diferentes tratamentos; tais resultados levam a acreditar que os neurotransmissores estão “transitando” e atuando em diferentes regiões conforme o tratamento empregado.

Em resumo, podemos concluir que o modelo experimental de indução de fibromialgia pode contribuir para esclarecimentos futuros dos mecanismos fisiopatológicos da fibromialgia, bem como os tratamentos com RvD2 ou AT-RvD1 foram capazes de modular alterações comportamentais e neuroquímicas nesse modelo.

Por fim, em função de que o tratamento clínico atual mais indicado para os pacientes com fibromialgia é a terapia multimodal, associando abordagens farmacológicas e não farmacológicas (38) e, que inflamação tem papel como mediador da dor (242), vale como perspectiva para novas investigações submeter os animais ao exercício físico e investigar se existe neuroinflamação tentando estabelecer o papel da micróglia nesse modelo animal.

## REFERÊNCIAS

1. White KP, Harth M. Classification, epidemiology, and natural history of fibromyalgia. *Curr Pain Headache Rep.* 2001;5(4):320-9.
2. Ceko M, Bushnell MC, Gracely RH. Neurobiology underlying fibromyalgia symptoms. *Pain research and treatment.* 2012;2012:585419.
3. Wolfe F, Smythe HA, Yunus MB, Bennett RM, Bombardier C, Goldenberg DL, et al. The American College of Rheumatology 1990 Criteria for the Classification of Fibromyalgia. Report of the Multicenter Criteria Committee. *Arthritis Rheum.* 1990;33(2):160-72.
4. Latremoliere A, Woolf CJ. Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *J Pain.* 2009;10(9):895-926.
5. US Food and Drug Administration (17 de julho). Living with Fibromyalgia Drugs approved to manage pain 2008.
6. Rehm SE, Koroschetz J, Gockel U, Brosz M, Freynhagen R, Tolle TR, et al. A cross-sectional survey of 3035 patients with fibromyalgia: subgroups of patients with typical comorbidities and sensory symptom profiles. *Rheumatology (Oxford).* 2010;49(6):1146-52.
7. Oliver JE, Silman AJ. What epidemiology has told us about risk factors and aetiopathogenesis in rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther.* 2009;11(3):223.
8. Perrot S, Vicaut E, Servant D, Ravaud P. Prevalence of fibromyalgia in France: a multi-step study research combining national screening and clinical confirmation: The DEFI study (Determination of Epidemiology of Fibromyalgia). *BMC Musculoskelet Disord.* 2011;12:224.
9. Wolfe F, Ross K, Anderson J, Russell IJ. Aspects of fibromyalgia in the general population: sex, pain threshold, and fibromyalgia symptoms. *J Rheumatol.* 1995;22(1):151-6.
10. Wolfe F, Ross K, Anderson J, Russell IJ, Hebert L. The prevalence and characteristics of fibromyalgia in the general population. *Arthritis and rheumatism.* 1995;38(1):19-28.
11. White KP, Speechley M, Harth M, Ostbye T. The London Fibromyalgia Epidemiology Study: the prevalence of fibromyalgia syndrome in London, Ontario. *J Rheumatol.* 1999;26(7):1570-6.
12. Branco JC, Bannwarth B, Failde I, Abello Carbonell J, Blotman F, Spaeth M, et al. Prevalence of fibromyalgia: a survey in five European countries. *Semin Arthritis Rheum.* 2010;39(6):448-53.
13. Assumpção A, Cavalcante AB, Capela CE, Sauer JF, Chalot SD, Pereira CA, et al. Prevalence of fibromyalgia in a low socioeconomic status population. *BMC Musculoskelet Disord.* 2009;10:64.
14. Rezende MC, Paiva ES, Helfenstein Jr M, Ranzolin A, Martinez JE, Provenza JR, et al. EpiFibro - a nationwide databank for fibromyalgia syndrome: the initial analysis of 500 women. *Revista brasileira de reumatologia.* 2013;53(5):382-7.



15. Santos AM, Burti JS, Lopes JB, Scazufca M, Marques AP, Pereira RM. Prevalence of fibromyalgia and chronic widespread pain in community-dwelling elderly subjects living in Sao Paulo, Brazil. *Maturitas*. 2010;67(3):251-5.
16. Haviland MG, Banta JE, Przekop P. Fibromyalgia: prevalence, course, and co-morbidities in hospitalized patients in the United States, 1999-2007. *Clin Exp Rheumatol*. 2011;29(6 Suppl 69):S79-87.
17. Häuser W, Schmutzer G, Glaesmer H, Brahler E. [Prevalence and predictors of pain in several body regions. Results of a representative German population survey]. *Schmerz*. 2009;23(5):461-70.
18. Lindell L, Bergman S, Petersson IF, Jacobsson LT, Herrstrom P. Prevalence of fibromyalgia and chronic widespread pain. *Scand J Prim Health Care*. 2000;18(3):149-53.
19. Gjesdal S, Bratberg E, Maeland JG. Gender differences in disability after sickness absence with musculoskeletal disorders: five-year prospective study of 37,942 women and 26,307 men. *BMC Musculoskelet Disord*. 2011;12:37.
20. Koroschetz J, Rehm SE, Gockel U, Brosz M, Freynhagen R, Tolle TR, et al. Fibromyalgia and neuropathic pain--differences and similarities. A comparison of 3057 patients with diabetic painful neuropathy and fibromyalgia. *BMC Neurol*. 2011;11:55.
21. Mataran-Penarrocha GA, Castro-Sanchez AM, Garcia GC, Moreno-Lorenzo C, Carreno TP, Zafra MD. Influence of Craniosacral Therapy on Anxiety, Depression and Quality of Life in Patients with Fibromyalgia. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2009.
22. Wolfe F, Clauw DJ, Fitzcharles MA, Goldenberg DL, Katz RS, Mease P, et al. The American College of Rheumatology preliminary diagnostic criteria for fibromyalgia and measurement of symptom severity. *Arthritis care & research*. 2010;62(5):600-10.
23. Wolfe F, Clauw DJ, Fitzcharles MA, Goldenberg DL, Hauser W, Katz RS, et al. Fibromyalgia criteria and severity scales for clinical and epidemiological studies: a modification of the ACR Preliminary Diagnostic Criteria for Fibromyalgia. *J Rheumatol*. 2011;38(6):1113-22.
24. White KP, Harth M, Speechley M, Ostbye T. Testing an instrument to screen for fibromyalgia syndrome in general population studies: the London Fibromyalgia Epidemiology Study Screening Questionnaire. *J Rheumatol*. 1999;26(4):880-4.
25. MacFarlane GJ, Croft PR, Schollum J, Silman AJ. Widespread pain: is an improved classification possible? *J Rheumatol*. 1996;23(9):1628-32.
26. Staud R, Rodriguez ME. Mechanisms of disease: pain in fibromyalgia syndrome. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2006;2(2):90-8.
27. Fietta P, Fietta P, Manganelli P. Fibromyalgia and psychiatric disorders. *Acta Biomed*. 2007;78(2):88-95.
28. Aguglia A, Salvi V, Maina G, Rossetto I, Aguglia E. Fibromyalgia syndrome and depressive symptoms: comorbidity and clinical correlates. *J Affect Disord*. 2011;128(3):262-6.
29. Aaron LA, Buchwald D. Chronic diffuse musculoskeletal pain, fibromyalgia and comorbid unexplained clinical conditions. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2003;17(4):563-74.

