

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

IZABELA GALVÃO

Mecanismos envolvidos na resposta inflamatória e
resolutiva em um modelo murino de gota: Papel de
MIF e da Anexina A1

Departamento de Bioquímica e Imunologia,

ICB-UFMG/BELO HORIZONTE/2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

Mecanismos envolvidos na resposta inflamatória e resolutiva em um modelo murino de gota: Papel de MIF e da Anexina A1

Tese apresentada ao Departamento de
Bioquímica e Imunologia do Instituto de
Ciências Biológicas da Universidade
Federal de Minas Gerais para obtenção de
título de Doutora em Imunologia.

IZABELA GALVÃO

Orientador: Prof. Dr. Mauro Martins Teixeira

Co-orientadores: Prof. Dr. Flavio Almeida Amaral

Profa. Dr^a. Lirlândia Pires Sousa

Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB-UFMG

BELO HORIZONTE/2015

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Ângela e Carlos,

Ao meu bem Gustavo

Obrigada pela paciência, pelo amor e incentivo

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr Mauro Martins Teixeira, pela oportunidade de participar do seu grupo de pesquisa, pelo aprendizado e pelo direcionamento durante o desenvolvimento desta dissertação. Por propor ideias, questionamento, diferentes pontos de vista e por tentar me ensinar a fazer ciência. Obrigada pelos bons momentos proporcionados no laboratório ao longo desses anos.

Ao meu co-orientador Dr Flávio Almeida Amaral, pela disponibilidade constante em auxiliar e sugerir ideias no desenvolvimento desse projeto. As discussões durante esse período contribuíram muito para o meu amadurecimento científico.

À minha co-orientadora Dr^a Lirlândia Pires Sousa, pela disponibilidade, por me acolher, por acreditar no meu trabalho, por ser mais que uma co-orientadora. Obrigada por tudo: pelas ideias, sugestões, colaborações, conversas e puxões de orelha. Por ser exemplo profissional e por todos os conselhos que com certeza vou levar para vida toda.

Aos professores do grupo Imunofarmacologia, em especial a Dr^a Danielle da Glória, Dr^a Vanessa Pinho, Dr Gustavo Menezes e Dr^a Fabiana Machado, que me receberam em seus laboratórios de braços abertos e me auxiliaram durante esses anos.

Aos colegas e amigos do grupo Imunofarmacologia pelo companheirismo, convivência, conversas, discussões científicas e momentos inesquecíveis em congressos e no café da lldinha. Agradeço em especial a Daiane pelo companheirismo, discussões, padronizações e por estar sempre disponível em me ajudar. A Aninha, Bráulio, Elisão, Vivi, Beca, Ana Carol, Lucas, Bruno, Ju, lara, Leandro, Baiano, Pedro Elias, Alessandra, Rayssa, Rafaela, Fatinha, Poliana, Melissa, Katia, Grazi, Thaís, Ana Luiza por tornar os dias no laboratório sempre agradáveis e divertidos. A Denise (Xu), pela amizade e companheirismo, seu jeito alto-astral animava meus dias! A Frank e a Ilma, por estarem sempre disponíveis, pelo auxílio nos experimentos, pela companhia no almoço, pelas conversas e por fazer o laboratório funcionar. Agradeço ao Celso pela paciência, pelas conversas e conselhos, por ter me ensinado tudo: a fazer a maioria das

técnicas, a fazer experimento com animais, formatar gráficos e analisar os dados, por ser amigo, companheiro e por me incentivar sempre.

Agradeço as minhas melhores amigas: Livia, Lu, Angel e Cris. Vocês foram as melhores companhias. Não há palavras que descrevem o significado que a nossa amizade tem para mim. Muito obrigada por todos os momentos, pelas risadas, conversas, conselhos, ajuda nos experimentos, colaboração, carinho, colo, enfim, vocês tornaram os meus dias melhores.

A Renata, minha amiga marida. Obrigada pelos conselhos, ajuda nos experimentos, discussões sobre PCR e Western Blot, conversas, desabafos, risadas e choros, pela paciência, carinho e amizade.

A Julipri, pela paciência, ensinamentos sobre Western, discussões científicas e sobre a vida, pela ajuda nos experimentos e por estar sempre disponível. Obrigada pelo apoio, incentivo e amizade.

Aos colegas de Bases e a Grazi da Leda pelo companheirismo e apoio. Ao programa de pós-graduação em Bioquímica e Imunologia, a CAPES, CNPq e Fapemig pelo suporte financeiro.

As amigas Bêthania, Heloisa e Juliana pelo apoio e torcida. Aos amigos da radiobiologia: Dani, Barbara, Fred e Vi pela amizade e apoio.

E principalmente a minha família, minha mãe e meu pai por serem alicerces, por ter me dado apoio, amor e incentivo. Ao Bem (Gustavo) pelo amor, carinho, paciência e compreensão. Obrigada por torcerem por mim.

RESUMO

A gota é uma doença inflamatória causada pela deposição de cristais de urato monossódico (MSU) nas articulações. O reconhecimento de cristais de MSU induz uma resposta inflamatória local, desencadeada pela ativação do inflamassoma NLRP3 e liberação de IL-1 β , o qual promove o recrutamento de neutrófilos. O Fator Inibidor da Migração de Macrófagos (MIF) é uma citocina pró-inflamatória que desempenha um papel importante na patogênese de várias doenças inflamatórias. MIF é capaz de ativar o receptor CXCR2 e induzir o recrutamento de neutrófilos. Anexina A1 (AnxA1) é uma proteína conhecida por modular a resposta inflamatória, inibindo o recrutamento e transmigração de leucócitos para o sítio inflamatório, diminuindo a produção de citocinas pró-inflamatórias e induzindo a apoptose e eferocitose de neutrófilos, eventos cruciais para resolução da inflamação. O objetivo deste trabalho foi avaliar os mecanismos envolvidos na patogênese da gota por meio do estudo de um mediador importante para recrutamento de neutrófilos (MIF), e resolutivos, através do estudo da AnxA1, em um modelo murino de gota. **Métodos e resultados:** Os experimentos foram realizados em camundongos C57/Bl6 machos, além de camundongos Balb/c selvagens e deficientes em AnxA1. A injeção de cristais de MSU na articulação tibio-femoral aumentou a expressão de MIF no tecido sinovial nas primeiras horas após desafio (ELISA) e a injeção de MIF recombinante humano (rMIF) causou um influxo de neutrófilos para cavidade articular com aumento dos níveis de IL-1 β e CXCL1. A inibição da atividade de MIF, utilizando-se o inibidor ISO-1, reduziu o recrutamento de neutrófilos, os níveis de IL-1 β e a hipernocicepção na articulação dos animais. A injeção de rMIF induziu a síntese de mRNA de IL-1 β *in vitro* e *in vivo* e a inibição da atividade de MIF diminuiu a síntese de IL-1 β induzida pela injeção de cristais de MSU (qPCR). No entanto, o bloqueio de IL-1 β não reduziu o recrutamento induzido por rMIF. Em pacientes com gota aguda, a presença de MIF no líquido sinovial se correlaciona positivamente com os níveis de IL-1 β . A avaliação do papel da AnxA1 na inflamação induzida por MSU mostrou que os níveis de AnxA1 no tecido sinovial estão diretamente associados ao infiltrado leucocitário. A inibição de AnxA1 utilizando duas estratégias diferentes, uso de um antagonista do receptor (BOC-1) e um anticorpo neutralizante, preveniu a

resolução espontânea, observada pela persistência de neutrófilos na cavidade articular no tempo de 24 horas. Animais deficientes em AnxA1 apresentaram maior recrutamento e permanência de neutrófilos na cavidade articular que os animais selvagens, embora ambos resolvam a inflamação no tempo de 36 horas. O tratamento com um peptídeo derivado da AnxA1, Ac2-26, reduziu o número de neutrófilos recrutados, o intervalo de resolução (melhora do índice de resolução) e os níveis de IL-1 β . O efeito pró-resolutivo de Ac2-26 foi associado ao aumento de apoptose de neutrófilos, sendo este evento prevenido pelo uso de um pan-inibidor de capase, zVAD-fmk. **Conclusão:** Neste modelo, MIF promoveu o recrutamento de neutrófilos e síntese de IL-1 β , dois eventos cruciais que contribuem para a patogênese da gota. Mostramos ainda que AnxA1 possui um papel anti-inflamatório e pró-resolutivo, sugerindo que o peptídeo mimético de AnxA1 possa se constituir em uma estratégia terapêutica para o tratamento da inflamação articular induzida pela deposição de cristais monossódico.

Palavras-chaves: Gota, mediadores inflamatórios, MIF, resolução da inflamação, Anexina A1.

ABSTRACT

Gout is an inflammatory disease caused by deposition of monosodium urate (MSU) crystals into the joints. The recognition of MSU crystal induces a local inflammatory response, triggers the activation of NLRP3 inflammasome and release of IL-1 β that drives the recruitment of neutrophils. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is a potent pro-inflammatory cytokine known to activate CXCR2 and to induce recruitment of neutrophils and plays an important role in the pathogenesis of numerous inflammatory diseases. Annexin A1 (AnxA1) have been shown to modulate biological events, restrains leukocyte recruitment and transmigration during inflammation and induces neutrophil apoptosis and efferocytosis, which are crucial events on resolution of inflammation process. The aim of this work was to evaluate the inflammatory and resolutive mechanisms in a murine model of gout. **Methods and results:** Experiments were performed in male C57/Bl6 and wild-type and AnxA1^{-/-} Balb/c mice. MSU crystals injection increased MIF expression in the beginning of inflammation on synovial tissue (ELISA) and recombinant MIF injection caused neutrophil influx to articular cavity and increase the levels of IL-1 β and CXCL1. The inhibition of MIF activity (ISO-1) was effective in reduction neutrophil recruitment, IL-1 β levels and hypernociception. Injection of rMIF induced IL-1 β mRNA synthesis both *in vitro* and *in vivo* and the inhibition of MIF activity decreased IL-1 β synthesis following MSU crystals injection. However, blockade of IL-1 β did not reduce the recruitment of neutrophils induced by MIF. In patients with acute gout, MIF was detectable in synovial fluid and there was a positive correlation with IL-1 β levels. The evaluation of the role of AnxA1 in the inflammation induced by MSU crystals showed that AnxA1 levels in synovial tissue are directly associated with leukocyte

infiltration. The inhibition of AnxA1 using two different strategies (BOC-1 and Anti-AnxA1) prevented the spontaneous resolution of gout as observed by persistence of neutrophils in the cavity at 24h time point. AnxA1^{-/-} mice presents higher recruitment and retention of neutrophils in the joint cavity after MSU injection comparing to wild type mice, though both resolve the inflammation at 36 hours after MSU injection. The treatment with Ac2-26 (AnxA1-active N-terminal peptide) decrease the number of neutrophils recruited, shortened resolution interval (improved resolution indices) and decreased IL-1 β levels. The proresolving effect of Ac2-26 was due to increased apoptosis of neutrophil since it was prevented by a pan-caspase inhibitor zVAD-fmk. **Conclusion:** In the model used in this study, MIF promotes neutrophil recruitment and IL-1 β synthesis, two crucial events that contribute to the pathogenesis of gout. We also show that AnxA1 has an anti-inflammatory and proresolving role in inflammation induced by MSU crystals, suggesting the Ac-2-26 an important therapeutic strategy.

Key-words: Gout, pro-inflammatory mediators, MIF, resolution of inflammation, Annexin A1.

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

µg: micrograma

µL: microlitro

Ac2-26: peptídeo derivado da porção N-terminal de anexina A1

ANOVA: análise de variância.

AnxA1: Anexina A1

AnxA1^{-/-}: Animais deficientes em anexina A1

Balb/c: linhagem de camundongos

BMDM: *Bone Marrow Derived Macrophage* – Macrófagos derivados de medula óssea

BOC: *bulky butoxyl-carbonyl* - Antagonista do receptor FPR

BSA: *Bovine Serum Albumin* – Soro Albumina Bovina

C57/BL6: linhagem de camundongos

CETEA: Comitê de Ética em Experimentação Animal

cDNA: DNA complementar

CGs: Glicocorticoides

CXCL-(): *Chemokine (CXC motif) Ligand* () – quimiocina ligante () com motivo CXC

DAMPs: *Damage associated molecular patterns* - padrões moleculares associados a dano

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Médium

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DTT: dithiothreitol

EDTA: *Ethylene Diamine Tetracetic acid* - ácido etilendiamino tetra-acético

ELISA: *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* – Imunoensaio enzimático

FPR: *receptor for formyl-Met-Leu-Phe (fMLP)* – Receptor de anexina

H₂SO₄: Ácido sulfúrico

IL-(): interleucina-()

IL1-RA: Antagonista do receptor de IL-1

LFA: *Lymphocyte function-associated antigen 1* – Integrina de adesão

LPS: Lipopolissacarídeo

KC: *Keratinocyte Chemokine*

ICAM: *Intercellular adhesion molecule*- moléculas de adesão intracelulares

ISO1: *(S,R)-3(4-hydroxyphenyl)- 4,5-dihydro-5-isoxazole acetic acid methyl ester* – Inibidor de MIF

kDa: quilo Dálton

M: molar

mg: miligrama

mg/kg: miligramas por quilograma

mg/mL: miligramas por mililitro

MCP-(): *Monocyte chemotactic protein*-() – Proteína quimiotática de monócitos

MIF: *Macrophage migration inhibitory factor* - Fator inibitório da migração de macrófagos

MIP-(): *Macrophage Inflammatory protein*-() – Proteína inflamatória de macrófagos

mL: mililitro

mm: milímetro

mM: milimolar

mRNA: RNA mensageiro

MSU: *Monosodium urate* – Urato de monossódio

NaCl: Cloreto de sódio

NaF: fluoreto de sódio

NaOH: Hidróxido de sódio

NETs: armadilhas extracelulares de neutrófilos

NFκB: Nuclear Factor kappa B (Fator nuclear kappa B)

NLRP(): Nucleotide-binding domain and Leucine-rich-Repeat-containing protein
()

nm: nanômetro

NOD: Nucleotide-binding Oligomerization Domain

PBS: Phosphate-Buffered Saline (Tampão salina fosfato)

PCR: Polymerase chain reaction- reação em cadeia de polimerase

pg/mL: Picogramas por mililitro

pH: potencial hidrogeniônico

PMSF: phenylmethylsulphonyl fluoride

PMN: Neutrófilo Polimorfonuclear

TGF-β: fator de crescimento transformante β

TLR: *Toll like receptor* – receptores do tipo Toll

TNF: Fator de necrose tumoral

RPM: rotações por minuto

rMIF: MIF recombinante

RNA: *Ribonucleic acid* – ácido ribonucleico

zVAD-fmk: *N-Benzoyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp(O-Me) fluoromethyl ketone* –
Inibidor amplo de caspase

WT – *Wild Type* – Animal Tipo Selvagem

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Via bioquímica do ácido úrico e sua homeostase	20
Figura 2. Iniciação da inflamação induzida por cristais de ácido.	25
Figura 3: Mecanismos de ativação celular induzida por cristais de MSU.	29
Figura 4: Indução e regulação de MIF durante a imunidade inata	33
Figura 5. Resolução da inflamação induzida por cristais de MSU.	36
Figura 6: Mecanismos envolvidos na resolução espontânea da inflamação induzida por cristais de MSU.	38
Figura 7: Mobilização de AnxA1 em células ativadas e seu potencial modo de ação.	42
Figura 8: Ação da AnxA1 sobre o destacamento de neutrófilos.	43
Figura 9. Foto do equipamento utilizado no teste de pressão crescente na pata de camundongo.	54
Figura 10. MIF recombinante (rMIF) induz recrutamento de neutrófilos e produção de citocinas in vivo.	63
Figura 11. MIF participa da resposta inflamatória induzida por MSU.	65
Figura 12. Efeito do tratamento com ISO-1 após o início da inflamação induzida por MSU.	67
Figura 13. MIF contribui para inflamação na gota através da síntese de IL-1β.	68
Figura 14. MIF induz o recrutamento de leucócitos independente das ações de IL-1β.	69
Figura 15. MIF e IL-1β estão fortemente correlacionados no fluido sinovial de pacientes com gota.	70
Figura 16. Expressão de AnxA1 durante a inflamação induzida por cristais de MSU.	71
Figura 17. A inibição de anexina A1 retarda a resolução natural da resposta inflamatória induzida por MSU.	73
Figura 18. Animais deficientes em AnxA1 (AnxA1^{-/-}) recrutam mais neutrófilos durante a inflamação induzida por cristais de MSU.	74
Figura 19. O pré-tratamento com peptídeo derivado de AnxA1, Ac2-26, reduz resposta inflamatória induzida por cristais de MSU.	75
Figura 20. O tratamento com Ac2-26 melhora os índices de resolução durante a resposta inflamatória induzida por MSU.	77
Figura 21. O tratamento com Ac2-26 reduz a inflamação articular promovida pela injeção de MSU	78
Figura 22. Tratamento com Ac2-26 induz resolução na gota através da apoptose de neutrófilos.	80

Sumário

1. Introdução.....	17
1.1. Gota (Aspectos gerais)	17
1.2. Epidemiologia da gota	18
1.3. Formação de ácido úrico e hiperuricemia	19
1.4. Diagnóstico e Tratamento da Gota	21
1.5. Resposta inflamatória na gota	23
1.5.1. Reconhecimento dos cristais de ácido úrico e vias de sinalização.....	25
1.6. Fator Inibitório da Migração de Macrófagos - MIF	29
1.7. Resolução da inflamação.....	33
1.8. Anexina A1	39
2. Justificativa	46
3. Objetivo Geral.....	47
3.6. Objetivos Específicos Desenvolvidos.....	47
3.6.1. Identificar a importância de MIF na inflamação articular induzida por MSU, utilizando os seguintes objetivos:	47
3.1.2. Estudar o papel de Anexina A1 na resolução da inflamação induzida por MSU, utilizando os seguintes objetivos:	47
4. Metodologia	48
4.6. Animais.....	48
4.7. Fármacos e reagentes:	48
4.8. Modelo de Gota:	48
4.8.1. Precipitação de Cristais de Ácido Úrico	48
4.8.2. Indução da gota	49
4.9. Protocolos experimentais.....	49
4.9.1. Inflamação articular induzida por injeção de MIF recombinante	49
4.9.2. Tratamentos realizados no modelo de gota:	50
4.10. Parâmetros inflamatórios avaliados:.....	51
4.10.1. Avaliação da migração de neutrófilos para a cavidade articular	51
4.10.2. Contagem total dos leucócitos	51
4.10.3. Contagem diferencial dos leucócitos.....	51
4.10.4. Processamento Tecidual para dosagem de citocinas	52
4.10.5. Avaliação de hipernocicepção - teste de pressão crescente na pata de camundongo	53

4.10.6.	Análise por <i>Western blot</i>	54
4.10.7.	qPCR – Reação da cadeia de polimerase por transcrição reversa quantitativa	55
4.10.8.	Extração de macrófagos derivados de medula óssea (BMDM) e cultura celular. 57	
4.10.9.	Cálculo dos índices de resolução	59
4.10.10.	Análise da apoptose de leucócitos	59
4.10.11.	Análise histológica	59
4.12.	Análises estatísticas.....	61
5.	Resultados.....	62
	Resultados do objetivo 1: Identificar a importância de MIF na inflamação articular:	62
5.6.	MIF induz recrutamento de neutrófilos	62
5.7.	MIF contribui para a resposta inflamatória induzida por cristais de MSU ...	63
5.8.	MIF contribui para a inflamação na gota, através da indução de produção de pró- IL-1 β	67
5.9.	O bloqueio de IL-1 β não interfere no recrutamento celular induzido por MIF 68	
5.10.	Os níveis de MIF se correlacionam com os níveis de IL-1 β no fluido sinovial humano.....	69
	Resultados do objetivo 2: Estudar o papel de Anexina A1 na resolução da inflamação em uma modelo de gota.....	71
5.11.	A inflamação articular induzida por cristais de MSU está associada com o aumento da expressão de AnxA1 no tecido sinovial	71
5.12.	A inibição de AnxA1 e o bloqueio do seu receptor previnem a resolução espontânea da inflamação induzida por cristais de MSU	72
5.13.	O pré- e pós- tratamento com peptídeo bioativo de AnxA1, Ac2-26, possui efeito anti-inflamatório e pró-resolutivo	75
5.14.	A resolução da gota induzida por Ac2-26 é dependente de caspase	79
6.	Discussão	81
7.	Conclusão.....	88
8.	Referências:	89
	ANEXO 1	99
	ANEXO 2	100
	ANEXO 3	101
	ANEXO 4	102

1. Introdução

1.1. Gota (Aspectos gerais)

A gota é uma das primeiras doenças reconhecidas na clínica. Foi primeiramente identificada por Egípcios em 2640 antes de cristo e posteriormente relatado por Hipócrates no século V antes de cristo, que observou uma relação entre a doença e o estilo de vida. Galeno foi o primeiro a descrever o tofo, depósitos de cristais de urato monossódio (MSU), seis séculos depois. O nome gota foi dado pelo monge dominicano Randolphus de Bocking que associou a doença a uma crença medieval onde o excesso de um dos quatro “humores” levava ao desequilíbrio da saúde causando dor e inflamação (Nuki and Simkin 2006). Ao longo da história, a gota tem sido associada com a ingestão de comidas ricas em purinas e consumo excessivo de álcool. Por causa disso, é claramente associada com a qualidade de vida e era conhecida no passado como “doença dos reis”, devido a sua prevalência entre os poderosos socialmente (Nuki and Simkin 2006).

A gota é uma inflamação causada por deposição de cristais de ácido úrico nas articulações. Existem quatro estágios caracterizados na gota: assintomática, aguda, intercrítica e gota crônica tofácea (Dhanda, Jagmohan et al. 2011). No estágio assintomático o paciente apresenta hiperuricemia, porém, sem aparecimento de sintomas clínicos. A deposição de cristais de urato dentro das articulações leva à inflamação, caracterizando o estágio de artrite gotosa (ataque de gota). Este estágio se manifesta com dor, articulação vermelha, quente e algumas vezes associado a manifestações sistêmicas. O ataque de gota pode envolver uma ou múltiplas articulações; acomete comumente as articulações dos dedos dos pés, tornozelos e joelho. A dor, eritema e inchaço começam no início da manhã, com pico entre 24 e 48 horas. A dor é tão intensa que os pacientes, muitas vezes, não suportam o contato com roupas e lençóis (Eggebeen 2007). A gota intercrítica representa um intervalo assintomático entre os ataques de gota mesmo com a presença de cristais de urato no líquido sinovial e

hiperuricemia (Dhanda, Jagmohan et al. 2011). Ataques repetidos com formação de tofo caracterizam a gota crônica. O tofo é uma deposição de cristais de urato monossódio por debaixo da pele, formando protuberância nas articulações. A formação de tofo no tecido leva a uma significativa morbidade da doença que, se não tratada, pode levar à erosão e destruição da articulação (Eggebeen 2007).

1.2. Epidemiologia da gota

Segundo um estudo feito na população dos Estados Unidos entre 1993 e 2009, o número de visitas ao ambulatório devido à gota aumentou três vezes nas últimas décadas (Krishnan and Chen 2013). Segundo um estudo da *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES), a prevalência de gota entre os adultos nos Estados Unidos entre 2007 e 2008 foi de 3,9%, sendo que a prevalência no sexo masculino é maior (5,9%) que no feminino (2,0%) (Zhu, Pandya et al. 2011).

Em 2012, no Reino Unido, a prevalência de gota foi de 2,49% e a incidência de 1,77 por 1000 pessoas/ano, o que indica um aumento de gota nos últimos anos. Os homens tiveram uma maior prevalência (3,9%) comparada com as mulheres (1,05%). Essa diferença na prevalência entre os gêneros é observada em todas as idades, porém a partir dos 80 anos a prevalência é a mesma em ambos os gêneros (Kuo, Grainge et al. 2015). A diferença entre os gêneros na prevalência da gota está no fato de mulheres no período pré-menopausa estarem sob o efeito uricosúrico do hormônio estrógeno (Singh 2013).

Estudos epidemiológicos e experimentais apontam uma associação entre gota, aumento dos níveis de ácido úrico no sangue (hiperuricemia) e comorbidades. Evidências sugerem que hiperuricemia e gota são fatores de riscos independentes para o desenvolvimento de comorbidades como hipertensão, síndrome metabólica, doença renal crônica e doenças cardiovasculares. Estas condições contribuem para o aumento da mortalidade observada nos pacientes com gota. Os mecanismos pelos quais se ligam gota, hiperuricemia e comorbidades são multifatoriais incluindo o baixo grau de

inflamação, a atividade da enzima xantina oxidase, responsável pela formação de ácido úrico e os efeitos deletérios da própria hiperuricemia (Richette, Perez-Ruiz et al. 2014). Estudo feito na Inglaterra e Nova Zelândia, demonstraram que entre 1999 e 2009 ocorreu aumento das hospitalizações devido a gota e que estes pacientes apresentavam alta taxa de comorbidades, dentre as mais comuns a hipertensão, doenças renais e diabetes melitus (Robinson, Merriman et al. 2013).

1.3. Formação de ácido úrico e hiperuricemia

O ácido úrico é um produto final do metabolismo das purinas derivadas da dieta ou endógena a partir da renovação dos nucleotídeos purínicos dos ácidos nucléicos. Os nucleotídeos das purinas são degradados por meio de uma via na qual o grupo fosfato é perdido pela ação da enzima 5'-nucleotidase, formando o monofosfato de adenosina (AMP). O AMP libera a adenosina, que é então desaminada para inosina pela adenosina desaminase. A inosina é hidrolisada para liberar a D-ribose e a base purínica hipoxantina. A hipoxantina é então oxidada sucessivamente para xantina e para ácido úrico pela xantina oxidase. Na figura 1 pode ser observado este processo (Rock, Kataoka et al. 2013). O monofosfato de guanosina (GMP) também é catabolizado até ácido úrico. Primeiramente o GMP é hidrolisado para liberar o nucleosídeo guanosina, o qual é clivado para liberar guanina. A guanina sofre remoção hidrolítica do seu grupo amino para liberar xantina que é convertida em ácido úrico pela xantina oxidase. A velocidade de excreção de ácido úrico pelo ser humano adulto normal é de cerca de 0,6 g/24h (Choi, Mount et al. 2005).

Os níveis de urato são mantidos à custa da excreção do excedente da produção diária principalmente pelos rins, que eliminam cerca de dois terços dessa produção, ou através do intestino, que excreta o restante. O aumento da concentração sérica de ácido úrico a níveis acima de 6,8 mg/dl leva ao quadro de hiperuricemia que predispõe ao risco de cristalização, sobretudo na presença de condições favoráveis, como a diminuição da temperatura local ou do pH, que acontecem essencialmente nas extremidades (Punzi, Scanu et al. 2012). O processo de cristalização do MSU parece ser complexo e ainda não é entendido

totalmente. Além da alta concentração de ácido úrico e de sua solubilidade diminuir com a temperatura, a deposição não ocorre em solução e sim no tecido, principalmente na superfície da cartilagem, o que parece ser um componente importante no processo de cristalização (Bardin and Richette 2014).

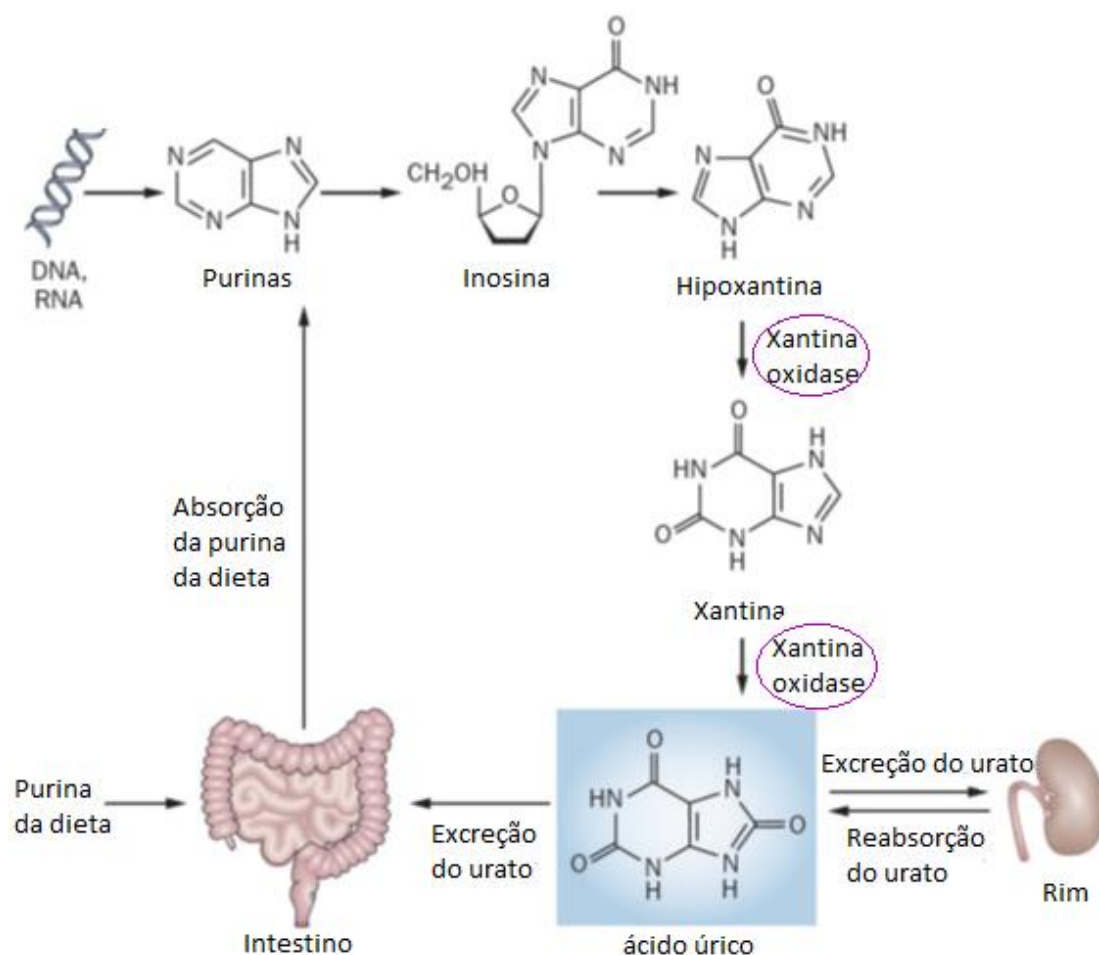


Figura 1. Via bioquímica do ácido úrico e sua homeostase

Purinas são absorvidas da dieta através do intestino ou são derivadas da degradação endógena de DNA e RNA. Posteriormente, são oxidadas pela xantina oxidase até a formação do ácido úrico. A maioria do ácido úrico é excretada pelos rins e o resto nas fezes, embora uma quantidade seja reabsorvida nos túbulos proximais dos rins. Adaptado de (Rock, Kataoka et al. 2013).

A hiperuricemia está associada a uma dieta com ingestão excessiva de purinas (derivados de carne vermelha e frutos do mar) e álcool. Além disso, a morte de células em larga escala pode levar à precipitação do urato. No entanto,

os níveis de ácido úrico elevados no soro não levam necessariamente à gota. A gota pode ocorrer ocasionalmente em indivíduos com níveis de ácido úrico normais, indicando claramente que fatores adicionais podem estar envolvidos na precipitação de ácido úrico (Ghaemi-Oskouie and Shi 2011).

1.4. Diagnóstico e Tratamento da Gota

Os sinais e sintomas de pacientes com gota aguda monoarticular podem ser confundidos com os sinais clínicos de pacientes com artrite séptica, pseudogota, outro tipo de artrite inflamatória, celulite ou trauma. Além disso, o diagnóstico correto é essencial para o tratamento apropriado dos pacientes afetados. Embora o diagnóstico definitivo seja estabelecido através da presença de MSU no fluido sinovial ou tofo, existem critérios clínicos para identificar um paciente com gota (Hamburger, Baraf et al. 2011).

As recomendações da liga europeia de reumatismo (EULAR) para o diagnóstico da gota são:

1. Ataque agudo monoarticular nas extremidades baixas, seguido de desenvolvimento rápido de dor, inchaço e sensibilidade com alcance máximo de 6 a 12 horas, especialmente com eritema é altamente sugestivo de inflamação por cristais, embora não seja específico para gota;
2. Embora somente a demonstração de cristais de MSU no fluido sinovial ou aspirado do tofo constitua um diagnóstico definido de gota, o diagnóstico clínico sozinho é razoavelmente preciso em pacientes com apresentações típicas de gota;
3. Os níveis de ácido úrico no soro são o fator de risco mais importante para gota, porém não confirmam ou excluem a gota, uma vez que muitas pessoas com hiperuricemia não desenvolvem gota, e em outras os níveis de ácido úrico no soro durante o ataque de gota são normais;
4. É recomendada a obtenção de amostras do fluido sinovial de articulações inflamadas para pesquisa de cristais de MSU;

5. Quando o diagnóstico é duvidoso, a identificação de cristais de MSU nas articulações assintomáticas permite um diagnóstico definido durante um período intercrítico;
6. Gota e sepse podem coexistir, portanto, quando a artrite séptica é uma suspeita, a coloração por Gram e cultura do fluido sinovial devem ser feitos, mesmo que cristais de MSU sejam identificados;
7. A avaliação da excreção renal de ácido úrico é raramente necessária em pacientes com gota, mas deve ser considerada para pacientes com idade menor que 25 anos com início de gota ou com histórico familiar;
8. Radiografias podem ser usadas no diagnóstico diferencial e podem mostrar características típicas de gota. Radiografias não são úteis na confirmação de diagnóstico precoce ou gota aguda e só devem ser feitas se há suspeita de fratura;
9. Fatores de risco para gota devem ser avaliados, incluindo aqueles característicos de síndrome metabólica (obesidade, hiperglicemia, hiperlipidemia e hipertensão), doença crônica renal, medicamentos, histórico familiar e estilo de vida (Hamburger, Baraf et al. 2011).

Os objetivos principais do tratamento da gota são o controle dos sintomas durante o ataque agudo, modificações dos fatores de riscos e farmacoterapia para prevenção (Eggebeen 2007).