30. Mathieu N. [Somatic comorbidities in irritable bowel syndrome: fibromyalgia, chronic fatigue syndrome, and interstitial cystitis]. *Gastroenterol Clin Biol*. 2009;33 Suppl 1:S17-25.
31. Nickel JC, Tripp DA, Pontari M, Moldwin R, Mayer R, Carr LK, et al. Interstitial cystitis/painful bladder syndrome and associated medical conditions with an emphasis on irritable bowel syndrome, fibromyalgia and chronic fatigue syndrome. *The Journal of urology*. 2010;184(4):1358-63.
32. Feng B, La JH, Schwartz ES, Gebhart GF. Irritable bowel syndrome: methods, mechanisms, and pathophysiology. Neural and neuro-immune mechanisms of visceral hypersensitivity in irritable bowel syndrome. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2012;302(10):G1085-98.
33. Harris AM, Orav EJ, Bates DW, Barsky AJ. Somatization increases disability independent of comorbidity. *J Gen Intern Med*. 2009;24(2):155-61.
34. Smith HS, Harris R, Clauw D. Fibromyalgia: an afferent processing disorder leading to a complex pain generalized syndrome. *Pain physician*. 2011;14(2):E217-45.
35. Keller D, de Gracia M, Cladellas R. [Subtypes of patients with fibromyalgia, psychopathological characteristics and quality of life]. *Actas Esp Psiquiatr*. 2011;39(5):273-9.
36. Pagano T, Matsutani LA, Ferreira EA, Marques AP, Pereira CA. Assessment of anxiety and quality of life in fibromyalgia patients. *Sao Paulo Med J*. 2004;122(6):252-8.
37. Bradley LA. Pathophysiology of fibromyalgia. *Am J Med*. 2009;122(12 Suppl):S22-30.
38. Smith HS, Barkin RL. Fibromyalgia syndrome: a discussion of the syndrome and pharmacotherapy. *Dis Mon*. 2011;57(5):248-85.
39. Gracely RH, Petzke F, Wolf JM, Clauw DJ. Functional magnetic resonance imaging evidence of augmented pain processing in fibromyalgia. *Arthritis and rheumatism*. 2002;46(5):1333-43.
40. Ozgocmen S, Ozyurt H, Sogut S, Akyol O. Current concepts in the pathophysiology of fibromyalgia: the potential role of oxidative stress and nitric oxide. *Rheumatol Int*. 2006;26(7):585-97.
41. Mhalla A, de Andrade DC, Baudic S, Perrot S, Bouhassira D. Alteration of cortical excitability in patients with fibromyalgia. *Pain*. 2010;149(3):495-500.
42. Desmeules J, Chabert J, Rebsamen M, Rapiti E, Piguet V, Besson M, et al. Central Pain Sensitization, COMT Val158Met Polymorphism, and Emotional Factors in Fibromyalgia. *The journal of pain : official journal of the American Pain Society*. 2013.
43. Wik G, Fischer H, Finer B, Bragee B, Kristianson M, Fredrikson M. Retrosplenial cortical deactivation during painful stimulation of fibromyalgia patients. *Int J Neurosci*. 2006;116(1):1-8.
44. Jensen KB, Kosek E, Petzke F, Carville S, Fransson P, Marcus H, et al. Evidence of dysfunctional pain inhibition in Fibromyalgia reflected in rACC during provoked pain. *Pain*. 2009;144(1-2):95-100.

45. Salerno A, Thomas E, Olive P, Blotman F, Picot MC, Georgesco M. Motor cortical dysfunction disclosed by single and double magnetic stimulation in patients with fibromyalgia. *Clin Neurophysiol.* 2000;111(6):994-1001.
46. Sarchielli P, Di Filippo M, Nardi K, Calabresi P. Sensitization, glutamate, and the link between migraine and fibromyalgia. *Curr Pain Headache Rep.* 2007;11(5):343-51.
47. Sann H, Pierau FK. Efferent functions of C-fiber nociceptors. *Z Rheumatol.* 1998;57 Suppl 2:8-13.
48. Russell IJ, Orr MD, Littman B, Vipraio GA, Alboukrek D, Michalek JE, et al. Elevated cerebrospinal fluid levels of substance P in patients with the fibromyalgia syndrome. *Arthritis Rheum.* 1994;37(11):1593-601.
49. Evengard B, Nilsson CG, Lindh G, Lindquist L, Eneroth P, Fredrikson S, et al. Chronic fatigue syndrome differs from fibromyalgia. No evidence for elevated substance P levels in cerebrospinal fluid of patients with chronic fatigue syndrome. *Pain.* 1998;78(2):153-5.
50. Bradley LA, McKendree-Smith NL, Alarcon GS, Cianfrini LR. Is fibromyalgia a neurologic disease? *Curr Pain Headache Rep.* 2002;6(2):106-14.
51. Rainville P, Duncan GH, Price DD, Carrier B, Bushnell MC. Pain affect encoded in human anterior cingulate but not somatosensory cortex. *Science.* 1997;277(5328):968-71.
52. Giovengo SL, Russell IJ, Larson AA. Increased concentrations of nerve growth factor in cerebrospinal fluid of patients with fibromyalgia. *J Rheumatol.* 1999;26(7):1564-9.
53. Larson AA, Kovacs KJ. Nociceptive aspects of fibromyalgia. *Curr Pain Headache Rep.* 2001;5(4):338-46.
54. Lewin GR, Mendell LM. Nerve growth factor and nociception. *Trends Neurosci.* 1993;16(9):353-9.
55. Larson AA, Kitto KF. Mutual antagonism between nerve growth factor and substance P N-terminal activity on nociceptive activity in mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997;282(3):1345-50.
56. Nielsen LA, Henriksson KG. Pathophysiological mechanisms in chronic musculoskeletal pain (fibromyalgia): the role of central and peripheral sensitization and pain disinhibition. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2007;21(3):465-80.
57. Clauw DJ. Fibromyalgia: an overview. *Am J Med.* 2009;122(12 Suppl):S3-S13.
58. Foerster BR, Petrou M, Harris RE, Barker PB, Hoeffner EG, Clauw DJ, et al. Cerebral blood flow alterations in pain-processing regions of patients with fibromyalgia using perfusion MR imaging. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2011;32(10):1873-8.
59. Usui C, Hatta K, Doi N, Nakanishi A, Nakamura H, Nishioka K, et al. Brain perfusion in fibromyalgia patients and its differences between responders and poor responders to gabapentin. *Arthritis Res Ther.* 2010;12(2):R64.
60. Staud R, Craggs JG, Perlstein WM, Robinson ME, Price DD. Brain activity associated with slow temporal summation of C-fiber evoked pain in fibromyalgia patients and healthy controls. *Eur J Pain.* 2008;12(8):1078-89.