Devido à intensa reação inflamatória caracterizada pelo ataque de gota, o tratamento apropriado de primeira linha é realizado com colchicina e/ou anti-inflamatórios não esteroidais (NSAID). A colchicina é um medicamento antigo que é capaz de reduzir a atividade e migração dos neutrófilos, bloqueando a montagem dos microtúbulos, a fagocitose e transporte de cristais de MSU, reduzir as moléculas de adesão na superfície das células endoteliais em resposta a IL-1 β ou TNF- α . Em pacientes intolerantes ou resistentes a colchicina e aos NSAID os esteroides são uma boa escolha terapêutica. Porém, em alguns casos, nos quais o paciente não responde aos tratamentos tradicionais, anticorpos anti-citocinas, em particular, anti-IL-1 β têm sido empregados com sucesso (Punzi, Scanu et al. 2012).

Em pacientes com mais de dois ataques de gota por ano, com tofo e dano articular visto em radiografia, é recomendado farmacoterapia preventiva com uso

de fármacos que reduzem os níveis de ácido úrico como o inibidor da enzima xantina oxidase (Alopurinol) ou agentes uricosúricos (Probenecida). Esta terapia deve ser iniciada somente após a completa resolução do ataque de gota, porque as flutuações dos níveis de ácido úrico podem piorar o processo inflamatório (Eggebeen 2007). É recomendado ainda o uso de baixas doses de colchicina para prevenir os ataques de gota em pacientes no início do tratamento com os fármacos que diminuem os níveis de ácido úrico (George, Pullman-Mooar et al. 2013).

1.5. Resposta inflamatória na gota

Células danificadas e em necrose são potencialmente danosas ao organismo e o sistema imune possui alguns sensores moleculares tais como receptores do tipo Toll, NOD e RLR que detectam e respondem ao dano. Além disso, o sistema imune inato possui mecanismos para monitorar células saudáveis. Esse monitoramento é feito através do reconhecimento de moléculas intracelulares quando estão presentes no meio extracelular. Moléculas intracelulares são liberadas após a ruptura da membrana plasmática e sua exposição no meio extracelular ativa o sistema imune, que reconhece e responde a esse sinal de dano de modo a limitá-lo e repará-lo. O sinal de dano celular pode ser referido como padrões moleculares associados ao dano (DAMPs, do inglês: *Damage associated molecular patterns*). O ácido úrico é considerado um DAMP (Rock, Kataoka et al. 2013).

Normalmente, as células contêm altos níveis de ácido úrico intracelularmente e quando essas células morrem, liberam ainda mais ácido úrico no meio extracelular através da metabolização das purinas. O ácido úrico é ainda mais imunogênico na sua forma de cristal. Cristais de MSU são capazes de ativar células dendríticas e aumentar a resposta imune possuindo desta forma uma atividade adjuvante (Shi, Evans et al. 2003). Os cristais de MSU podem ser reconhecidos por células do sistema imune inato como células dendríticas, macrófagos e neutrófilos (Ghaemi-Oskouie and Shi 2011). Os macrófagos residentes do tecido quando estimulados por cristais de MSU produzem mediadores inflamatórios que conduzem a inflamação. A gota é então

desencadeada por um mediador natural do organismo que pode ser produzido em grandes quantidades ou gerado inapropriadamente causando uma inflamação robusta (Rock, Kataoka et al. 2013).

A interação entre os cristais de MSU e as células resistentes na articulação, tais como sinoviócitos, promove a liberação de mediadores inflamatórios que resulta no recrutamento de neutrófilos. Esse recrutamento de neutrófilos é um marcador inflamatório da gota aguda, uma vez que normalmente não existem neutrófilos na articulação saudável. Após um estímulo inflamatório, os neutrófilos migram em grande número para membrana sinovial e fluido sinovial, chegando a uma porcentagem de 80% (Figura 2)

O processo de migração dos neutrófilos do sangue para o tecido ocorre por meio da interação com as células endoteliais. Esse evento possui vários passos que dependem da expressão de P- e E- selectinas nas células endoteliais. Um estímulo inflamatório induz a expressão destas selectinas na superfície do endotélio, no qual, promove o rolamento dos neutrófilos ao longo do endotélio. Este rolamento expõe o neutrófilo ao gradiente de quimiocinas expostas na camada do endotélio, resultando na ativação dos receptores de integrina. A ativação das integrinas dos leucócitos e a sua ligação aos receptores presentes no endotélio, induz uma interação de alta afinidade entre neutrófilo e endotélio. Essa interação resulta na adesão firme e estável entre esses dois tipos celulares. Na próxima etapa, os neutrófilos migram principalmente através de junções inter-endoteliais. A migração é mediada por várias moléculas de adesão incluindo a LFA-1, ICAM-1 e ICAM2 (Mitroulis, Kambas et al. 2013).

A chegada de neutrófilos na articulação é estimulada por citocinas, principalmente IL1 β e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), que estimulam a expressão de moléculas de adesão como a E-selectina. A fagocitose de cristais de urato pelos neutrófilos promove a liberação de mais mediadores, amplificando a resposta inflamatória aguda durante a gota (Rose and Liu-Bryan 2006).

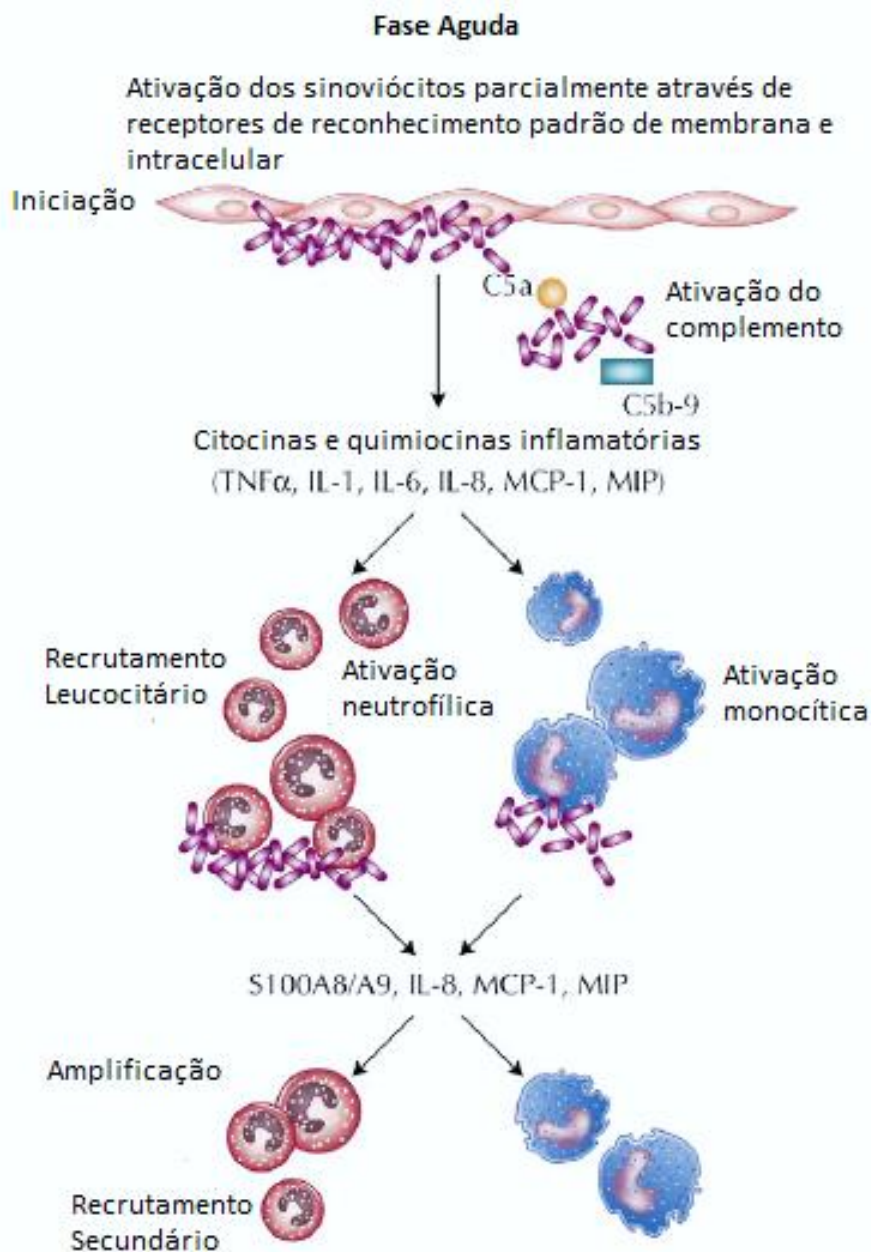


Figura 2. Iniciação da inflamação induzida por cristais de ácido.

Durante a fase aguda, cristais de MSU interagem com receptores de reconhecimento de padrões moleculares expressos nos sinoviócitos presentes nas articulações, resultando na liberação de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias. Esse evento resulta no recrutamento de leucócitos circulantes e liberação adicional de mediadores inflamatórios, amplificando assim a resposta inflamatória. Adaptado de (Rose and Liu-Bryan 2006).

1.5.1. Reconhecimento dos cristais de ácido úrico e vias de sinalização

Os cristais de MSU possuem carga altamente negativa e superfície reativa que é conhecida por se ligar avidamente às proteínas no plasma. Essa ligação é feita através de interações não específicas (Rose and Liu-Bryan 2006). Alguns estudos mostraram que cristais de ácido úrico isolados dos sítios inflamados na gota são cobertos com imunoglobulinas, principalmente IgG. A ligação do anticorpo ao cristal é feita através da região Fab enquanto a porção Fc fica exposta. Acredita-se que essa ligação do anticorpo com o ácido úrico facilita a precipitação do cristal, além de facilitar também a fagocitose desse cristal através do reconhecimento pelos receptores Fc presentes nas células imunes (Ghaemi-Oskouie and Shi 2011). Os mecanismos de reconhecimento e sinalização induzido por cristais de MSU são descritos a seguir (Figura 3).

As vias do complemento, clássica e alternativa, estão envolvidas na inflamação induzida por cristais de MSU. Fatores do complemento como C1, C3 e C5, já foram encontrados na superfície do cristal. Não se sabe ainda qual é o exato mecanismo da fixação do complemento, se a superfície do cristal age como um catalisador ou se é necessário algum fator sérico adicional para a ativação da cascata. A fixação do complemento tem implicações importantes. A principal implicação é o recrutamento de neutrófilos que é um marcador da inflamação da gota. Alguns fragmentos do complemento possuem ação quimiotática, dentre eles, o C5a (Shi, Mucsi et al. 2010). Um estudo recente demonstrou que C5a age como sinal endógeno que é requerido para produção de pró-IL1 β e IL1 β maduro induzido por cristais de MSU (An, Mehta et al. 2014). A fixação do complemento pode também produzir o complexo de ataque à membrana. Este complexo leva ao dano da membrana plasmática e morte celular (Shi, Mucsi et al. 2010).

Os receptores do tipo Toll foram inicialmente descritos no reconhecimento de infecções microbianas. Porém, vários estudos têm descrito o envolvimento destes receptores no reconhecimento de outras substâncias como os cristais de MSU (Shi, Mucsi et al. 2010). Liu-Bryan e colaboradores (2005) descreveram que os receptores do tipo Toll 2 e 4 (TRL2/4) e o adaptador MyD88 são necessários para ativação de macrófagos e recrutamento de neutrófilos na resposta inflamatória induzida por cristais de MSU (Liu-Bryan, Scott et al. 2005). Posteriormente, o mesmo grupo de pesquisa descreveu a participação do receptor CD14 juntamente com TRL2/4 na inflamação induzida por cristais de

MSU. CD14 é capaz de se ligar aos cristais de MSU e melhorar a sinalização mediada por TLR4 (Scott, Ma et al. 2006).

Ao entrar em contato com a membrana, os cristais interagem com os receptores do tipo Toll 2 e 4 (TLR2/4) ativando, via fator de diferenciação mieloide (MyD88), o fator nuclear-kappa B (NF- κ B). Esta cadeia de eventos pode ativar as células apresentadoras de antígenos além de promover a produção de citocinas pró-inflamatórias (Ghaemi-Oskouie and Shi 2011).

Outro modo de ativação das células por cristais de MSU é através da interação dos cristais com os lipídios de membrana. Essa interação passou a ser investigada com o intuito de identificar algum receptor específico nas células dendríticas, uma vez que os receptores do tipo Toll pareciam não ser funcionais neste tipo celular (Ghaemi-Oskouie and Shi 2011). Ng et al. (2008) demonstraram que a depleção de colesterol da membrana plasmática bloqueia completamente a resposta da célula dendrítica ao MSU. Após esta descoberta, foi possível identificar os eventos subsequentes da interação dos cristais de MSU com os lipídios de membrana. O cristal de MSU se liga no colesterol presente na superfície celular e essa ligação leva a uma movimentação dos lipídios de membrana devido à fluidez da membrana. Essa movimentação de lipídios leva à formação de agregados proteicos. Foi identificado nesses agregados um acúmulo de moléculas sinalizadoras dentre elas a motivo imunorreceptor de ativação baseado em tirosina (ITAM, do inglês: *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*). Em resposta a esse evento, a molécula Syk (do inglês: *Spleen tyrosine kinase*) é recrutada. Em seguida, Syk se liga à fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K) mediando a fagocitose do cristal. Este processo explica como cristais de MSU, sem receptor proteico específico, ativam células dendríticas na ausência de opsonização e ligação a anticorpo (Ng, Sharma et al. 2008).

Martinon et al. (2006) demonstraram que a liberação de IL-1 β era dependente de inflamassoma NLRP3, uma vez que a deficiência de NLRP3, ASC ou caspase 1 impede a ativação de IL-1 β induzida por cristais de MSU (Martinon, Petrilli et al. 2006). O termo inflamassoma descreve um complexo de alto peso molecular localizado no citoplasma das células, que possui atividade enzimática através do recrutamento e ativação de caspase 1, sendo esta responsável pela ativação de IL-1 β a partir do seu precursor pro-IL-1 β . NLRP3 é membro da família dos receptores do tipo NOD, reguladores da imunidade inata,

capazes de detectar estruturas microbianas e sinais de dano no citoplasma celular. Mecanismos têm sido propostos para explicar como os cristais de MSU conseguem ativar o inflamassoma (Martinon 2010). Um dos mecanismos foi descrito por Hornung et al. (2008) que demonstraram experimentalmente que a fagocitose de cristais leva à lise ou dano lisossomal com consequente ativação do inflamassoma NLRP3 via liberação de catepsina B (cisteíno-protease lisossomal) (Hornung, Bauernfeind et al. 2008). Outros mecanismos, tais como efluxo de potássio e estresse oxidativo induzido pelo cristal de MSU, também são capazes de ativar o inflamassoma (Martinon 2010).

Estudos recentes descrevem IL-1 β como uma citocina pró-inflamatória que desempenha um papel chave durante a gota, promovendo influxo de neutrófilos para sinóvia e fluido articular, caracterizando assim, a IL-1 β como um marcador patológico da resposta inflamatória aguda (Kingsbury, Conaghan et al. 2011).

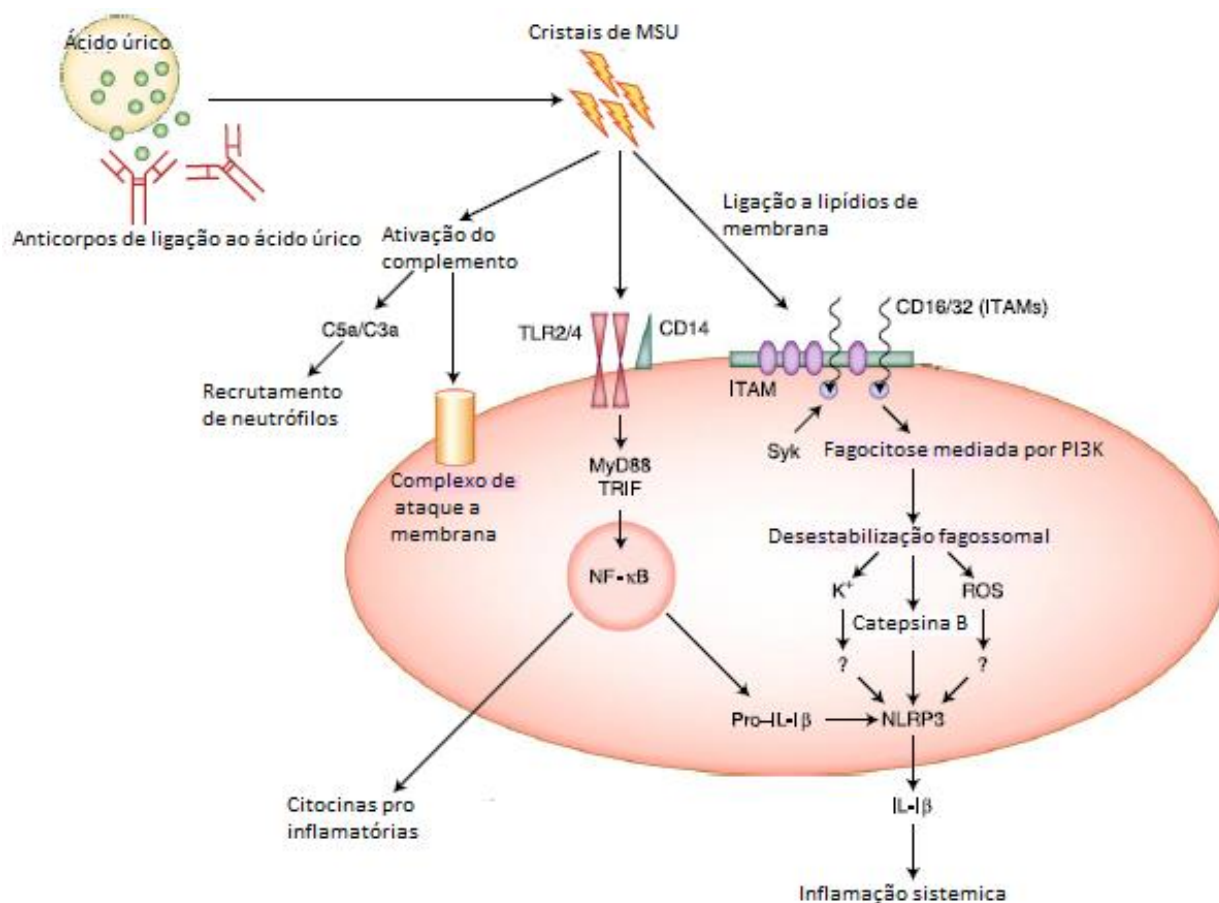


Figura 3: Mecanismos de ativação celular induzida por cristais de MSU.