61. Russell IJ, Vaeroy H, Javors M, Nyberg F. Cerebrospinal fluid biogenic amine metabolites in fibromyalgia/fibrositis syndrome and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1992;35(5):550-6.
62. Wolfe F, Russell IJ, Vipraio G, Ross K, Anderson J. Serotonin levels, pain threshold, and fibromyalgia symptoms in the general population. *J Rheumatol.* 1997;24(3):555-9.
63. Yunus MB, Dailey JW, Aldag JC, Masi AT, Jobe PC. Plasma and urinary catecholamines in primary fibromyalgia: a controlled study. *J Rheumatol.* 1992;19(1):95-7.
64. Clauw DJ, Chrousos GP. Chronic pain and fatigue syndromes: overlapping clinical and neuroendocrine features and potential pathogenic mechanisms. *Neuroimmunomodulation.* 1997;4(3):134-53.
65. Kadetoff D, Lampa J, Westman M, Andersson M, Kosek E. Evidence of central inflammation in fibromyalgia-increased cerebrospinal fluid interleukin-8 levels. *Journal of neuroimmunology.* 2012;242(1-2):33-8.
66. Gur A, Karakoc M, Nas K, Remzi, Cevik, Denli A, et al. Cytokines and depression in cases with fibromyalgia. *J Rheumatol.* 2002;29(2):358-61.
67. Larson AA, Giovengo SL, Russell IJ, Michalek JE. Changes in the concentrations of amino acids in the cerebrospinal fluid that correlate with pain in patients with fibromyalgia: implications for nitric oxide pathways. *Pain.* 2000;87(2):201-11.
68. Uceyler N, Valenza R, Stock M, Schedel R, Sprotte G, Sommer C. Reduced levels of antiinflammatory cytokines in patients with chronic widespread pain. *Arthritis and rheumatism.* 2006;54(8):2656-64.
69. Watkins LR, Milligan ED, Maier SF. Glial activation: a driving force for pathological pain. *Trends Neurosci.* 2001;24(8):450-5.
70. Smith HS, Barkin RL. Fibromyalgia syndrome: a discussion of the syndrome and pharmacotherapy. *Am J Ther.* 2010;17(4):418-39.
71. Younger J, Mackey S. Fibromyalgia symptoms are reduced by low-dose naltrexone: a pilot study. *Pain Med.* 2009;10(4):663-72.
72. Burgmer M, Pogatzki-Zahn E, Gaubitz M, Wessoleck E, Heuft G, Pfliegerer B. Altered brain activity during pain processing in fibromyalgia. *Neuroimage.* 2009;44(2):502-8.
73. Diers M, Schley MT, Rance M, Yilmaz P, Lauer L, Rukwied R, et al. Differential central pain processing following repetitive intramuscular proton/prostaglandin E(2) injections in female fibromyalgia patients and healthy controls. *Eur J Pain.* 2011;15(7):716-23.
74. Smith HS, Bracken D, Smith JM. Pharmacotherapy for fibromyalgia. *Front Pharmacol.* 2011;2:17.
75. Mease PJ, Russell IJ, Kajdasz DK, Wiltse CG, Detke MJ, Wohlreich MM, et al. Long-term safety, tolerability, and efficacy of duloxetine in the treatment of fibromyalgia. *Semin Arthritis Rheum.* 2010;39(6):454-64.
76. Moore RA, Straube S, Paine J, Phillips CJ, Derry S, McQuay HJ. Fibromyalgia: Moderate and substantial pain intensity reduction predicts improvement in other outcomes and substantial quality of life gain. *Pain.* 2010;149(2):360-4.

77. Yunus MB. Primary fibromyalgia syndrome: current concepts. *Compr Ther.* 1984;10(8):21-8.
78. Marks DM, Shah MJ, Patkar AA, Masand PS, Park GY, Pae CU. Serotonin-norepinephrine reuptake inhibitors for pain control: premise and promise. *Curr Neuropharmacol.* 2009;7(4):331-6.
79. Holman AJ, Myers RR. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of pramipexole, a dopamine agonist, in patients with fibromyalgia receiving concomitant medications. *Arthritis Rheum.* 2005;52(8):2495-505.
80. Han C, Lee SJ, Lee SY, Seo HJ, Wang SM, Park MH, et al. Available therapies and current management of fibromyalgia: focusing on pharmacological agents. *Drugs Today (Barc).* 2011;47(7):539-57.
81. Choy E, Marshall D, Gabriel ZL, Mitchell SA, Gylee E, Dakin HA. A Systematic Review and Mixed Treatment Comparison of the Efficacy of Pharmacological Treatments for Fibromyalgia. *Semin Arthritis Rheum.* 2011.
82. Meves H. Arachidonic acid and ion channels: an update. *Br J Pharmacol.* 2008;155(1):4-16.
83. Gao F, Kiesewetter D, Chang L, Rapoport SI, Igarashi M. Quantifying conversion of linoleic to arachidonic and other n-6 polyunsaturated fatty acids in unanesthetized rats. *J Lipid Res.* 2010;51(10):2940-6.
84. Nicosia S, Patrono C. Eicosanoid biosynthesis and action: novel opportunities for pharmacological intervention. *Faseb J.* 1989;3(8):1941-8.
85. Bozza PT, Bakker-Abreu I, Navarro-Xavier RA, Bandeira-Melo C. Lipid body function in eicosanoid synthesis: an update. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2011;85(5):205-13.
86. Njie-Mbye YF, Kulkarni-Chitnis M, Opere CA, Barrett A, Ohia SE. Lipid peroxidation: pathophysiological and pharmacological implications in the eye. *Frontiers in physiology.* 2013;4:366.
87. Bingham CO, 3rd, Austen KF. Phospholipase A2 enzymes in eicosanoid generation. *Proc Assoc Am Physicians.* 1999;111(6):516-24.
88. Claria J, Nguyen BT, Madenci AL, Ozaki CK, Serhan CN. Diversity of lipid mediators in human adipose tissue depots. *American journal of physiology Cell physiology.* 2013;304(12):C1141-9.
89. Dalli J, Colas RA, Serhan CN. Novel n-3 immunoresolvents: structures and actions. *Scientific reports.* 2013;3:1940.
90. Serhan CN, Chiang N. Resolution phase lipid mediators of inflammation: agonists of resolution. *Current opinion in pharmacology.* 2013;13(4):632-40.
91. Ricciotti E, FitzGerald GA. Prostaglandins and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31(5):986-1000.
92. Rouzer CA, Marnett LJ. Mechanism of free radical oxygenation of polyunsaturated fatty acids by cyclooxygenases. *Chem Rev.* 2003;103(6):2239-304.
93. Chandrasekharan NV, Simmons DL. The cyclooxygenases. *Genome Biol.* 2004;5(9):241.