O ácido úrico forma cristais através da ligação com anticorpos. Os cristais ativam as vias do complemento produzindo c3a, c5a e complexo de ataque à membrana. Os cristais de MSU ativam receptores do tipo Toll 2/4 e CD14, quem levam à ativação de NF- κ B via Myd88/TRIF. Os cristais de MSU podem ainda se ligar no colesterol presente na membrana plasmática. A movimentação desses lipídios de membrana leva ao recrutamento de Syk através da ativação de ITAMs. Syk se liga à PI3K mediando a fagocitose dos cristais. A fagocitose dos cristais de MSU causa dano à membrana lisossomal promovendo a liberação de catepsina B, que ativa o receptor do tipo NOD (NLRP3 inflamassoma). Ativação do inflamassoma leva à liberação de IL-1 β maduro promovendo inflamação sistêmica. Adaptado de (Ghaemi-Oskouie and Shi 2011).

1.6. Fator Inibitório da Migração de Macrófagos - MIF

O fator inibitório da migração de macrófagos (MIF do inglês: *Macrophage Migration Inhibitory Factor*), uma citocina pró-inflamatória, foi descoberta há

quase 40 anos durante um estudo de reação de hipersensibilidade do tipo tardia. Foi descrita em 1960 como uma citocina de célula T e redescoberta no início de 1990 como um peptídeo neuroendócrino e modulador da imunidade inata. Ao contrário da maioria das citocinas, MIF é constitutivamente expressa e estocada em *pools* intracelulares e, por isso, não requer a síntese proteica *de novo* antes da sua secreção (Calandra and Roger 2003).

MIF é uma proteína altamente conservada de 12.5kDa. É um trímero com três monômeros idênticos. Cada monômero consiste em duas α hélices antiparalelas e seis fitas das quais quatro constituem folhas β . Esta estrutura trimérica de MIF possui uma função enzimática, a catalisação da tautomerização de D-dopacromo, com relevância biológica ainda desconhecida (Aeberli, Yang et al. 2006).

Notavelmente, MIF é expressa por células dos tecidos que estão em contato direto com o ambiente, tais como os pulmões, pele e trato gastrointestinal e geniturinário. Outra característica distinta de MIF é seu alto nível de expressão em vários tecidos do sistema endócrino, especialmente por órgãos que estão envolvidos na resposta ao estresse (hipotálamo, pituitária e glândula adrenal) (Bernhagen, Calandra et al. 1993). Quando estimulados com LPS, macrófagos liberam MIF. Outras moléculas efetoras pró-inflamatórias de células imunes, tais como TNF e IFN- γ são também fortes indutores da produção de MIF pelos macrófagos (Calandra, Bernhagen et al. 1994). Após a liberação de MIF no tecido e na circulação, esta age como uma clássica citocina pró-inflamatória induzindo a resposta imune inata e adaptativa através da ativação de macrófagos e células T (Calandra and Roger 2003).

Um evento importante durante o processo inflamatório é a migração de leucócitos para o local inflamado. Esse evento de migração depende da interação do leucócito com o endotélio. Esse processo pode ser regulado também por MIF como descrito por Gregory et al. (2004), no qual sugere que MIF promove a interação entre leucócitos e células endoteliais, através da promoção de rolamento mediado por P-selectinas (Gregory, Leech et al. 2004). Posteriormente, o mesmo autor descreveu que MIF promove a ativação da resposta inflamatória mediada por macrófagos, através da indução da migração de monócitos para o local da inflamação via indução da liberação de CCL2 pelas células endoteliais (Gregory, Morand et al. 2006). Além disso, foi descrito por

Bernhagen et al. (2007) que MIF pode ainda possuir atividades quimioatrativas para neutrófilos (Bernhagen, Krohn et al. 2007). Santos et al. (2011) descreveu a participação de MIF no recrutamento de neutrófilos em inflamação artrítica através da facilitação da resposta migratória mediada por quimiocinas e ativação de MAPKs (proteínas cinases ativadas por mitógenos) (Santos, Fan et al. 2011). A indução e regulação de MIF durante a resposta imune inata está demonstrada na figura 4.

A sinalização de MIF requer a ligação ao seu receptor CD74. CD74 é conhecido como cadeia invariante associada ao MHC de classe II envolvida no transporte de proteínas do retículo endoplasmático para o complexo de Golgi. Cerca de 5% do conteúdo celular de CD74 permanece expresso na superfície celular independente da molécula de MHC II. O domínio intracelular de CD74 parece não apresentar motivos conhecidos de ligação para moléculas de sinalização (Calandra and Roger 2003).

As células do sistema imune respondem à ação de MIF, porém nem todas as células possuem o receptor CD74, como é o caso dos neutrófilos. Dessa forma, Bernhagen *et al.* (2007), demonstraram uma co-localização de CD74 e CXCR2/4 sugerindo CXCR2/4 como receptores funcionais para MIF. A ativação destes receptores por MIF demonstra sua função semelhante à de quimiocinas e apresenta MIF como um regulador da inflamação (Bernhagen, Krohn et al. 2007).

Além disso, já é descrito que CD74 possui um domínio intracelular pequeno com ausência de motivos para ativação de segundos mensageiros. Essa informação levou a descoberta, por Shi et al 2006, da participação da molécula CD44 como molécula acessória na transdução de sinal induzida por MIF (Shi, Leng et al. 2006). A formação do complexo MIF-CD74-CD44 leva à ativação da tirosina-quinase Src e subsequentemente à ativação das proteínas MAPKs, em particular ERK1/2 (quinase regulada por sinal extracelular), p38 MAPK e de c-Jun N-terminal quinase (JNK), assim como a fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K). A fosforilação de moléculas de sinalização em resposta ao MIF leva ao aumento da expressão de genes-alvos, importantes na inflamação e proliferação. Além disso, MIF promove uma potencialização dos efeitos de outras moléculas pró-inflamatórias devido à sua habilidade de amplificar a ativação de MAPKs. Um mecanismo alternativo da sinalização da atividade de MIF ocorre no

citoplasma após endocitose de MIF. MIF se liga e interage com a proteína que se liga ao domínio de ativação de c-Jun 1 (JAB-1). JAB-1 ativa JNK a fosforilar Jun e age como co-ativador da proteína ativadora 1 (AP-1) – fator de transcrição associado à produção de mediadores inflamatórios, crescimento celular e transformação. MIF ao interagir com JAB-1 é capaz de inibir sua atividade, incluindo modulação da atividade de AP-1 e sustentação da fosforilação de ERK1/2 (Santos and Morand 2009).

MIF tem um papel bem estabelecido na resposta à endotoxina bacteriana, ativação de células T e tráfego de leucócitos e é associado à patogênese de doenças inflamatórias comuns incluindo artrite reumatoide, colite, esclerose múltipla, lúpus sistêmicos eritematosos, entre outras (Aeberli, Yang et al. 2006).

Uma característica importante de MIF é que, além de sua função como citocina pró-inflamatória, possui uma relação com glicocorticoides (GCs), agindo como um contrarregulador da ação anti-inflamatória e supressora dos GCs. Daun e Cannon (2000) sugeriram que MIF antagoniza os efeitos dos GCs através da inibição da síntese de I κ B- α , proteína responsável por manter NF- κ B no citoplasma celular, impedindo, dessa forma, a transcrição de genes pró-inflamatórios (Daun and Cannon 2000). Posteriormente, Roger et al. (2005) sugeriu que MIF exerce seu efeito contra regulatório sobre GCs através da inibição da expressão de MKP-1, membro da família das fosfatases que desfosforilam e inativam as MAPKs (Roger, Chanson et al. 2005).

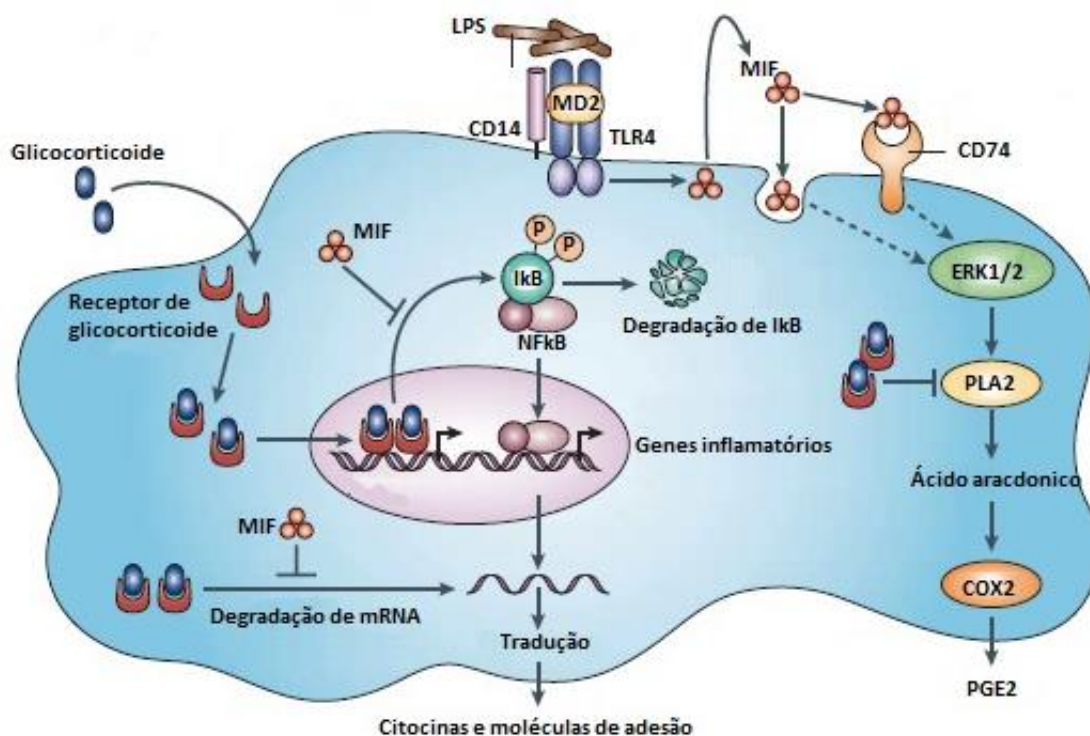


Figura 44. Indução e regulação de MIF durante a imunidade inata.

MIF regula a expressão de TLR4 pelos macrófagos permitindo o rápido reconhecimento de endotoxinas, que promovem a produção de citocinas, incluindo MIF, e outros mediadores. MIF ativa a cascata de eventos seguidos da ativação de ERK1/2. MIF contrarregula os níveis imunossupressivos nos níveis transcricional e pós traducional. Adaptado de (Calandra and Roger 2003).

Como já mencionado anteriormente, os neutrófilos são células chave no processo inflamatório e dano tecidual observado na gota. Além disso, esse recrutamento de neutrófilos é dependente de IL-1 β e receptores de quimiocinas como o CXCR2 (Amaral, Costa et al. 2012). Sabendo que este receptor é funcional para MIF, uma das hipóteses deste trabalho foi investigar a participação de MIF no contexto da inflamação induzida por cristais de MSU.

1.7. Resolução da inflamação

A inflamação é uma resposta do organismo à diferentes estímulos, sejam eles infecciosos ou não. Como características, há a produção de vários mediadores de origens diferentes, ativação de diferentes receptores e um importante recrutamento celular para o sítio inflamatório. Apesar de necessária,

a resposta inflamatória, se excessiva, é potencialmente maléfica, podendo ser base de algumas doenças inflamatórias crônicas ou até causar a morte do organismo em condições extremas como a sepse (Fullerton, O'Brien et al. 2013). Assim, maneiras de atenuar ou inibir uma inflamação exacerbada constitui uma estratégia importante para preservar a integridade do organismo. A resolução de tais respostas inflamatórias é necessária para restabelecer a homeostase, limitando lesão tecidual excessiva e minimizando o desenvolvimento de doenças crônicas (Serhan, Brain et al. 2007).

Uma característica interessante da gota aguda é a sua natureza limitante da inflamação. Na ausência de tratamento o episódio de gota se resolve espontaneamente em 7 a 10 dias (Steiger and Harper 2014). O *clearance* de neutrófilos e outras células apoptóticas é essencial para o mecanismo de resolução da inflamação aguda (Choi, Mount et al. 2005). Porém, pouco se sabe sobre as vias envolvidas na resolução da inflamação da gota (Steiger and Harper 2014).

A resolução da gota segue o curso geral de resolução de uma inflamação aguda. Em resposta à injúria, os neutrófilos migram para o sítio inflamatório, neutralizando e eliminando estímulos potencialmente deletérios. Com o fim do estímulo, ocorre diminuição local dos mediadores pró-inflamatórios, através da diminuição da síntese e aumento do catabolismo dos mesmos. Em adição à esses eventos, ocorre liberação de fatores anti-inflamatórios e pró-resolutivos que previnem a formação de edema e migração de PMN adicionais. Estes eventos marcam o início do processo resolutivo que irá restabelecer a homeostase tecidual (Alessandri, Sousa et al. 2013)

No caso da gota, o processo de resolução se inicia com a remoção e/ou neutralização dos cristais de MSU (Figura 5). Macrófagos podem capturar os cristais de MSU, porém essa captura depende do estado de diferenciação desses macrófagos. Quanto mais maduros forem esses macrófagos, mais cristais de MSU eles são capazes de capturar. Macrófagos imaturos são encontrados em maior quantidade no sítio inflamatório no início da gota, e podem contribuir para o início da inflamação, enquanto, macrófagos que estão presentes mais tardiamente contribuem para resolução através do *clearance* de cristais de MSU (Rose and Liu-Bryan 2006). Alguns estudos têm demonstrado ainda, que o revestimento da superfície dos cristais de MSU é um fator

importante que regula a resposta inflamatória. O revestimento dos cristais com imunoglobulinas possui ligação com a fase inflamatória, enquanto o revestimento dos cristais com lipoproteínas ApoB e ApoE está associado com a fase de resolução. A ligação de ApoB e ApoE na superfície dos cristais suprime a ativação de neutrófilos. Além disso, as apolipoproteínas possuem papel de mascarar os cristais de MSU impedindo sua detecção por células inflamatórias, facilitando dessa forma a captura dos cristais e sua remoção (Steiger and Harper 2014). Alguns receptores de reconhecimento padrão presentes na superfície celular são necessários para o reconhecimento desses cristais. Um exemplo são os receptores do tipo Toll 2/4 que participam da fagocitose dos cristais e expressão de citocinas pró-inflamatórias. O receptor de reconhecimento padrão, CD14 é altamente expresso em macrófagos imaturos e é capaz de reconhecer cristais de MSU inerte e desencadear a produção de citocinas pró-inflamatórias (Rose and Liu-Bryan 2006).

O *clearance* eficiente e rápido de neutrófilos apoptóticos contribui para a resolução da inflamação. Essa contribuição é feita de duas formas. A retirada de neutrófilos apoptóticos impede que esses neutrófilos sofram necrose secundária o que liberaria moléculas intracelulares que danificam o tecido além de exacerbar a resposta inflamatória. Além disso, a fagocitose de neutrófilos apoptóticos por macrófagos desencadeia a liberação de mediadores anti-inflamatórios nestas células, tais como fator de crescimento transformante β (TGF- β), Interleucina-10 (IL-10) e Prostaglandinas anti-inflamatórias como a PGE2. Dessa forma, o *clearance* de neutrófilos apoptóticos por macrófagos acelera a resolução da resposta inflamatória (Rose and Liu-Bryan 2006). Estudo recente demonstrou que os neutrófilos também possuem capacidade não inflamatória através da fagocitose de neutrófilos apoptóticos, evento denominado pelo autor como canibalismo. Esse processo também desencadeia a produção de TGF- β 1 contribuindo de forma significativa para o processo de resolução (Steiger and Harper 2013).

Os mediadores anti-inflamatórios contribuem para resolução da inflamação da gota por diversas maneiras. O TGF- β , liberado por macrófagos ativados por cristais de MSU, suprime a expressão de moléculas de adesão (E-selectina) nas células endoteliais, levando a uma menor adesão leucocitária e consequentemente menor recrutamento de neutrófilos (Yagnik, Evans et al.

2004). Além disso, TGF- β promove a diferenciação de fibroblastos que contribuem para o reparo de feridas e estabilização do tofo. A PGE₂, juntamente com outros mediadores lipídicos, estimula a apoptose de neutrófilos e sua eferocitose por macrófagos (Rose and Liu-Bryan 2006).