94. Rouzer CA, Marnett LJ. Cyclooxygenases: structural and functional insights. *J Lipid Res.* 2009;50 Suppl:S29-34.
95. Morita I, Schindler M, Regier MK, Otto JC, Hori T, DeWitt DL, et al. Different intracellular locations for prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and -2. *J Biol Chem.* 1995;270(18):10902-8.
96. Spencer AG, Woods JW, Arakawa T, Singer, II, Smith WL. Subcellular localization of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2 by immunoelectron microscopy. *J Biol Chem.* 1998;273(16):9886-93.
97. Tsai AL, Kulmacz RJ. Prostaglandin H synthase: resolved and unresolved mechanistic issues. *Arch Biochem Biophys.* 2010;493(1):103-24.
98. Schneider C, Pratt DA, Porter NA, Brash AR. Control of oxygenation in lipoxygenase and cyclooxygenase catalysis. *Chem Biol.* 2007;14(5):473-88.
99. Zou H, Yuan C, Dong L, Sidhu RS, Hong YH, Kuklev DV, et al. Human Cyclooxygenase-1 Activity and Its Responses to COX Inhibitors Are Allosterically Regulated by Non-substrate Fatty Acids. *J Lipid Res.* 2012.
100. Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev.* 1999;79(4):1193-226.
101. Smith WL. The eicosanoids and their biochemical mechanisms of action. *Biochem J.* 1989;259(2):315-24.
102. Schroder R, Xue L, Konya V, Martini L, Kampitsch N, Whistler JL, et al. PGH1, the precursor for the anti-inflammatory prostaglandins of the 1-series, is a potent activator of the pro-inflammatory receptor CRTH2/DP2. *PLoS One.* 2012;7(3):e33329.
103. Xiao Y, Gu Y, Purwaha P, Ni K, Law B, Mallik S, et al. Characterization of free radicals formed from COX-catalyzed DGLA peroxidation. *Free Radic Biol Med.* 2011;50(9):1163-70.
104. Murakami M, Naraba H, Tanioka T, Semmyo N, Nakatani Y, Kojima F, et al. Regulation of prostaglandin E2 biosynthesis by inducible membrane-associated prostaglandin E2 synthase that acts in concert with cyclooxygenase-2. *J Biol Chem.* 2000;275(42):32783-92.
105. Trebino CE, Stock JL, Gibbons CP, Naiman BM, Wachtmann TS, Umland JP, et al. Impaired inflammatory and pain responses in mice lacking an inducible prostaglandin E synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(15):9044-9.
106. Samuelsson B, Dahlen SE, Lindgren JA, Rouzer CA, Serhan CN. Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. *Science.* 1987;237(4819):1171-6.
107. Philipose S, Konya V, Sreckovic I, Marsche G, Lippe IT, Peskar BA, et al. The prostaglandin E2 receptor EP4 is expressed by human platelets and potently inhibits platelet aggregation and thrombus formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30(12):2416-23.
108. Yu H, Gallagher AM, Garfin PM, Printz MP. Prostacyclin release by rat cardiac fibroblasts: inhibition of collagen expression. *Hypertension.* 1997;30(5):1047-53.

109. Blanco-Rivero J, Aller MA, Arias J, Ferrer M, Balfagon G. Long-term portal hypertension increases the vasodilator response to acetylcholine in rat aorta: role of prostaglandin I<sub>2</sub>. *Clin Sci (Lond)*. 2009;117(10):365-74.
110. Hristovska AM, Rasmussen LE, Hansen PB, Nielsen SS, Nusing RM, Narumiya S, et al. Prostaglandin E<sub>2</sub> induces vascular relaxation by E-prostanoid 4 receptor-mediated activation of endothelial nitric oxide synthase. *Hypertension*. 2007;50(3):525-30.
111. Matsuoka T, Hirata M, Tanaka H, Takahashi Y, Murata T, Kabashima K, et al. Prostaglandin D<sub>2</sub> as a mediator of allergic asthma. *Science*. 2000;287(5460):2013-7.
112. Haynes DR, Whitehouse MW, Vernon-Roberts B. The prostaglandin E<sub>1</sub> analogue, misoprostol, regulates inflammatory cytokines and immune functions in vitro like the natural prostaglandins E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub> and E<sub>3</sub>. *Immunology*. 1992;76(2):251-7.
113. Adam O, Wolfram G, Zollner N. Effect of alpha-linolenic acid in the human diet on linoleic acid metabolism and prostaglandin biosynthesis. *J Lipid Res*. 1986;27(4):421-6.
114. Song WL, Paschos G, Fries S, Reilly MP, Yu Y, Rokach J, et al. Novel eicosapentaenoic acid-derived F<sub>3</sub>-isoprostanes as biomarkers of lipid peroxidation. *J Biol Chem*. 2009;284(35):23636-43.
115. Aoki T, Narumiya S. Prostaglandins and chronic inflammation. *Trends Pharmacol Sci*. 2012.
116. Ruegg C, Zaric J, Stupp R. Non steroidal anti-inflammatory drugs and COX-2 inhibitors as anti-cancer therapeutics: hypes, hopes and reality. *Ann Med*. 2003;35(7):476-87.
117. Brown E. Cox-2 inhibitors. *Physician Exec*. 1999;25(1):74-6.
118. Cannon CP, Cannon PJ. Physiology. COX-2 inhibitors and cardiovascular risk. *Science*. 2012;336(6087):1386-7.
119. Hawkey CJ. COX-2 inhibitors. *Lancet*. 1999;353(9149):307-14.
120. Cryer B, Feldman M. Cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 selectivity of widely used nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am J Med*. 1998;104(5):413-21.
121. Fosslie E. Biochemistry of cyclooxygenase (COX)-2 inhibitors and molecular pathology of COX-2 in neoplasia. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2000;37(5):431-502.
122. Hammarberg T, Provost P, Persson B, Radmark O. The N-terminal domain of 5-lipoxygenase binds calcium and mediates calcium stimulation of enzyme activity. *J Biol Chem*. 2000;275(49):38787-93.
123. Tang Y, Wang MT, Chen Y, Yang D, Che M, Honn KV, et al. Downregulation of vascular endothelial growth factor and induction of tumor dormancy by 15-lipoxygenase-2 in prostate cancer. *Int J Cancer*. 2009;124(7):1545-51.
124. Shureiqi I, Lippman SM. Lipoxygenase modulation to reverse carcinogenesis. *Cancer Res*. 2001;61(17):6307-12.
125. Newcomer ME, Gilbert NC. Location, location, location: compartmentalization of early events in leukotriene biosynthesis. *J Biol Chem*. 2010;285(33):25109-14.