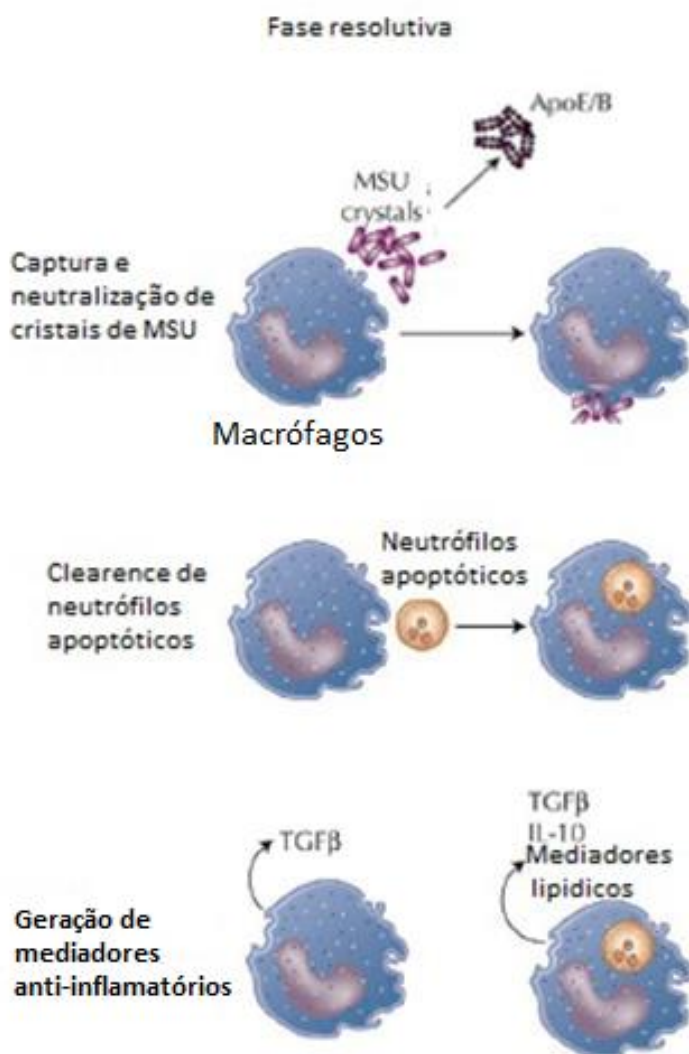


Figura 5. Resolução da inflamação induzida por cristais de MSU.

Durante a fase de resolução, cristais de MSU são capturados e neutralizados diminuindo o acesso e disponibilidade aos cristais. Além disso, o *clearence* de neutrófilos apoptóticos auxilia na resolução desencadeando a geração de mediadores anti-inflamatórios. Adaptado de (Rose and Liu-Bryan 2006).

Algumas vias envolvidas no processo de resolução da gota, já foram descritas e são citadas a seguir (Figura 6). Segundo Dubois et al 1900, o TGF- β contribui para a resolução da inflamação induzida por cristais de MSU através

da sua capacidade em reduzir a expressão do receptor de IL-1 β (IL-1R) nas células hematopoiéticas (Dubois, Ruscetti et al. 1990). A produção de IL-1 e a ativação do seu receptor (IL-1R) são essenciais para desencadear a inflamação induzida por cristais de MSU (Chen, Shi et al. 2006). Um antagonista natural seletivo do receptor de IL-1 (IL-1Ra) inibe os efeitos de IL-1 por competição pelo receptor na sinóvia (Schiff 2000). Estudos demonstraram que TGF- β 1 pode induzir a secreção de IL-1Ra por monócitos (Turner, Chantry et al. 1991) e o tratamento com IL-1Ra (Anakinra) ameniza as manifestações inflamatórias do ataque de gota (So, De Smedt et al. 2007).

Existem evidências que reguladores negativos de citocinas podem contribuir para a resolução da inflamação. Esses reguladores incluem as proteínas STATs (transdutoras de sinais e ativadores transicionais) e as supressoras de sinalização de citocinas (SOCS). Foi demonstrado por Chen et al. (2011) o aumento da produção de TGF- β 1, IL-1Ra, IL-10 e dos receptores solúveis de TNF, além da regulação positiva de CIS (citocina indutível por proteína SH2) e SOCS3 durante a resolução espontânea do ataque agudo de gota (Chen, Hsieh et al. 2011).

Alguns estudos têm sugerido a ligação entre mediadores lipídios e resolução da inflamação. O ômega 3 gerado a partir de ácido graxo é capaz de limitar o recrutamento de neutrófilos e aumentar o *clearance* de neutrófilos apoptóticos pelos macrófagos. Além disso, foi relatado que o ômega 3 pode inativar o inflamassoma e conseqüentemente bloquear a secreção de IL-1 β (Yan, Jiang et al. 2013, Steiger and Harper 2014)

Estudos prévios indicam que neutrófilos ativados com MSU liberam “armadilhas extracelulares de neutrófilos” (NETs, do inglês: *neutrophil extracellular traps*), e essa formação de NETs é capaz de desencadear um processo de regulação de morte celular conhecida como NETose. Este mecanismo promove a remoção destes neutrófilos juntamente com os neutrófilos apoptóticos via fagocitose por macrófagos (eferocitose). Além desse *clearance*, os macrófagos secretam TGF- β 1, reforçando a eferocitose e inibindo a amplificação da sinalização de IL-1 β através do bloqueio da geração de pró-IL-1 β (Steiger and Harper 2014).

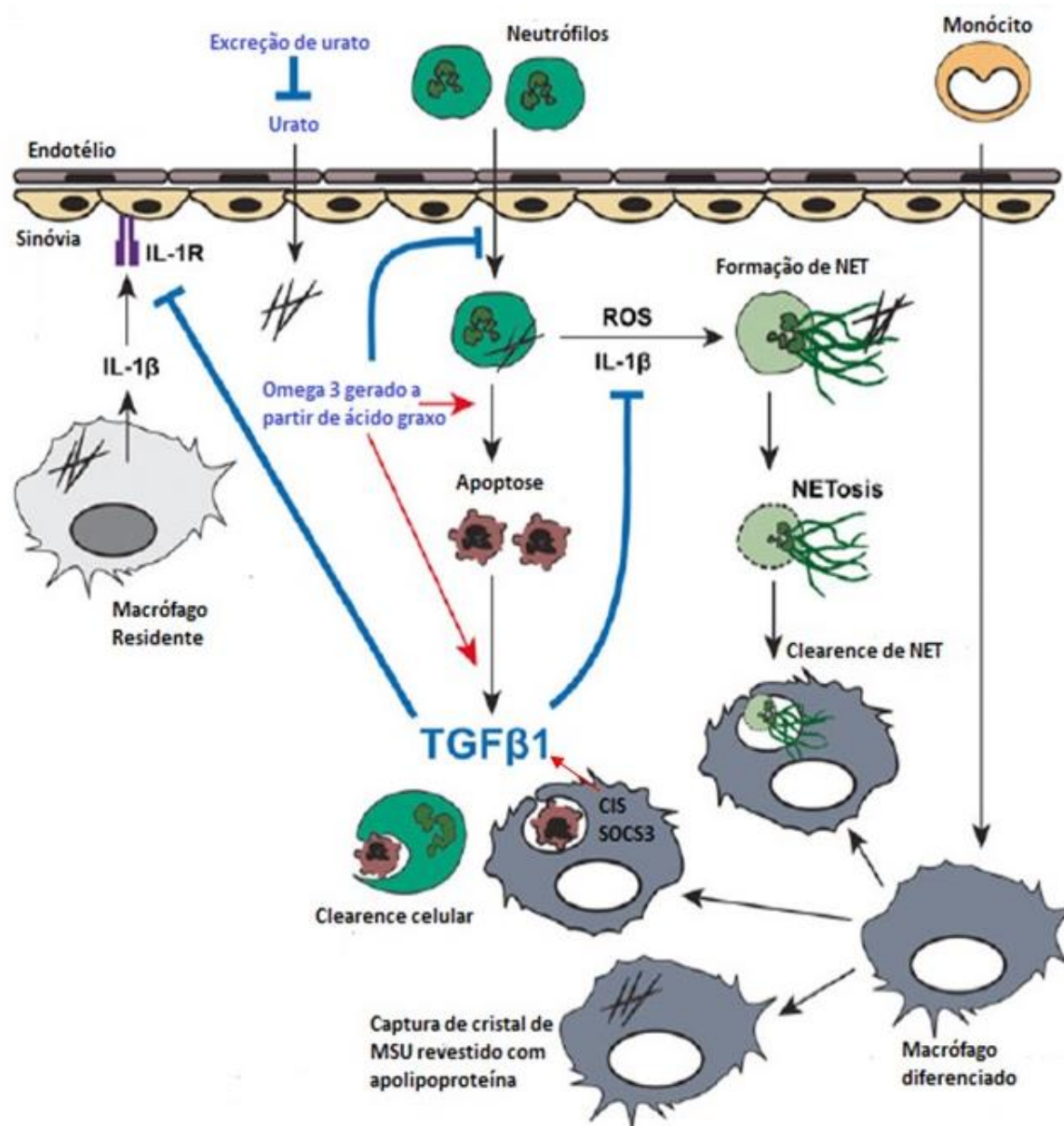


Figura 6: Mecanismos envolvidos na resolução espontânea da inflamação induzida por cristais de MSU.

Macrófagos residentes reconhecem e fagocitam cristais de ácido úrico. Esse evento leva liberação de IL-1 β que se liga ao seu receptor no endotélio promovendo o recrutamento de neutrófilos para o local da inflamação. Neutrófilos também fagocitam os cristais e morrem por apoptose ou NETosis. Macrófagos diferenciados são capazes de fagocitar cristais e neutrófilos mortos (eferocitose) promovendo o *clearance* do local. Além disso, macrófagos diferenciados, neutrófilos mortos por apoptose e ômega 3 liberaram TGF- β que contribui para o processo resolutivo através da inibição de IL-1 β e consequentemente da diminuição do recrutamento de neutrófilos. Adaptado de (Steiger and Harper 2014).

1.8. Anexina A1

Até a década de 90 acreditava-se que a resolução da inflamação fosse um processo passivo com inativação/diluição dos mediadores produzidos durante a fase produtiva da inflamação. Diversos estudos durante os anos 2000 e atuais, liderados principalmente pelo Prof. Charles Serhan (Serhan et al., 2007) contribuíram para o entendimento do processo resolutivo. Sabe-se, atualmente, que o processo resolutivo é um fenômeno ativo e contínuo no qual envolve a ativação de diferentes mediadores bioquímicos e vias de sinalização para alcançar uma restauração rápida e bem-sucedida da homeostase do tecido. A resolução requer a diminuição do recrutamento de granulócitos, substituição de mediadores pró-inflamatórios por mediadores pró-resolutivos que incluem os mediadores endógenos de natureza lipídica (Lipoxina, resolvinas, maresinas) e ou protéica (Anexina A1), dentre outros. Além disso, a resolução está associada com o desligamento das vias de sinalização associadas a produção de citocinas pró-inflamatórias e vias sobrevivência celular, culminando na apoptose de granulócitos e clearance por macrófagos de fenótipo resolutivo (Serhan et al, 2007; Perreti & Daquisisto, 2009; Alessandri et al, 2013; Sousa et al, 2013). Nos últimos anos, estudos têm focado em mediadores com estas propriedades resolutivas como alvos terapêuticos e neste contexto, a anexina A1 (AnxA1) tem sido investigada (Gavins and Hickey 2012).

Anexina foi descoberta e caracterizada em 1970. Foi inicialmente descrita como uma proteína que possuía habilidade de modular a geração de eicosanoides, através da inibição da atividade da fosfolipase A2 e, assim, inibir a liberação de prostaglandina E2 e LTB4 por neutrófilos e macrófagos. Diferentes nomes foram sugeridos para esta proteína, mas o termo escolhido foi lipocortina 1. O nome Anexina A1 foi dado posteriormente devido a sua habilidade de se anexar em fosfolipídio de membrana (Gavins and Hickey 2012).

Anexina A1 pertence à superfamília das anexinas. Essa família é caracterizada por possuir quatro grupos de domínios com repetições homologas de aproximadamente 70 resíduos que abriga domínios de ligação ao cálcio. Cada membro desta família é distinguido por uma região N-terminal. A AnxA1 é

altamente expressa em células do sistema hematopoiético, incluindo neutrófilos, macrófagos e mastócitos. Os neutrófilos contêm grande quantidade de AnxA1, na qual, representa 2-4% das proteínas citoplasmáticas totais (D'Acquisto, Perretti et al. 2008).

A localização da AnxA1 depende do tipo celular. Nos neutrófilos ela está presente nos grânulos de gelatinase e dispersa no citoplasma. Nos macrófagos e na maioria das células investigadas ela está localizada no citoplasma embora também possa ser encontrada associada à membrana celular, citoesqueleto e núcleo dependendo do estado de ativação celular (D'Acquisto, Perretti et al. 2008).

A AnxA1 possui uma relevância particular no controle da inflamação. Foi descrita por Flower and Blackwell em 1979 como segundo mensageiro dos glicocorticoides (Flower and Blackwell 1979). Desde então, evidências sugerem que Anexina A1 seja um regulador importante do sistema imune. (Yang, Morand et al. 2013) Anexina A1 participar do estágio inicial da inflamação, especialmente no recrutamento de leucócitos e geração de mediadores, além de agir na fase resolutive induzindo a apoptose de neutrófilos e aumentando a eferocitose de macrófagos (Sousa, Alessandri et al. 2013).

Os glicocorticoides possuem grande efeito anti-inflamatório e por esse motivo têm sido usados para tratamento de várias doenças inflamatórias por décadas. A ação biológica dos glicocorticoides é exercida através de sua ligação ao seu receptor citoplasmático. O complexo glicocorticoide-receptor (GR) migra do citoplasma para o núcleo, onde exerce seu efeito na regulação gênica, ou através da interação do complexo GR com fatores transcrição ligados ao DNA promovendo o recrutamento de transativadores ou transrepressores da expressão gênica, ou pela interação direta com sequencias no DNA chamada elementos responsivos aos glicocorticoides (GRE). A atividade transrepressora está envolvida na repressão da produção de citocinas pró-inflamatórias e consequentemente na inibição do recrutamento de células inflamatórias. A atividade transativadora está envolvida na expressão de mediadores anti-inflamatórios tais como proteína quinase ativada fosfatase 1 (MKP-1), zíper de leucina induzida por glicocorticoide (GILZ) e AnxA1. A participação de AnxA1 no efeito anti-inflamatório dos glicocorticoides tem sido demonstrado em modelos murinos de artrite reumatoide incluindo artrite por transferência de soro K/BxN

(Patel, Kornerup et al. 2012) e artrite induzida por antígeno (AIA) (Yang, Morand et al. 2004). A participação de AnxA1 em um contexto de gota ainda não foi descrita.

O potencial efeito anti-inflamatório mediado por AnxA1 tem sido investigado desde sua descoberta. Vários estudos em diferentes modelos experimentais vêm demonstrando a participação de AnxA1 no controle do recrutamento de neutrófilos e produção de citocinas pró-inflamatórias além da indução de apoptose em neutrófilos (Yang, Morand et al. 2013).

Neutrófilos, monócitos e macrófagos contêm constitutivamente grande quantidade de AnxA1 no citoplasma. Após ativação celular, AnxA1 se mobiliza para superfície celular e é rapidamente secretada. O mecanismo de secreção de AnxA1 é célula-específica. Em macrófagos, o sistema de transporte ABC é o responsável pela secreção de AnxA1 enquanto em, nas células da hipófise, a fosforilação em serina 27 é requerida. Como já mencionado, AnxA1 é estocado em grânulos de gelatinase no neutrófilos e pode ser rapidamente mobilizada pela exposição das células a fracos sinais de ativação, tais como baixas concentrações de quimioatraentes ou adesão à monocamada endotelial. A ativação celular realoca AnxA1 para a parte externa da membrana plasmática, onde ela fica ancorada de maneira dependente de cálcio. Concentrações extracelulares de cálcio acima de 1 mM leva a uma mudança conformacional da proteína, tal que a região N-terminal que está ancorada na membrana é exposta e assim a forma ativa da Anexina A1 é gerada (Perretti and D'Acquisto 2009).

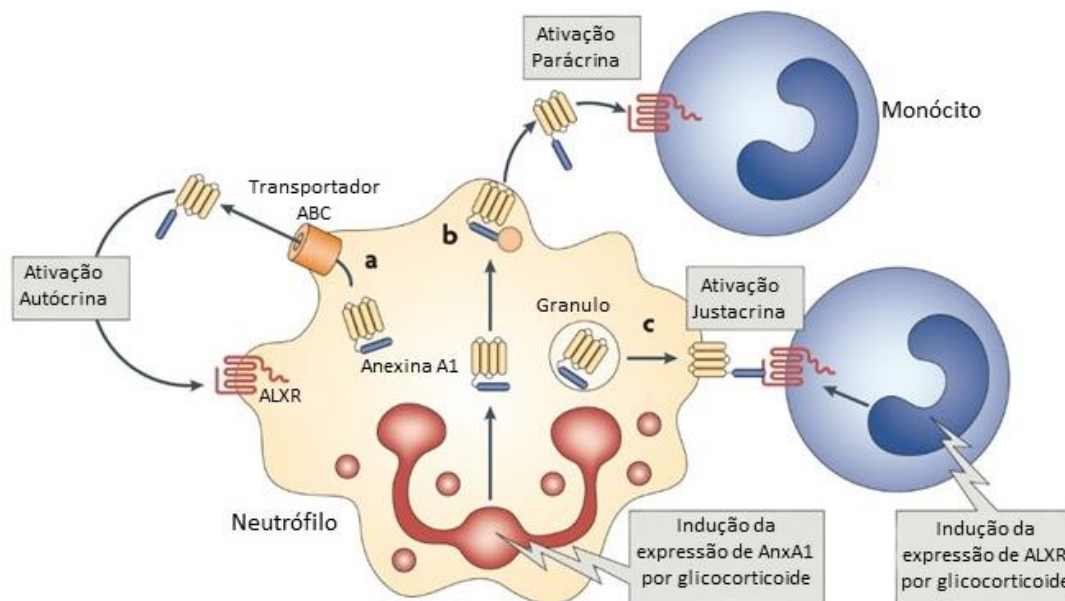


Figura 7: Mobilização de AnxA1 em células ativadas e seu potencial modo de ação.