126. Griesser M, Suzuki T, Tejera N, Mont S, Boeglin WE, Pozzi A, et al. Biosynthesis of hemiketal eicosanoids by cross-over of the 5-lipoxygenase and cyclooxygenase-2 pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(17):6945-50.
127. Funk CD. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science*. 2001;294(5548):1871-5.
128. Singh RK, Gupta S, Dastidar S, Ray A. Cysteinyl leukotrienes and their receptors: molecular and functional characteristics. *Pharmacology*. 2010;85(6):336-49.
129. Radmark O, Samuelsson B. 5-Lipoxygenase: mechanisms of regulation. *J Lipid Res*. 2009;50 Suppl:S40-5.
130. Murphy RC, Gijon MA. Biosynthesis and metabolism of leukotrienes. *Biochem J*. 2007;405(3):379-95.
131. Noguchi K, Okubo M. Leukotrienes in nociceptive pathway and neuropathic/inflammatory pain. *Biol Pharm Bull*. 2011;34(8):1163-9.
132. Okunishi K, Peters-Golden M. Leukotrienes and airway inflammation. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1810(11):1096-102.
133. Oyoshi MK, He R, Kanaoka Y, ElKhal A, Kawamoto S, Lewis CN, et al. Eosinophil-derived leukotriene C4 signals via type 2 cysteinyl leukotriene receptor to promote skin fibrosis in a mouse model of atopic dermatitis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(13):4992-7.
134. Ghosh J. Inhibition of arachidonate 5-lipoxygenase triggers prostate cancer cell death through rapid activation of c-Jun N-terminal kinase. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;307(2):342-9.
135. Calder PC. Dietary modification of inflammation with lipids. *Proc Nutr Soc*. 2002;61(3):345-58.
136. Jisaka M, Kim RB, Boeglin WE, Nanney LB, Brash AR. Molecular cloning and functional expression of a phorbol ester-inducible 8S-lipoxygenase from mouse skin. *J Biol Chem*. 1997;272(39):24410-6.
137. Muga SJ, Thuillier P, Pavone A, Rundhaug JE, Boeglin WE, Jisaka M, et al. 8S-lipoxygenase products activate peroxisome proliferator-activated receptor alpha and induce differentiation in murine keratinocytes. *Cell Growth Differ*. 2000;11(8):447-54.
138. Burger F, Krieg P, Kinzig A, Schurich B, Marks F, Furstenberger G. Constitutive expression of 8-lipoxygenase in papillomas and clastogenic effects of lipoxygenase-derived arachidonic acid metabolites in keratinocytes. *Mol Carcinog*. 1999;24(2):108-17.
139. Yamamoto S, Suzuki H, Nakamura M, Ishimura K. Arachidonate 12-lipoxygenase isozymes. *Adv Exp Med Biol*. 1999;447:37-44.
140. Yoshimoto T, Takahashi Y. Arachidonate 12-lipoxygenases. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2002;68-69:245-62.
141. Chen M, Yang ZD, Smith KM, Carter JD, Nadler JL. Activation of 12-lipoxygenase in proinflammatory cytokine-mediated beta cell toxicity. *Diabetologia*. 2005;48(3):486-95.



142. Nie D, Che M, Grignon D, Tang K, Honn KV. Role of eicosanoids in prostate cancer progression. *Cancer Metastasis Rev.* 2001;20(3-4):195-206.
143. Nie D, Krishnamoorthy S, Jin R, Tang K, Chen Y, Qiao Y, et al. Mechanisms regulating tumor angiogenesis by 12-lipoxygenase in prostate cancer cells. *J Biol Chem.* 2006;281(27):18601-9.
144. Tang DG, Honn KV. 12-Lipoxygenase, 12(S)-HETE, and cancer metastasis. *Ann N Y Acad Sci.* 1994;744:199-215.
145. Nazarewicz RR, Zenebe WJ, Parihar A, Parihar MS, Vaccaro M, Rink C, et al. 12(S)-hydroperoxyeicosatetraenoic acid (12-HETE) increases mitochondrial nitric oxide by increasing intramitochondrial calcium. *Arch Biochem Biophys.* 2007;468(1):114-20.
146. Gonzalez-Nunez D, Sole M, Natarajan R, Poch E. 12-Lipoxygenase metabolism in mouse distal convoluted tubule cells. *Kidney Int.* 2005;67(1):178-86.
147. Coffey MJ, Jarvis GE, Gibbins JM, Coles B, Barrett NE, Wylie OR, et al. Platelet 12-lipoxygenase activation via glycoprotein VI: involvement of multiple signaling pathways in agonist control of H(P)ETE synthesis. *Circ Res.* 2004;94(12):1598-605.
148. Persaud SJ, Muller D, Belin VD, Kitsou-Mylona I, Asare-Anane H, Papadimitriou A, et al. The role of arachidonic acid and its metabolites in insulin secretion from human islets of langerhans. *Diabetes.* 2007;56(1):197-203.
149. Chanez P, Bonnans C, Chavis C, Vachier I. 15-lipoxygenase: a Janus enzyme? *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2002;27(6):655-8.
150. Calder PC. Omega-3 fatty acids and inflammatory processes. *Nutrients.* 2010;2(3):355-74.
151. Vanamala J, Glagolenko A, Yang P, Carroll RJ, Murphy ME, Newman RA, et al. Dietary fish oil and pectin enhance colonocyte apoptosis in part through suppression of PPARdelta/PGE2 and elevation of PGE3. *Carcinogenesis.* 2008;29(4):790-6.
152. Bajpai AK, Blaskova E, Pakala SB, Zhao T, Glasgow WC, Penn JS, et al. 15(S)-HETE production in human retinal microvascular endothelial cells by hypoxia: Novel role for MEK1 in 15(S)-HETE induced angiogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007;48(11):4930-8.
153. Dobrian AD, Lieb DC, Cole BK, Taylor-Fishwick DA, Chakrabarti SK, Nadler JL. Functional and pathological roles of the 12- and 15-lipoxygenases. *Prog Lipid Res.* 2011;50(1):115-31.
154. Il Lee S, Zuo X, Shureiqi I. 15-Lipoxygenase-1 as a tumor suppressor gene in colon cancer: is the verdict in? *Cancer Metastasis Rev.* 2011;30(3-4):481-91.
155. Herrmann JL, Menter DG, Beham A, von Eschenbach A, McDonnell TJ. Regulation of lipid signaling pathways for cell survival and apoptosis by bcl-2 in prostate carcinoma cells. *Exp Cell Res.* 1997;234(2):442-51.
156. Kelavkar U, Glasgow W, Eling TE. The effect of 15-lipoxygenase-1 expression on cancer cells. *Curr Urol Rep.* 2002;3(3):207-14.

157. Shureiqi I, Wu Y, Chen D, Yang XL, Guan B, Morris JS, et al. The critical role of 15-lipoxygenase-1 in colorectal epithelial cell terminal differentiation and tumorigenesis. *Cancer Res.* 2005;65(24):11486-92.
158. Viita H, Pacholska A, Ahmad F, Tietavainen J, Naarala J, Hyvarinen A, et al. 15-Lipoxygenase-1 induces lipid peroxidation and apoptosis, and improves survival in rat malignant glioma. *In Vivo.* 2012;26(1):1-8.
159. Rydberg EK, Krettek A, Ullstrom C, Ekstrom K, Svensson PA, Carlsson LM, et al. Hypoxia increases LDL oxidation and expression of 15-lipoxygenase-2 in human macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24(11):2040-5.
160. Bhatia B, Maldonado CJ, Tang S, Chandra D, Klein RD, Chopra D, et al. Subcellular localization and tumor-suppressive functions of 15-lipoxygenase 2 (15-LOX2) and its splice variants. *J Biol Chem.* 2003;278(27):25091-100.
161. Gonzalez AL, Roberts RL, Massion PP, Olson SJ, Shyr Y, Shappell SB. 15-Lipoxygenase-2 expression in benign and neoplastic lung: an immunohistochemical study and correlation with tumor grade and proliferation. *Hum Pathol.* 2004;35(7):840-9.
162. Soumya SJ, Binu S, Helen A, Anil Kumar K, Reddanna P, Sudhakaran PR. Effect of 15-lipoxygenase metabolites on angiogenesis: 15(S)-HPETE is angiostatic and 15(S)-HETE is angiogenic. *Inflamm Res.* 2012;61(7):707-18.
163. Serhan CN, Hamberg M, Samuelsson B. Lipoxins: novel series of biologically active compounds formed from arachidonic acid in human leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984;81(17):5335-9.
164. Chavis C, Vachier I, Chanez P, Bousquet J, Godard P. 5(S),15(S)-dihydroxyeicosatetraenoic acid and lipoxin generation in human polymorphonuclear cells: dual specificity of 5-lipoxygenase towards endogenous and exogenous precursors. *J Exp Med.* 1996;183(4):1633-43.
165. Serhan CN, Nicolaou KC, Webber SE, Veale CA, Dahlen SE, Puustinen TJ, et al. Lipoxin A. Stereochemistry and biosynthesis. *J Biol Chem.* 1986;261(35):16340-5.
166. Romano M, Serhan CN. Lipoxin generation by permeabilized human platelets. *Biochemistry.* 1992;31(35):8269-77.
167. Serhan CN, Romano M. Lipoxin biosynthesis and actions: role of the human platelet LX-synthase. *J Lipid Mediat Cell Signal.* 1995;12(2-3):293-306.
168. Serhan CN, Yacoubian S, Yang R. Anti-inflammatory and proresolving lipid mediators. *Annu Rev Pathol.* 2008;3:279-312.
169. Maderna P, Godson C. Lipoxins: resolutionary road. *Br J Pharmacol.* 2009;158(4):947-59.
170. Ye RD, Boulay F, Wang JM, Dahlgren C, Gerard C, Parmentier M, et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIII. Nomenclature for the formyl peptide receptor (FPR) family. *Pharmacol Rev.* 2009;61(2):119-61.
171. Godson C, Mitchell S, Harvey K, Petasis NA, Hogg N, Brady HR. Cutting edge: lipoxins rapidly stimulate nonphlogistic phagocytosis of apoptotic neutrophils by monocyte-derived macrophages. *J Immunol.* 2000;164(4):1663-7.

172. Mitchell S, Thomas G, Harvey K, Cottell D, Reville K, Berlasconi G, et al. 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*. 2002;13(10):2497-507.
173. Ryan A, Godson C. Lipoxins: regulators of resolution. *Curr Opin Pharmacol*. 2010;10(2):166-72.
174. Serhan CN, Clish CB, Brannon J, Colgan SP, Chiang N, Gronert K. Novel functional sets of lipid-derived mediators with antiinflammatory actions generated from omega-3 fatty acids via cyclooxygenase 2-nonsteroidal antiinflammatory drugs and transcellular processing. *J Exp Med*. 2000;192(8):1197-204.
175. Serhan CN, Hong S, Gronert K, Colgan SP, Devchand PR, Mirick G, et al. Resolvins: a family of bioactive products of omega-3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter proinflammation signals. *The Journal of experimental medicine*. 2002;196(8):1025-37.
176. Serhan CN, Chiang N, Van Dyke TE. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(5):349-61.
177. Serhan CN. Lipoxins and aspirin-triggered 15-epi-lipoxins are the first lipid mediators of endogenous anti-inflammation and resolution. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2005;73(3-4):141-62.
178. Levy BD. Resolvins and protectins: natural pharmacophores for resolution biology. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2010;82(4-6):327-32.
179. Hong S, Gronert K, Devchand PR, Moussignac RL, Serhan CN. Novel docosatrienes and 17S-resolvins generated from docosahexaenoic acid in murine brain, human blood, and glial cells. Autacoids in anti-inflammation. *J Biol Chem*. 2003;278(17):14677-87.
180. Serhan CN. Novel chemical mediators in the resolution of inflammation: resolvins and protectins. *Anesthesiol Clin*. 2006;24(2):341-64.
181. Stables MJ, Gilroy DW. Old and new generation lipid mediators in acute inflammation and resolution. *Prog Lipid Res*. 2011;50(1):35-51.
182. Arita M, Clish CB, Serhan CN. The contributions of aspirin and microbial oxygenase to the biosynthesis of anti-inflammatory resolvins: novel oxygenase products from omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;338(1):149-57.
183. Krishnamoorthy S, Recchiuti A, Chiang N, Yacoubian S, Lee CH, Yang R, et al. Resolvin D1 binds human phagocytes with evidence for proresolving receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(4):1660-5.
184. Serhan CN. Novel omega -- 3-derived local mediators in anti-inflammation and resolution. *Pharmacol Ther*. 2005;105(1):7-21.
185. Spite M, Norling LV, Summers L, Yang R, Cooper D, Petasis NA, et al. Resolvin D2 is a potent regulator of leukocytes and controls microbial sepsis. *Nature*. 2009;461(7268):1287-91.