Após ativação celular, através da adesão a monocamada endotelial, AnxA1 intracelular é mobilizada para membrana plasmática. Dependendo do tipo celular ela é externalizada ou secretada através de 3 mecanismos: ativação do transportador ABC; fosforilação do resíduo N-terminal de serina 27 seguido pela localização na membrana em domínios lipídicos específicos com movimentação para parte exterior da membrana plasmática e secreção subsequente; ou através da fusão de grânulos contendo AnxA1 com a membrana plasmática seguida de liberação. Na presença de concentrações extracelulares de cálcio acima de 1 mM ocorre mudança conformacional da AnxA1 levando a exposição da região N-terminal que se liga ao seu receptor ALXR (também conhecido como FPR2). AnxA1 pode funcionar de maneira autócrina, parácrina e justácrina (envolvendo contato célula-célula) de maneira a ativar a sinalização via receptor. A via AnxA1/ALXR pode ser modulada por glicocorticoide, o qual induz expressão de genes aumentando o efeito anti-inflamatório do circuito. Adaptado de (Perretti and D'Acquisto 2009)

AnxA1 endógena e administrada de forma exógena (através do peptídeo bioativo que abrange a região N-terminal) modula a atividade imune inata, em particular o recrutamento de leucócitos e a produção de mediadores inflamatórios (Yang, Morand et al. 2013). Foi descrito em 2000 por Walther et al, que a ligação de AnxA1 ao seu receptor regula o extravasamento de neutrófilos

(Walther, Riehemann et al. 2000). Ainda em 2000, Zouki et al descreveram que peptídeos anti-inflamatórios regulam a expressão de moléculas de adesão em leucócitos e dessa forma previnem a adesão de neutrófilos em células endoteliais (Zouki, Ouellet et al. 2000).

AnxA1 compete com Lipoxina A4 e outros ligantes que são capazes de se ligar ao receptor FPR2. Esse receptor possui 7 domínios transmembrana e é acoplado a proteína G (Yang, Morand et al. 2013). O bloqueio de FPR pelo uso do antagonista BOC previne a ação inibitória da AnxA1 e seu peptídeo sobre a transmigração de neutrófilos. Em resumo, neutrófilos ativados liberam AnxA1 que se liga ao seu receptor FPR2, promovendo influxo de Ca^{2+} e destacamento dos neutrófilos aderidos no endotélio que resulta na redução da transmigração (Perretti 2003).

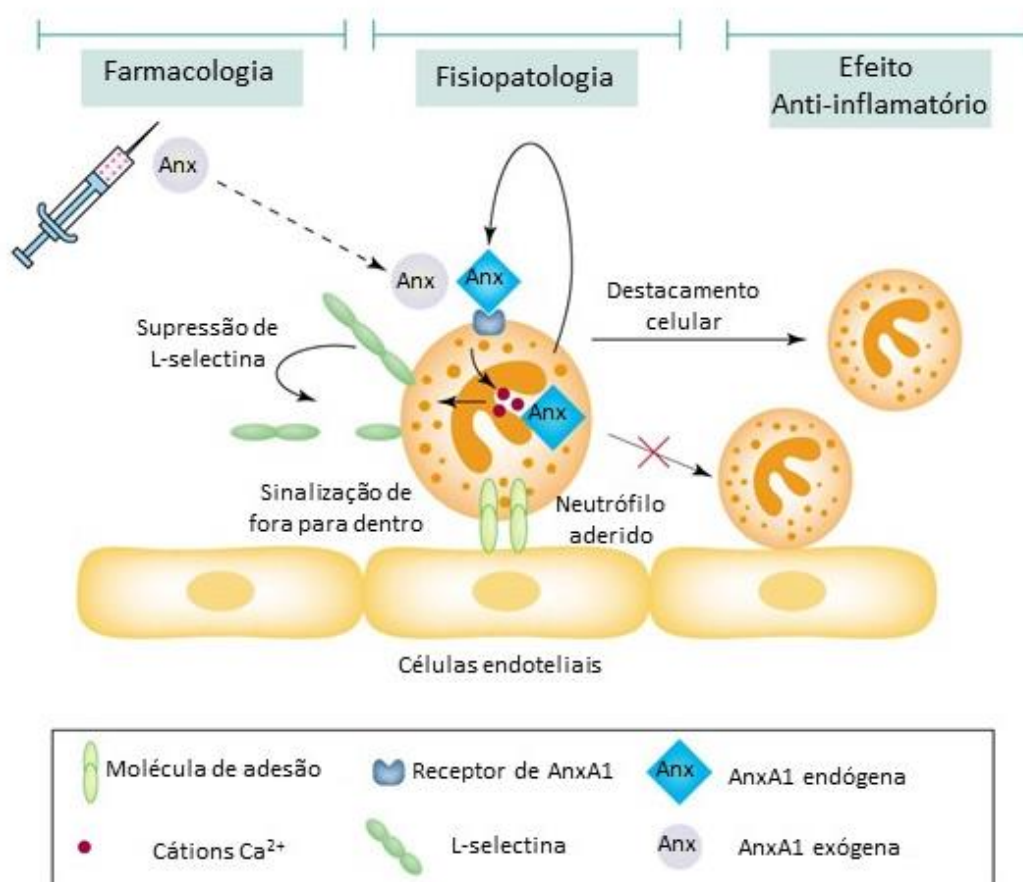


Figura 8: Ação da AnxA1 sobre o destacamento de neutrófilos.

A adesão do neutrófilo é um estímulo para mobilização de AnxA1 que é secretada e se liga em seu receptor FPR promovendo aumento da concentração de cálcio intracelular. Essa resposta intracelular pode interferir em eventos celulares que ocorrem antes da

diapese, promovendo a redução da expressão de molécula de adesão (L-Selectina) o que resulta no destacamento de neutrófilos do endotélio. A administração exógena do peptídeo ativo de AnxA1 possui o mesmo efeito. Adaptado de (Perretti 2003).

A AnxA1 intacta é uma proteína de 37 kDa que é externalizada após ativação celular. Uma vez secretada, a maior parte da proteína é clivada na região N-terminal por proteases como elastase e proteinase 3, dando origem à AnxA1 de 33 kDa. A região N-terminal é caracterizada como promotora da ação anti-inflamatória da AnxA1; sendo assim, a clivagem inativa a proteína e AnxA1 clivada não possui atividade anti-inflamatória (Sousa, Alessandri et al. 2013). Ainda não se sabe ao certo qual a relevância dessa clivagem, ou seja, se a clivagem é um mecanismo homeostático para limitar a ação da proteína, ou se essa clivagem auxilia na resposta inflamatória. Estudos têm demonstrado a participação dos neutrófilos ativados na clivagem desta proteína. Smith et al (1990) descreveu a degradação de AnxA1 após a ativação de neutrófilos em lavado pulmonar humano como um mecanismo que permite que a inflamação ocorra para destruir o estímulo provocador da inflamação (Smith, Tetley et al. 1990). Tsao et al (1998) descreveu a degradação de Anexina A1 por elastase de neutrófilos no lavado broncoalveolar. Esta degradação remove 36 aminoácidos da porção N-terminal formando um produto inativo de 33 kDa que está relacionado com a inflamação pulmonar (Tsao, Meyer et al. 1998). Em 2007, Vong et al demonstraram que a clivagem da anexina A1 por neutrófilos ativados é dependente de proteinase 3, gerando o produto de 33kDa (Vong, D'Acquisto et al. 2007). Pederzoli-Reibeil et al 2010 sugeriram que a redução da clivagem de Anx A1 influencia na adesão de neutrófilos, destacando a ação anti-inflamatória da AnxA1 intacta de 37 kDa (Pederzoli-Ribeil, Maione et al. 2010). Williams et al (2010) sugerem que os dois diferentes fragmentos de AnxA1 possuem funções opostas na resposta inflamatória, sendo a porção C-terminal de 33kDa, pró-inflamatória.

Além dos efeitos anti-inflamatórios de AnxA1, já mencionados, esta proteína também possui papel pró-resolutivo, acelerando a apoptose de neutrófilos (Solito, Kamal et al. 2003) bem como a o engolfamento destas células por macrófagos (Maderna, Yona et al. 2005, Dalli, Jones et al. 2012). Vago et al

(2012), demonstraram que AnxA1 é mediadora da ativação de apoptose de neutrófilos em exudato pleural. O tratamento com o peptídeo Ac2-26 promoveu resolução neutrofílica através da ativação de caspase 3 e Bax e inibição de Mcl-1, ERK1/2 e NF- κ B (Vago, Nogueira et al. 2012).

Como já citado anteriormente, a gota é uma inflamação induzida por cristais de MSU que causa muita dor e desabilidade articular. A inflamação é autolimitada de modo que a resolução do ataque de gota ocorre em média em 10 dias. Porém, os mecanismos de resolução envolvidas nesta inflamação ainda precisam ser melhor investigados. Além disso, o papel de Anexina A1 neste contexto ainda não foi descrito.

2. Justificativa

Nosso grupo de pesquisa tem se dedicado ao estudo dos mecanismos envolvidos na resposta inflamatória. Entender esses mecanismos e desenvolver maneiras de modular a resposta inflamatória é de grande importância para o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos mais eficazes, que sejam mais acessíveis e não tragam riscos ao paciente.

A gota é uma das inflamações articulares mais prevalentes em países em desenvolvimento onde 1 a 4% da população, especialmente homens idosos, apresentam hiperuricemia (Gerber, Groneberg et al. 2013). Este grande número, está relacionado ao aumento da longevidade e alterações do estilo de vida. Mesmo com a existência de fármacos para o tratamento dos ataques de gota, a doença ainda representa um problema de saúde importante e o tratamento não é satisfatório em muitos casos (Mitroulis, Kambas et al. 2013).

A manifestação mais comum da gota são episódios de extrema dor aguda afetando uma ou mais articulações. Além disso, pacientes com gota frequentemente possuem outras comorbidades incluindo doença renal, síndrome metabólica, diabetes mellitus e hipertensão. Apesar de já se saber que o ácido úrico é o causador da gota, muitas questões ainda precisam ser solucionadas, tais como: Qual é o mecanismo exato de gatilho da inflamação induzida pelos cristais? Quais são os mediadores que dirigem esta resposta inflamatória e resolutiva? (Rock, Kataoka et al. 2013).

Amaral *et al* (2012) descreveram a importância do receptor CXCR2 para o influxo de neutrófilos na articulação de camundongos no modelo de gota e Bernhagen *et al* (2007) identificou este receptor como funcional para MIF. O presente trabalho pretendeu identificar o papel de MIF neste modelo.

Além disso, pretendemos investigar os mediadores importantes para a resolução da inflamação. Vago et al (2012) demonstraram AnxA1 como um mediador importante na resolução natural e induzida por glicocorticoides (Vago, Nogueira et al. 2012). No presente trabalho também se avaliou o papel de AnxA1 na resolução da inflamação induzida por cristais de MSU.

3. Objetivo Geral

Estudar os mecanismos envolvidos na inflamação articular e sua resolução em um modelo murino de gota: Investigar o papel de MIF na patogênese da gota, bem como o papel da proteína Anexina A1 na resolução dessa inflamação

3.6. Objetivos Específicos Desenvolvidos

3.6.1. Identificar a importância de MIF na inflamação articular induzida por MSU, utilizando os seguintes objetivos:

- a- Avaliar se MIF é capaz de promover recrutamento celular na cavidade intra-articular;
- b- Verificar se os cristais de ácido úrico são capazes de induzir aumento de MIF no tecido periarticular e aumento da expressão do receptor CD74
- c- Avaliar se o bloqueio de MIF diminui os parâmetros inflamatórios e nocicepção a partir do tratamento com um inibidor específico (ISO-1).
- d- Identificar mecanismo pelo qual MIF participa da resposta inflamatória induzida por cristal de MSU.
- e- Investigar a correlação entre MIF e IL-1 β em líquido sinovial humano.

3.1.2. Estudar o papel de Anexina A1 na resolução da inflamação induzida por MSU, utilizando os seguintes objetivos:

- a- Verificar a cinética de expressão da proteína AnxA1 em tecido sinovial;
- b- Investigar o papel de AnxA1 na resolução natural da inflamação, através da inibição do receptor FPR2 (utilizando o antagonista BOC-1) e da neutralização de AnxA1 (utilizando um anticorpo neutralizante).
- c- Avaliar o curso da resposta inflamatória em animais geneticamente deficientes em AnxA1 comparando aos animais não deficientes (WT).
- d- Avaliar se o pré-tratamento com o peptídeo mimético de AnxA1 (Ac2-26) modula o recrutamento de neutrófilos para cavidade articular e os níveis de IL1- β .
- e- Avaliar se o tratamento com Ac2-26 antecipa a resolução da inflamação através da mensuração dos índices de resolução, dos níveis de IL1- β e do score histológico da articulação.
- f- Investigar se a apoptose de neutrófilos é um mecanismo de resolução induzido pelo tratamento com o peptídeo Ac2-26.

4. Metodologia

4.6. Animais

Foram utilizados camundongos C57Bl/6 e Balb/c, tipo selvagem, machos ou fêmeas, com peso aproximado de 25 gramas, entre 8-10 semanas, fornecidos pelo Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO-ICB/UFMG). Foram utilizados ainda camundongos Balb/c machos deficientes em AnxA1 cedidos em colaboração pela Dra. Patricia M. R. Silva (Instituto Osvaldo Cruz, Rio de Janeiro). Todos os animais foram mantidos no ciclo claro-escuro de 10-12 horas, com livre acesso a água e ração. O presente estudo foi aprovado pelo comitê de ética em experimentação animal (CETEA) sob o protocolo de pesquisa número 165/2008 e 2/2015 (Anexos 1 e 2).

4.7. Fármacos e reagentes:

Cetamina (Vetbrands, Brasil), cloridrato de xilazina (Agener União, Brasil), albumina de soro bovino (BSA), o inibidor inespecífico do receptor FPR2 (BOC-1) e o ácido úrico foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St, Louis MO, USA). O inibidor amplo de caspase (zVAD-fmk) foi adquirido da Tocris Bioscience (Ellisville, MO, USA), o antagonista de MIF (ISO-1) da Calbiochem (San Diego, CA, USA) e MIF recombinante humano adquirido da Peprtech (país). Antagonista do receptor de IL-1 (IL1-RA) foi adquirido da Byogen. O peptídeo Ac2-26, derivado sintético correspondente aos aminoácidos da região N-terminal de AnxA1 (AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTVK) foi sintetizado por Synpeptide Co. Ltd.(Shangai, China). O anticorpo neutralizante anti-anexina A1 (Anti-AnxA1) foi cedido pelo National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC) (Blanche Lane, Potters Bar Hertfordshire EN6 3QG, UK).

4.8. Modelo de Gota:

4.8.1. Precipitação de Cristais de Ácido Úrico

Foram adicionados 1,68 g de ácido úrico em 500 mL de hidróxido de sódio (NaOH 0,01 M). A solução permaneceu em agitação a 70 °C e foi adicionado NaOH (1 M) para manter a solução com o pH entre 7,1 e 7,2. Uma vez dissolvida, a solução foi filtrada em filtro de 0,45 µm em capela de fluxo laminar, para manter a solução estéril. A solução foi deixada em temperatura ambiente por 7 dias para a precipitação dos cristais de ácido úrico, quando foi então centrifugada (10.000 rpm, 10 minutos) e o sobrenadante descartado. Duas lavagens do precipitado com álcool absoluto foram realizadas. Além disso, a solução foi submetida ao processo de sonicação ainda em álcool para diminuir o tamanho dos cristais e posteriormente foi deixada secando em temperatura ambiente em condições estéreis. Uma vez secos, os cristais foram ressuspensos em quantidade de tampão fosfato (PBS) necessária para obter uma solução na concentração desejada.

4.8.2. Indução da gota

Os cristais de ácido úrico obtidos foram diluídos em PBS para a injeção intra-articular tíbio-femural de 10 µL contendo 100 µg do cristal. A articulação contralateral foi utilizada como controle (injeção de veículo – PBS). Os camundongos foram anestesiados com uma mistura de cetamina 80 mg/kg e xilazina 15 mg/kg diluídos em PBS 1X para a realização da injeção.

4.9. Protocolos experimentais

4.9.1. Inflamação articular induzida por injeção de MIF recombinante

Camundongos C57Bl/6 foram anestesiados e submetidos à injeção intra-articular tíbio-femural de 10 µL de MIF recombinante (100 ng/cavidade). A articulação contralateral foi utilizada como controle (injeção de veículo – PBS). Os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical nos tempos descritos nos resultados.