186. Arita M, Ohira T, Sun YP, Elangovan S, Chiang N, Serhan CN. Resolvin E1 selectively interacts with leukotriene B4 receptor BLT1 and ChemR23 to regulate inflammation. *J Immunol.* 2007;178(6):3912-7.
187. Janakiram NB, Mohammed A, Rao CV. Role of lipoxins, resolvins, and other bioactive lipids in colon and pancreatic cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2011;30(3-4):507-23.
188. Lecomte M, Laneuville O, Ji C, DeWitt DL, Smith WL. Acetylation of human prostaglandin endoperoxide synthase-2 (cyclooxygenase-2) by aspirin. *J Biol Chem.* 1994;269(18):13207-15.
189. Romano M. Lipoxin and aspirin-triggered lipoxins. *ScientificWorldJournal.* 2010;10:1048-64.
190. Claria J, Serhan CN. Aspirin triggers previously undescribed bioactive eicosanoids by human endothelial cell-leukocyte interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(21):9475-9.
191. Sala A, Folco G, Murphy RC. Transcellular biosynthesis of eicosanoids. *Pharmacol Rep.* 2010;62(3):503-10.
192. Serhan CN, Drazen JM. Antiinflammatory potential of lipoxygenase-derived eicosanoids: a molecular switch at 5 and 15 positions? *J Clin Invest.* 1997;99(6):1147-8.
193. Serhan CN. Lipoxins and novel aspirin-triggered 15-epi-lipoxins (ATL): a jungle of cell-cell interactions or a therapeutic opportunity? *Prostaglandins.* 1997;53(2):107-37.
194. Folco G, Murphy RC. Eicosanoid transcellular biosynthesis: from cell-cell interactions to in vivo tissue responses. *Pharmacol Rev.* 2006;58(3):375-88.
195. Bannenberg G, Moussignac RL, Gronert K, Devchand PR, Schmidt BA, Guilford WJ, et al. Lipoxins and novel 15-epi-lipoxin analogs display potent anti-inflammatory actions after oral administration. *Br J Pharmacol.* 2004;143(1):43-52.
196. Fierro IM, Colgan SP, Bernasconi G, Petasis NA, Clish CB, Arita M, et al. Lipoxin A4 and aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A4 inhibit human neutrophil migration: comparisons between synthetic 15 epimers in chemotaxis and transmigration with microvessel endothelial cells and epithelial cells. *J Immunol.* 2003;170(5):2688-94.
197. Jozsef L, Zouki C, Petasis NA, Serhan CN, Filep JG. Lipoxin A4 and aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A4 inhibit peroxynitrite formation, NF-kappa B and AP-1 activation, and IL-8 gene expression in human leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(20):13266-71.
198. Spector AA. Arachidonic acid cytochrome P450 epoxygenase pathway. *J Lipid Res.* 2009;50 Suppl:S52-6.
199. Stark K, Guengerich FP. Characterization of orphan human cytochromes P450. *Drug Metab Rev.* 2007;39(2-3):627-37.
200. Rittle J, Green MT. Cytochrome P450 compound I: capture, characterization, and C-H bond activation kinetics. *Science.* 2010;330(6006):933-7.
201. Danielson PB. The cytochrome P450 superfamily: biochemistry, evolution and drug metabolism in humans. *Curr Drug Metab.* 2002;3(6):561-97.

202. Wang JF, Chou KC. Molecular modeling of cytochrome P450 and drug metabolism. *Curr Drug Metab.* 2010;11(4):342-6.
203. Kroetz DL, Zeldin DC. Cytochrome P450 pathways of arachidonic acid metabolism. *Curr Opin Lipidol.* 2002;13(3):273-83.
204. Lucas D, Goullitquer S, Marienhagen J, Fer M, Dreano Y, Schwaneberg U, et al. Stereoselective epoxidation of the last double bond of polyunsaturated fatty acids by human cytochromes P450. *J Lipid Res.* 2010;51(5):1125-33.
205. Deng Y, Theken KN, Lee CR. Cytochrome P450 epoxygenases, soluble epoxide hydrolase, and the regulation of cardiovascular inflammation. *J Mol Cell Cardiol.* 2010;48(2):331-41.
206. Fang X, Kaduce TL, Weintraub NL, Harmon S, Teesch LM, Morisseau C, et al. Pathways of epoxyeicosatrienoic acid metabolism in endothelial cells. Implications for the vascular effects of soluble epoxide hydrolase inhibition. *J Biol Chem.* 2001;276(18):14867-74.
207. Fang X, Weintraub NL, Oltman CL, Stoll LL, Kaduce TL, Harmon S, et al. Human coronary endothelial cells convert 14,15-EET to a biologically active chain-shortened epoxide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002;283(6):H2306-14.
208. Hardwick JP. Cytochrome P450 omega hydroxylase (CYP4) function in fatty acid metabolism and metabolic diseases. *Biochem Pharmacol.* 2008;75(12):2263-75.
209. Arnold C, Konkel A, Fischer R, Schunck WH. Cytochrome P450-dependent metabolism of omega-6 and omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids. *Pharmacol Rep.* 2010;62(3):536-47.
210. Serhan CN. The resolution of inflammation: the devil in the flask and in the details. *FASEB J.* 2011;25(5):1441-8.
211. Quan-Xin F, Fan F, Xiang-Ying F, Shu-Jun L, Shi-Qi W, Zhao-Xu L, et al. Resolvin D1 reverses chronic pancreatitis-induced mechanical allodynia, phosphorylation of NMDA receptors, and cytokines expression in the thoracic spinal dorsal horn. *BMC gastroenterology.* 2012;12:148.
212. Terrando N, Gomez-Galan M, Yang T, Carlstrom M, Gustavsson D, Harding RE, et al. Aspirin-triggered resolvin D1 prevents surgery-induced cognitive decline. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.* 2013;27(9):3564-71.
213. Dornelles FN, Santos DS, Van Dyke TE, Calixto JB, Batista EL, Jr., Campos MM. In vivo up-regulation of kinin B1 receptors after treatment with *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide in rat paw. *J Pharmacol Exp Ther.* 2009;330(3):756-63.
214. Bellenger J, Bellenger S, Bataille A, Massey KA, Nicolaou A, Rialland M, et al. High pancreatic n-3 fatty acids prevent STZ-induced diabetes in fat-1 mice: inflammatory pathway inhibition. *Diabetes.* 2011;60(4):1090-9.
215. Eickmeier O, Seki H, Haworth O, Hilberath JN, Gao F, Uddin M, et al. Aspirin-triggered resolvin D1 reduces mucosal inflammation and promotes resolution in a murine model of acute lung injury. *Mucosal immunology.* 2013;6(2):256-66.
216. El Kebir D, Gjorstrup P, Filep JG. Resolvin E1 promotes phagocytosis-induced neutrophil apoptosis and accelerates resolution of pulmonary inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2012;109(37):14983-8.