4.9.2. Tratamentos realizados no modelo de gota:

ISO-1 (antagonista de MIF): Camundongos C57Bl/6 foram anestesiados e submetidos à injeção intra-articular tíbio-femural de 10 μ L de ISO-1 (50 μ g/cavidade) diluído em tampão fosfato (PBS 1x) 10 minutos antes do desafio intra-articular com 10 μ L de cristais de ácido úrico (100 μ g/cavidade). Os camundongos controle receberam apenas veículo.

IL1-RA (antagonista do receptor de IL-1 β): Camundongos C57Bl/6 foram submetidos a uma injeção intraperitoneal (200 μ L) do inibidor do receptor de IL-1 (IL1-RA – 5 mg/Kg) diluído em tampão fosfato (PBS) 40 minutos antes do desafio intra-articular com 10 μ L de cristais de ácido úrico (100 μ g/cavidade) (Amaral, Costa et al. 2012). Os camundongos controle receberam apenas veículo.

BOC-1 (antagonista de FPR2): Camundongos C57Bl/6 foram submetidos a uma injeção intraperitoneal (200 μ L) do antagonista do receptor FPR2 (BOC-1, 5 mg/kg) (Souza, Fagundes et al. 2007) 6 e 12 horas após desafio intra-articular com 10 μ L de cristais de ácido úrico (100 μ g/cavidade). Os camundongos controle receberam apenas veículo.

Anticorpo neutralizante anti-AnxA1: Investigamos se a inibição de AnxA1 reverte a resolução inflamatória natural. Para atingirmos este objetivo utilizamos um anticorpo anti-AnxA1 produzido em ovelha. O anticorpo neutralizante anti-AnxA1 foi diluído na proporção 1:1 em PBS e administrado 200 μ L via intraperitoneal (Vago, Nogueira et al. 2012, Vago, Tavares et al. 2015) 1 hora antes do desafio intra-articular com 10 μ L de cristais de ácido úrico (100 μ g/cavidade). Um tratamento de reforço foi dado 6 h após o desafio. Os camundongos controle receberam apenas veículo.

Peptídeo Ac2-26: Camundongos C57Bl/6 foram submetidos a uma injeção intraperitoneal (200 μ L) do Peptídeo Ac2-26 (150 μ g/animal) (Souza, Fagundes et al. 2007, Vago, Nogueira et al. 2012) que contém a porção ativa N-terminal da AnxA1 1 hora antes do desafio intra-articular com 10 μ L de cristais de ácido úrico (100 μ g/cavidade) e 12 horas após o desafio. Os camundongos controle receberam apenas veículo.

zVAD-fmk (inibidor amplo de caspases): O tratamento com o pan-inibidor de caspases zVAD-fmk foi realizado 15 minutos antes da administração de peptídeo Ac2-26 como descrito (Sousa, Lopes et al. 2010, Vago, Nogueira et al. 2012,

Vago, Tavares et al. 2015) . O zVAD-fmk foi diluído em 2 % de DMSO e PBS estéril e administrado 1 mg/kg, via intraperitoneal. Os camundogos controle receberam apenas veículo.

4.10. Parâmetros inflamatórios avaliados:

4.10.1. Avaliação da migração de neutrófilos para a cavidade articular

Após o desafio com MSU, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical nos tempos descritos. Para avaliar a migração de leucócitos (neutrófilos) para a cavidade articular, foi realizado um lavado intra-articular. Este procedimento consistiu em lavar por duas vezes com 5 μ L a cavidade articular utilizando uma solução de albumina bovina 3 % diluída em PBS, lavando-a três vezes para que uma amostra das células presentes no interior da cavidade fosse coletada juntamente com a solução de albumina recapturada com uma pipeta. Este lavado de células da articulação foi diluído em 90 μ L de albumina bovina 3 % para a posterior contagem total e diferencial dos leucócitos.

4.10.2. Contagem total dos leucócitos

Alíquotas de 20 μ L do lavado articular foram diluídas em 20 μ L de solução Turk (IMBRALAB®), sendo a contagem total dos leucócitos realizada em câmara de Neubauer, com o auxílio de microscópio óptico (aumento de 100x) e contador manual. O número total de leucócitos foi utilizado para cálculo da percentagem dos diferentes leucócitos encontrados no lavado articular a partir da contagem/discriminação por visualização de lâminas preparadas por citocentrifugação utilizando o microscópio óptico.

4.10.3. Contagem diferencial dos leucócitos

As lâminas para contagem diferencial foram preparadas por citocentrifugação de uma alíquota de 80 μ L do lavado articular (citospin;

Shandon Lipshaw Inc., Pittsburgh, Pennsylvania, USA). As lâminas foram coradas utilizando o Kit panótico rápido (LB Laborclin®) e examinadas sob microscópio óptico, objetiva de imersão em óleo (aumento de 1.000x), utilizando os critérios morfológicos padrões para diferenciar os tipos celulares. Foi feita uma análise da porcentagem de neutrófilos de cada amostra e os resultados foram expressos como número de neutrófilos $\times 10^4$ / cavidade articular, baseando-se na contagem total de leucócitos.

4.10.4. Processamento Tecidual para dosagem de citocinas

Resumidamente, o tecido periarticular removido foi pesado e processado com o homogeneizador de tecidos (ultra-turrax) com solução de extração de citocinas (NaCl 0,4M, NaPO₄ 10 mM, PMSF 0,1 mM, Cloreto de Benzetônio 0,1 mM, EDTA 10 mM, Tween 20 0,05%, 0,5% de BSA, 20 KI de Aprotinina) na proporção de 1mL por 100mg de tecido. Após homogeneização e centrifugação (10.000rpm 10 minutos a 4°C), o sobrenadante foi coletado e estocado para quantificação de citocinas.

4.10.4.1. Dosagem de Citocinas: Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

A dosagem de citocinas foi feita pelo método de ELISA através do kit R&D system. Foi adicionado anticorpo de captura de interesse diluído em PBS a placa de 96 poços. Essa placa foi incubada a 4°C por 12 a 18 horas. O conteúdo foi retirado e os poços lavados 4 vezes (300 μ L/mL) com o tampão de lavagem (PBS/Tween 0,5 %) utilizando um lavador de placas (Bio-Tek Instruments, INC). Foi adicionado 200 μ L/poço de tampão de bloqueio (PBS/BSA 1 %) e a placa foi incubada por 2 horas a temperatura ambiente. O conteúdo foi retirado e os poços lavados 4 vezes (300 μ L/mL) com o tampão de lavagem (PBS/Tween 0,5 %) utilizando um lavador de placas. Foi adicionado 100 μ L/poço dos padrões e amostras à placa. A placa foi incubada por 2 horas e mantida temperatura ambiente. O conteúdo foi retirado e os poços lavados 4 vezes (300 μ L/mL) com o tampão de lavagem (PBS/Tween 0,5 %) utilizando um lavador de placas. Foram adicionados 100 μ L/poço de anticorpo de detecção e a placa foi incubada

por 2 horas a temperatura ambiente. O conteúdo foi retirado e a placa lavada 4 vezes com tampão de lavagem. Foram adicionados 100 μL /poço de estreptavidina – HPR 1:200 à placa que foi incubada por 20 a 30 minutos a temperatura ambiente ao abrigo da luz. O conteúdo foi retirado e a placa lavada 4 vezes com tampão de lavagem. Foram adicionados 100 μL /poço do substrato OPD (o-phenylenediamine dihydrochloride - Sigma) com 0.006% peróxido de hidrogênio (Grupo Química) à placa que foi incubada por 20 a 30 minutos a temperatura ambiente ao abrigo da luz. Para parar a reação, foram adicionados 50 μL /poço de solução de H_2SO_4 1 M. A leitura foi realizada em leitor de ELISA em densidade ótica de 490 nm.

4.10.5. Avaliação de hipernocicepção - teste de pressão crescente na pata de camundongo

Os experimentos foram realizados utilizando o teste de pressão com um anestesiômetro eletrônico (Insight Equipamentos, São Paulo, Brazil), que consiste em um transdutor de pressão conectado a um contador digital de força (g). Este método também é conhecido como Von Frey eletrônico (Moller, Johansson et al. 1998). O contato do transdutor de pressão à pata é realizado através de uma ponteira descartável de polipropileno com 0,5 ou 4,15 mm^2 de diâmetro que é adaptada a ele. Os animais são alocados em caixas de acrílico, medindo 12 x 10 x 17 cm cujo assoalho é uma rede de malha igual a 5 mm^2 constituída de arame não maleável de 1 mm de espessura, durante 15 minutos antes do experimento para adaptação ao ambiente. Espelhos são posicionados 25 cm abaixo das caixas de experimentação para facilitar a visualização da região plantar das patas dos animais. O experimentador deve aplicar, por entre as malhas da rede, uma pressão linearmente crescente no centro da planta da pata do camundongo até que o animal produza uma resposta caracterizada como sacudida (“flinch”) da pata estimulada. Os estímulos são repetidos por até seis vezes, em geral até o animal apresentar 3 medidas similares com uma clara resposta de “flinch” após a retirada da pata. Os testes nociceptivos foram realizados entre 08:00 e 16:00 h.

A

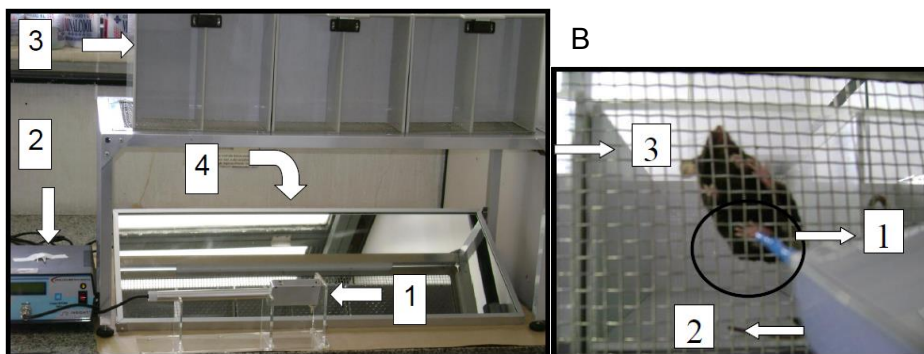


Figura 9. Foto do equipamento utilizado no teste de pressão crescente na pata de camundongo.

A foto apresenta o anestesiômetro eletrônico (Insight Equipamentos, São paulo, Brazil), constituído por transdutor de pressão (1) conectado a um contador digital de força (2), as caixas de acrílico (12 x 10 x 17 cm de altura) (Hamburger, Baraf et al.) e os espelhos inclinados (4), abaixo do assoalho que forneceu uma vista desobstruída das patas traseiras dos animais, utilizados no teste de pressão crescente no joelho de camundongos (A). Foto no momento do teste de pressão crescente na pata de camundongo. A foto apresenta a ponteira de polipropileno (1) acoplada ao transdutor de força (2) em contato com a pata do animal (círculo). O experimentador deve aplicar, por entre as malhas da rede do assoalho (Hamburger, Baraf et al.), uma pressão linearmente crescente no centro da planta da pata até que o animal produza uma resposta caracterizada como “sacudida” (“flinch”) (B).

4.10.6. Análise por *Western blot*

Ao tecido sinovial e periarticular do joelho de camundongos desafiados com MSU ou PBS, foram adicionados 500 a 1000 μ l uma solução de lise (Triton X-100 0,5 %; Tris/HCl 100 mM, pH 8.0; glicerol 10 %; EDTA 0,2 mM; NaCl 200 mM; DTT 1 mM; PMSF 1 mM, NaF 25 mM; leupeptina 2,5 μ g/mL; aprotinina 5 μ g/mL e ortovanadato de sódio 1 mM), sendo o tecido macerado com auxílio de homogeneizador de tecido e deixado em banho de gelo por 15 minutos. Posteriormente, o lisado foi centrifugado a 3.000 rpm por 10 minutos a 4° C, sendo o sobrenadante coletado e armazenado à -20 °C até o momento de uso. A concentração das proteínas totais foi determinada por espectrofotometria utilizando o “Kit Bio-Rad Assay” (Bio-Rad Laboratories USA), por método de Bradford. Amostras contendo entre 20 e 60 μ g de proteínas totais foram fracionadas em gel de poliacrilamida/SDS (PAGE) de 10 a 15 % a 100 V por 1,5

horas e transferidas para membrana de nitrocelulose (GE Healthcare, Piscataway, NJ), conforme protocolo do “Kit Bio-Rad Transferencey” (Bio-Rad Laboratories, USA). Após transferência, as membranas foram coradas com “solução de Ponceau (IMBRALAB®)” para visualização da eficiência da mesma, além da informação previa sobre a equivalência das quantidades de proteínas aplicadas nas diferentes canaletas. As membranas foram bloqueadas por 1 hora à temperatura ambiente, utilizando-se PBS contendo 0,1 % de Tween-20 e 5 % de leite em pó desnatado.

As membranas foram primeiramente lavadas por três vezes em PBS contendo 0,1 % de Tween-20, e, posteriormente, incubadas com o anti-AnxA1 (Invitrogen) à 4 °C por 18-20 horas em solução de PBS/Tween contendo 5 % de BSA. As membranas foram lavadas novamente em PBS/Tween por três vezes e incubadas durante 1 hora à temperatura ambiente com o anticorpo secundário ligado à peroxidase (Santa Cruz Biotechnology) na diluição de 1:3000 em solução PBS/Tween contendo 5 % de BSA. Após nova sessão de lavagens (3 vezes em PBS/Tween), as membranas foram incubadas em solução reveladora “ECL-Plus” (GE Healthcare, Piscataway, NJ), expostas contra filme de raio X em intervalos de 10 segundos a 10 minutos (Hyperfilm ECL, Amersham, Pharmacia), e revelados utilizando-se revelador e fixador (Kodak), de acordo com indicações do fabricante. Como controle interno da quantidade de extratos protéicos aplicados às diferentes canaletas foi realizado o *immunoblot* das membranas com o anticorpo anti- β -actina (Sigma Aldrich).

4.10.7. qPCR – Reação da cadeia de polimerase por transcrição reversa quantitativa

4.10.7.1. Extração do RNA

As amostras (pool de no mínimo 2 sinóvias), foram homogeneizadas em 1 mL de TRIZOL (GIBCO/BLR Laboratories, Grand Island, N.Y., EUA) utilizando-se um homogeneizador elétrico. As amostras homogeneizadas foram incubadas por 5 a 10 minutos a temperatura ambiente para permitir a completa dissociação de complexos nucleoprotéicos. Em seguida, foram adicionados 200 μ L de clorofórmio de alta qualidade para cada 1 mL de TRIZOL. Foi realizada agitação

em *vortex* e depois incubação por 3 minutos a temperatura ambiente. O homogenato foi centrifugado a 10.000 rpm por 15 minutos a 4 °C. Após a centrifugação, a mistura ficou separada em uma fase inferior (rosa), contendo fenol-clorofórmio, uma fase intermediária e uma fase aquosa transparente superior. O RNA permaneceu exclusivamente na fase aquosa que foi transferida para um microtubo novo. O RNA foi precipitado com isopropanol (MERCK) de altíssima qualidade (500 µL de isopropanol para cada 1 ml de TRIZOL). As amostras foram incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente e então centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos a 4 °C e foi formado um pellet branco. Após descarte do sobrenadante, foi adicionado 500 µL de etanol 75 % (diluído em água Mili-Q) para 1 mL de TRIZOL. O tubo foi agitado no *vortex* para que o pellet se solte do fundo. Então, foi realizada nova centrifugação a 10.000 rpm por 5 minutos a 4 °C. Após descarte do sobrenadante, o tubo foi deixado aberto por 5 minutos para secagem do *pellet* que foi, em seguida, diluído em água Mili Q em volume suficiente para diluir toda a amostra. O RNA foi estocado a -70 °C.

4.10.7.2. Quantificação do RNA

A quantificação das amostras de RNA foi feita no espectrofotômetro NanoDrop ND1000 (Nano Drop Technologies, Wilmington, DE, EUA). Primeiramente, foi feita a calibração do aparelho com água Mili-Q e, em seguida, foi selecionada a opção de leitura de RNA já definida no aparelho. A leitura do branco também foi feita com água Mili-Q. O RNA foi quantificado pela absorção a 260 nm e utilizando a razão (260/280) os valores encontrados devem estar entre 1,8 de 2 para uma pureza adequada do RNA.

4.10.7.3. Preparo do cDNA por Transcrição Reversa

A reação de transcrição reversa do mRNA obtido dos tecidos dos animais foi realizada utilizando-se 2 µg de RNA aos quais foi adicionado 50 µM do primer Oligo dT (15) (Promega Cor., Madison WI, EUA). Foi feita uma incubação por 5 minutos a 70 °C e em seguida por 5 minutos no gelo para permitir a separação das fitas de RNA e o anelamento do *primer* e para impedir a formação de

artefatos inespecíficos, respectivamente. Em seguida, foi adicionada uma mistura de reagentes em um volume de 14,5 µL contendo 1,5 µL de dNTPs a 100 mM (Promega Cor., Madison, WI, EUA), 4 µL tampão MMLV 5X (Promega Cor., Madison WI, EUA) e 200 U da enzima Transcriptase reversa MMLV (Promega Cor., Madison WI, EUA) e 8,5 µL de água Milli-Q autoclavada. A mistura foi incubada por 2 horas a 42 °C quando ocorrerá a transcrição reversa do mRNA. As amostras de cDNA foram conservadas a -70 °C.