217. Settimo R, Clara DF, Franca F, Francesca S, Michele D. Resolvin D1 reduces the immunoinflammatory response of the rat eye following uveitis. *Mediators of inflammation*. 2012;2012:318621.
218. Kim TH, Kim GD, Jin YH, Park YS, Park CS. Omega-3 fatty acid-derived mediator, Resolvin E1, ameliorates 2,4-dinitrofluorobenzene-induced atopic dermatitis in NC/Nga mice. *International immunopharmacology*. 2012;14(4):384-91.
219. Flesher RP, Herbert C, Kumar RK. Resolvin E1 promotes resolution of inflammation in a mouse model of an acute exacerbation of allergic asthma. *Clinical science*. 2013.
220. Park CK, Xu ZZ, Liu T, Lu N, Serhan CN, Ji RR. Resolvin D2 is a potent endogenous inhibitor for transient receptor potential subtype V1/A1, inflammatory pain, and spinal cord synaptic plasticity in mice: distinct roles of resolvin D1, D2, and E1. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2011;31(50):18433-8.
221. Bento AF, Claudino RF, Dutra RC, Marcon R, Calixto JB. Omega-3 fatty acid-derived mediators 17(R)-hydroxy docosaheptaenoic acid, aspirin-triggered resolvin D1 and resolvin D2 prevent experimental colitis in mice. *J Immunol*. 2011;187(4):1957-69.
222. Bang S, Yoo S, Yang TJ, Cho H, Kim YG, Hwang SW. Resolvin D1 attenuates activation of sensory transient receptor potential channels leading to multiple anti-nociception. *British journal of pharmacology*. 2010;161(3):707-20.
223. Xu MX, Tan BC, Zhou W, Wei T, Lai WH, Tan JW, et al. Resolvin D1, an endogenous lipid mediator for inactivation of inflammation-related signaling pathways in microglial cells, prevents lipopolysaccharide-induced inflammatory responses. *CNS neuroscience & therapeutics*. 2013;19(4):235-43.
224. Dartt DA, Hodges RR, Li D, Shatos MA, Lashkari K, Serhan CN. Conjunctival goblet cell secretion stimulated by leukotrienes is reduced by resolvins D1 and E1 to promote resolution of inflammation. *Journal of immunology*. 2011;186(7):4455-66.
225. Hauser W, Burgmer M, Kollner V, Schaefer R, Eich W, Hausteiner-Wiehle C, et al. [Fibromyalgia syndrome as a psychosomatic disorder - diagnosis and therapy according to current evidence-based guidelines]. *Zeitschrift fur Psychosomatische Medizin und Psychotherapie*. 2013;59(2):132-52.
226. Diers M, Yilmaz P, Rance M, Thieme K, Gracely RH, Rolko C, et al. Treatment-related changes in brain activation in patients with fibromyalgia syndrome. *Experimental brain research*. 2012;218(4):619-28.
227. Jensen KB, Loitole R, Kosek E, Petzke F, Carville S, Fransson P, et al. Patients with fibromyalgia display less functional connectivity in the brain's pain inhibitory network. *Molecular pain*. 2012;8:32.
228. Napadow V, Kim J, Clauw DJ, Harris RE. Decreased intrinsic brain connectivity is associated with reduced clinical pain in fibromyalgia. *Arthritis and rheumatism*. 2012;64(7):2398-403.
229. Guymer E, Littlejohn G. Fibromyalgia. *Australian family physician*. 2013;42(10):690-4.
230. Natelson BH. Brain dysfunction as one cause of CFS symptoms including difficulty with attention and concentration. *Frontiers in physiology*. 2013;4:109.

231. Wolfe F, Walitt B. Culture, science and the changing nature of fibromyalgia. *Nature reviews Rheumatology*. 2013;9(12):751-5.
232. Gowers WR. A Lecture on Lumbago: Its Lessons and Analogues: Delivered at the National Hospital for the Paralyzed and Epileptic. *British medical journal*. 1904;1(2246):117-21.
233. Yunus M, Masi AT, Calabro JJ, Miller KA, Feigenbaum SL. Primary fibromyalgia (fibrositis): clinical study of 50 patients with matched normal controls. *Seminars in arthritis and rheumatism*. 1981;11(1):151-71.
234. Clauw DJ, Arnold LM, McCarberg BH, FibroCollaborative. The science of fibromyalgia. *Mayo Clinic proceedings*. 2011;86(9):907-11.
235. Sarzi-Puttini P, Atzeni F, Di Franco M, Buskila D, Alciati A, Giacomelli C, et al. Dysfunctional syndromes and fibromyalgia: a 2012 critical digest. *Clinical and experimental rheumatology*. 2012;30(6 Suppl 74):143-51.
236. Bateman L, Palmer RH, Trugman JM, Lin Y. Results of switching to milnacipran in fibromyalgia patients with an inadequate response to duloxetine: a phase IV pilot study. *Journal of pain research*. 2013;6:311-8.
237. Bernstein CD, Albrecht KL, Marcus DA. Milnacipran for fibromyalgia: a useful addition to the treatment armamentarium. *Expert opinion on pharmacotherapy*. 2013;14(7):905-16.
238. Hauser W, Urrutia G, Tort S, Uceyler N, Walitt B. Serotonin and noradrenaline reuptake inhibitors (SNRIs) for fibromyalgia syndrome. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2013;1:CD010292.
239. Uceyler N, Sommer C, Walitt B, Hauser W. Anticonvulsants for fibromyalgia. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2013;10:CD010782.
240. Desantana JM, da Cruz KM, Sluka KA. Animal models of fibromyalgia. *Arthritis research & therapy*. 2013;15(6):222.
241. Nagakura Y, Oe T, Aoki T, Matsuoka N. Biogenic amine depletion causes chronic muscular pain and tactile allodynia accompanied by depression: A putative animal model of fibromyalgia. *Pain*. 2009;146(1-2):26-33.
242. Ellis A, Bennett DL. Neuroinflammation and the generation of neuropathic pain. *British journal of anaesthesia*. 2013;111(1):26-37.