4.10.7.4. PCR específica

Para as reações subseqüentes de amplificação, 2 µL da amostra de cDNA foram utilizadas. A PCR foi realizada em um volume final de 10 µL contendo 8 µL de um mix de 5 µL Power SYBR Green PCR Master Mix 2X (Applied biosystems, Foster City, CA, EUA), 1 µL de primer senso e anti-senso a 5 µM e 1 µL de água Milli-Q. A reação foi realizada utilizando-se o protocolo para PCR com SYBR Green do termociclador Step One PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Em resumo, foi feita uma incubação inicial de 1 minuto a 95 °C e, em seguida, 15 segundos a 95 °C para desnaturação, 1 minuto para anelamento e extensão a 60 °C. Esses dois últimos passos foram repetidos 40 vezes e depois foi feita a curva de *melting*: 95 °C por 15 segundos, 60 °C por 1 minuto e uma rampa de subida lenta de temperatura até 95 °C. Os resultados foram obtidos com auxílio do software Step One PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Os dados foram analisados utilizando a fórmula: $2^{-\Delta\Delta Ct}$ onde: $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct -$ o valor de calibração encontrado através da subtração das médias do Ct do grupo control e $\Delta Ct = Ct$ do gene alvo – Ct do gene constitutivo (GAPDH). As sequências dos iniciadores utilizados foram as seguintes:

- IL1B: primer senso- 5'- CTA CAG GCT CCG AGA TGA ACA AC -3', primer anti-senso- 5'- TCC ATT GAG GTG GAG AGC TTT C -3',
- GAPDH: senso 5'- ACG GCC GCA TCT TCT TGT GCA -3', anti-senso 5'- CGG CCA AAT CCG TTC ACA CCG A -3'.

4.10.8. Extração de macrófagos derivados de medula óssea (BMDM) e cultura celular.

Os camundongos C57/Bl6 foram eutanasiados por deslocamento cervical. Um corte na pele do abdome foi feito e a pele retirada da cintura para baixo (como uma “calça”). Os músculos da perna mantendo o fêmur e a tíbia intactos foram cortados e os ossos do fêmur foram separados dos da tíbia. Os ossos foram bem limpos principalmente na parte da epífise e colocados na placa de Petri, devidamente identificada e sobre o gelo.

Após a retirada de todos os ossos as epífises foram cortadas (sem quebrar os ossos). Com a agulha acoplada à seringa, foi inserido 5 mL de PBS 1X em cada osso, pelas 2 extremidades, fazendo leve e simultânea fricção. O PBS que passa pelo osso é coletado em um tubo de 50 mL (Falcon), fazendo assim um pool de células.

Esta solução foi centrifugada a 1200 rpm 10 minutos a 4 °C e ressuspensa com o meio DMEM completo (~2 mL por animal, dependendo do tamanho do *pellet*). Esta suspensão foi passada pelo *cell strainer* antes de transferir para a garrafa média de cultura celular (já contendo 12 mL de meio). Nesta etapa a garrafa continha 14-16 mL de meio e foi então incubada por 3 horas a 37 °C em estufa CO₂.

O sobrenadante foi coletado (as células aderidas foram descartadas) em tubos de 50 mL (Falcons). Foram adicionados 5 mL PBS 1X por cima da garrafa de cultura celular para lavar e este lavado foi transferido para um tubo de 50 mL (Falcon). Este processo foi repetido e posteriormente essa suspensão de células foi centrifugada a 1200 rpm 10 min a 4 °C. Sobre o *pellet* foram adicionados 1-2 mL de DMEM para contagem celular em câmara de Neubauer. As células foram ressuspensas em DMEM completo na densidade de 5×10^5 /poço e distribuídas em placas de 24 poços, (1 mL/ poço). Esse foi o dia 0. No dia 4, foram adicionados 100 uL de meio condicionado de células L-929, (LCCM) como fonte do fator de estimulação de colônias de granulócitos/macrófagos, por poço. No dia 7, o meio foi trocado por 1 mL/poço de DMEM completo. No dia 10, os macrófagos já estavam prontos para a estimulação. O meio com LCCM foi retirado e as células foram submetidas ao protocolo experimental. As células foram estimuladas com 1 µg/mL de LPS e 200 ng/mL de rMIF por 1 hora e foram coletadas para PCR quantitativo para IL-1β. As células foram mantidas em estufa de CO₂ a 37 °C.

4.10.9. Cálculo dos índices de resolução

Os índices de resolução foram quantificados como descrito previamente (Bannenberg, Chiang et al. 2005, Chiang, Shinohara et al. 2013, Vago, Tavares et al. 2015). Os animais foram desafiados com 100 µg de MSU na cavidade articular e 12 horas depois do desafio (pico da inflamação) os animais foram tratados com peptídeo mimético da Anxa1, Ac2-26. Foi realizado um lavado articular 12, 18, 24 e 36 horas após o desafio e 6, 12 e 24h após o tratamento com Ac2-26. O número de neutrófilos polimorfonuclear (PMN) foi determinado por contagem total e diferencial de leucócitos. A resolução da inflamação aguda foi definida em termos quantitativos pelos seguintes índices de resolução: 1) magnitude (ψ_{max} e T_{max}), ψ_{max} (PMN máximo), T_{max} (tempo em que o número de PMN atingem a quantidade máxima); 2) duração (T_{50}), T_{50} (tempo em que o número de PMN reduzem 50 % do valor máximo) e 3) Ri intervalo de resolução (o intervalo entre o T_{max} e T_{50} , quando 50 % de PMN estão reduzidos na cavidade articular).

4.10.10. Análise da apoptose de leucócitos

A apoptose dos leucócitos presentes no lavado articular dos animais desafiados com MSU, com ou sem os tratamentos, foi avaliada morfológicamente (Pinho, Russo et al. 2007, Sousa, Lopes et al. 2010, Vago, Nogueira et al. 2012). As células recuperadas da cavidade articular foram cito-centrifugadas, fixadas e coradas com Kit panótico rápido (LB Laborclin®) e contadas (500 células por lâmina) utilizando microscópio ótico para determinar a porcentagem de células com morfologia apoptótica.

As células apoptóticas foram identificadas por alterações morfológicas características como, condensação da cromatina, fragmentação nuclear e formação de corpos apoptóticos.

4.10.11. Análise histológica

Após a eutanásia dos animais pós-tratados com Ac2-26 ou veículo (desafiados com cristais de MSU), o joelho foi coletado e acondicionado em cassetes para histologia que permaneceram por 48 horas em solução de formol tamponado 10 %. Em seguida os cassetes foram transferidos para solução de EDTA (ácido etilenodiaminotetraacético) 14 % para descalcificação óssea por 30 dias. Neste período foi feita a troca da solução de EDTA a cada 48 horas. O processamento foi realizado no Laboratório de Patologia Experimental da Faculdade de Odontologia da UFMG onde o tecido foi submetido a passagens subsequentes em etanol em diferentes concentrações (80 %, 90 %, absoluto 1 e 2 – 30 minutos cada), xilol (1 e 2 – 20 a 30 minutos cada) e incluído em parafina. As amostras foram incluídas em parafina, cortadas em micrótomo e fixadas em lâminas histológicas. Em seguida, os cortes foram corados com Hematoxilina e Eosina. As análises das lâminas foram realizadas por patologista experiente que desconhecia os grupos experimentais, em microscópio óptico com aumento de 40 e 400 vezes para avaliação dos parâmetros inflamatório através de um score articular. O *score* articular foi estabelecido a partir de uma adaptação do *score* de artrite induzida por mBSA, descrito previamente por Queiroz-Junior 2011 (Queiroz-Junior, Madeira et al. 2011). Para refletir melhor o grau de inflamação e as alterações histopatológicas observadas no tecido o score utilizou os seguintes critérios: intensidade de infiltrado inflamatório (0-3); hiperplasia da membrana sinovial (0-2); hiperemia vascular (0-1), presença de células inflamatórias no espaço articular (0-1) e alteração da arquitetura tecidual (0-1). Esses critérios totalizam um score de 8 pontos. Os campos de imagens representativas de cada grupo foram capturados e fotografados por meio de uma câmera acoplada a um microscópio.

4.11. Coleta e análise de líquido sinovial humano

Fluido sinovial foi obtido de 12 pacientes diagnosticados com gota através da identificação de cristal de ácido úrico no líquido sinovial e 8 pacientes diagnosticado com osteoartrite, nível III. A definição da população de pacientes é mostrada na Figura 14C. O líquido sinovial foi colhido usando uma seringa estéril injetada na articulação do joelho através de uma técnica padronizada de portal anterolateral, evitando estritamente a hemartrose. O líquido sinovial foi

coletado em tubo contendo heparina para evitar a coagulação e as contagens celulares foram realizadas no prazo de 24 horas após aspiração e uma alíquota de 500 μ L foi centrifugada a 400 g durante 5 minutos, os sobrenadantes recolhidos e imediatamente armazenados a -70° C até ser usado para as medições de MIF e IL-1 β . Todos os pacientes forneceram consentimento para participação do estudo que foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital Universitário de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Brasil (protocolo nº4971/2012).

4.12. Análises estatísticas

A análise estatística foi realizada com o software Prisma. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. A análise da diferença entre dois grupos foi realizada pelo teste t-student. A análise da diferença entre dois ou mais grupos quando as amostras obedeciam a distribuição normal foi realizado ANOVA seguida do pós-teste Student-Newman-Keuls e quando as amostras não obedeciam a distribuição normal foi realizado o teste não paramétrico Kruskal-Wallis seguido de pós-teste Dunns. Para correlação de amostra com distribuição normal foi realizada a correlação de Pearson. A significância estatística foi estabelecida em $p < 0,05$.

5. Resultados

Resultados do objetivo 1: Identificar a importância de MIF na inflamação articular:

5.6. MIF induz recrutamento de neutrófilos

Como já descrito na literatura, MIF age como uma citocina pró-inflamatória (Calandra and Roger 2003). Sendo assim, animais C57/Bl6 selvagens foram desafiados com uma injeção intra-articular de MIF recombinante humano (100 ng/cavidade) na articulação tíbio-femural como descrito na metodologia. A dose de 100 ng/cavidade foi escolhida após uma dose resposta de hipernocicepção induzida por injeção de rMIF na pata. A menor dose na qual causou maior hipernocicepção foi a de 100 ng (dado não mostrado). O MIF recombinante foi capaz de reproduzir a inflamação observada no modelo de gota caracterizada por um recrutamento de leucócitos para a cavidade articular (Figura 10A), nos quais eram constituídos principalmente de neutrófilos (Figura 10B). Esse recrutamento foi observado 6 e 15 horas após o desafio, com o maior valor observado no tempo de 15 h. Além disso, este recrutamento está associado a um aumento dos níveis da citocina IL-1 β e da quimiocina CXCL1 na cavidade articular e no tecido periarticular nos mesmos tempos observados, porém em maior quantidade no tempo de 6 horas (Figuras 10C-F).

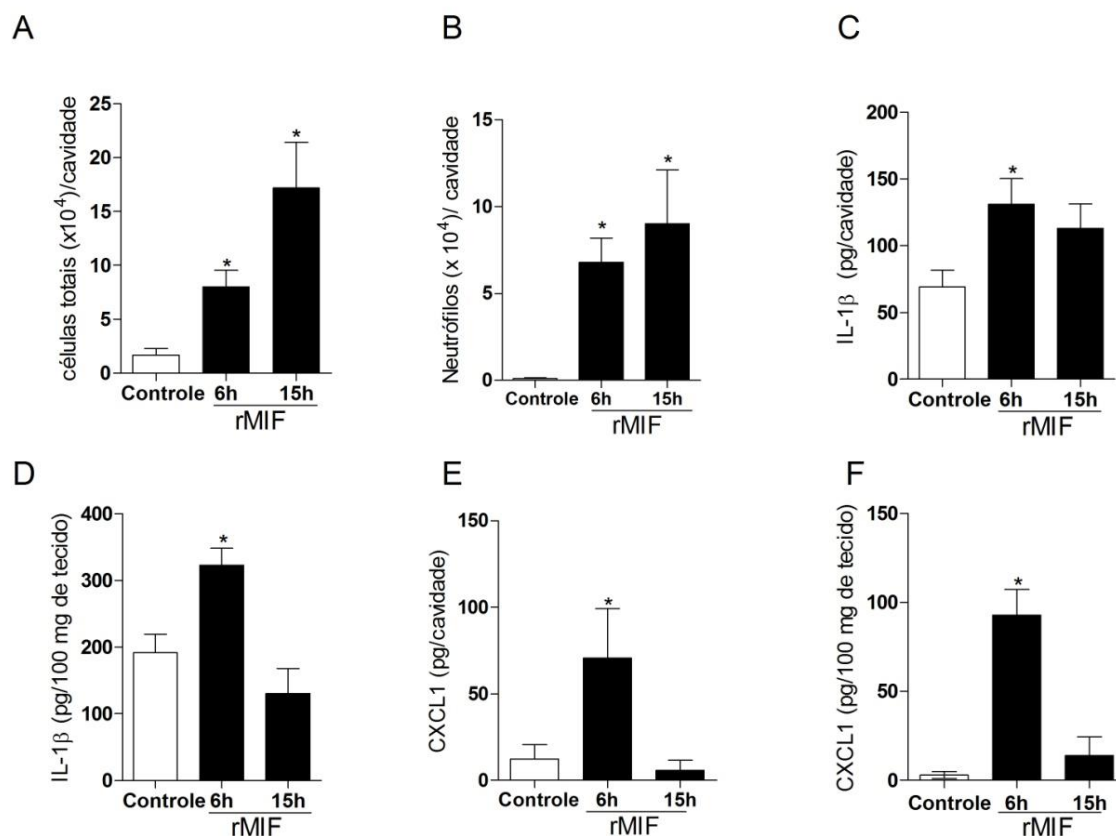


Figura 10. MIF recombinante (rMIF) induz recrutamento de neutrófilos e produção de citocinas in vivo.

Injeção intraarticular de MIF recombinante humano (100 ng/cavidade) induziu o recrutamento celular (A), especialmente de neutrófilos (B), para a cavidade articular nos tempos de 6 e 15 horas após injeção. Além disso, a citocina IL-1 β e a quimiocina CXCL1 foram produzidas na cavidade articular (C e E respectivamente) e no tecido periarticular (D e F respectivamente) após injeção de rMIF. As barras representam a média \pm desvio padrão de 5 camundongos por grupo. (*) para $p < 0,05$ quando comparado a média do grupo controle e (#) para $p < 0,05$ comparado com o grupo veículo (gota não tratado) (Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste Dunns e ANOVA seguida pelo pós-teste Student-Newman-Keuls).

5.7. MIF contribui para a resposta inflamatória induzida por cristais de MSU

Já foi descrito que cristais de ácido úrico são capazes de promover o recrutamento de neutrófilos e esse recrutamento é dependente do receptor CXCR2 (Amaral, Costa et al. 2012). Outro conceito já estabelecido é que MIF é capaz de se ligar a esse receptor e promover também o recrutamento de leucócitos (Bernhagen, Krohn et al. 2007). Sabendo disso, animais C57/Bl6

selvagens foram desafiados com uma injeção intra-articular de cristais de ácido úrico (MSU – 100 µg/cavidade). A sinóvia e tecido periarticular foram coletados em diferentes tempos para observar se cristais de MSU seriam capazes de induzir a secreção de MIF. Como mostrado na Figura 11A, a injeção de MSU promove aumento de MIF na primeira e terceiras horas, voltando aos níveis basais a partir da sexta hora.

Para saber se MIF seria importante na indução da inflamação induzida por cristais de ácido úrico no modelo de gota, animais C57/Bl6 foram pré-tratados com uma injeção intra-articular de um inibidor de MIF (ISO-1 – 50 µg/ cavidade) 10 minutos antes do desafio com uma injeção intra-articular de cristais de ácido úrico (MSU – 100 µg/cavidade). Amaral *et al*, (2012) já haviam demonstrado que o influxo de neutrófilos no modelo de gota se inicia com 3 horas e persiste até 15 horas após o desafio articular com MSU, onde é observado o pico de recrutamento. Foi observado na Figura 10 que o bloqueio de MIF promove diminuição dos parâmetros inflamatórios analisados. Durante o pico da inflamação (15 horas) animais pré-tratados com o inibidor de MIF (ISO-1) apresentaram diminuição no recrutamento de leucócitos, especialmente de neutrófilos, que são as células marcadoras do processo inflamatório na gota contribuindo para a patogênese da doença (Figuras 11B, C). Além disso, houve uma diminuição da citocina IL-1β na cavidade articular e no tecido periarticular (Figuras 11D, E). Assim como os neutrófilos, a citocina IL-1β também possui papel importante na patogênese da doença por ser a citocina pró-inflamatória chave na gota (Steiger and Harper 2013). Esses resultados reforçam a ideia de que o bloqueio de MIF reduz os padrões inflamatórios característicos da gota. Os níveis da citocina CXCL1 não apresentaram alteração significativa com o pré-tratamento com ISO-1 na cavidade articular e no tecido periarticular (Figuras 11F, G). Foi observado ainda que animais pré-tratados com ISO-1 apresentaram maior limiar de retirada da pata após o estímulo mecânico (Von Frey eletrônico) representando assim, uma diminuição de hipernocicepção (Figura 11H).

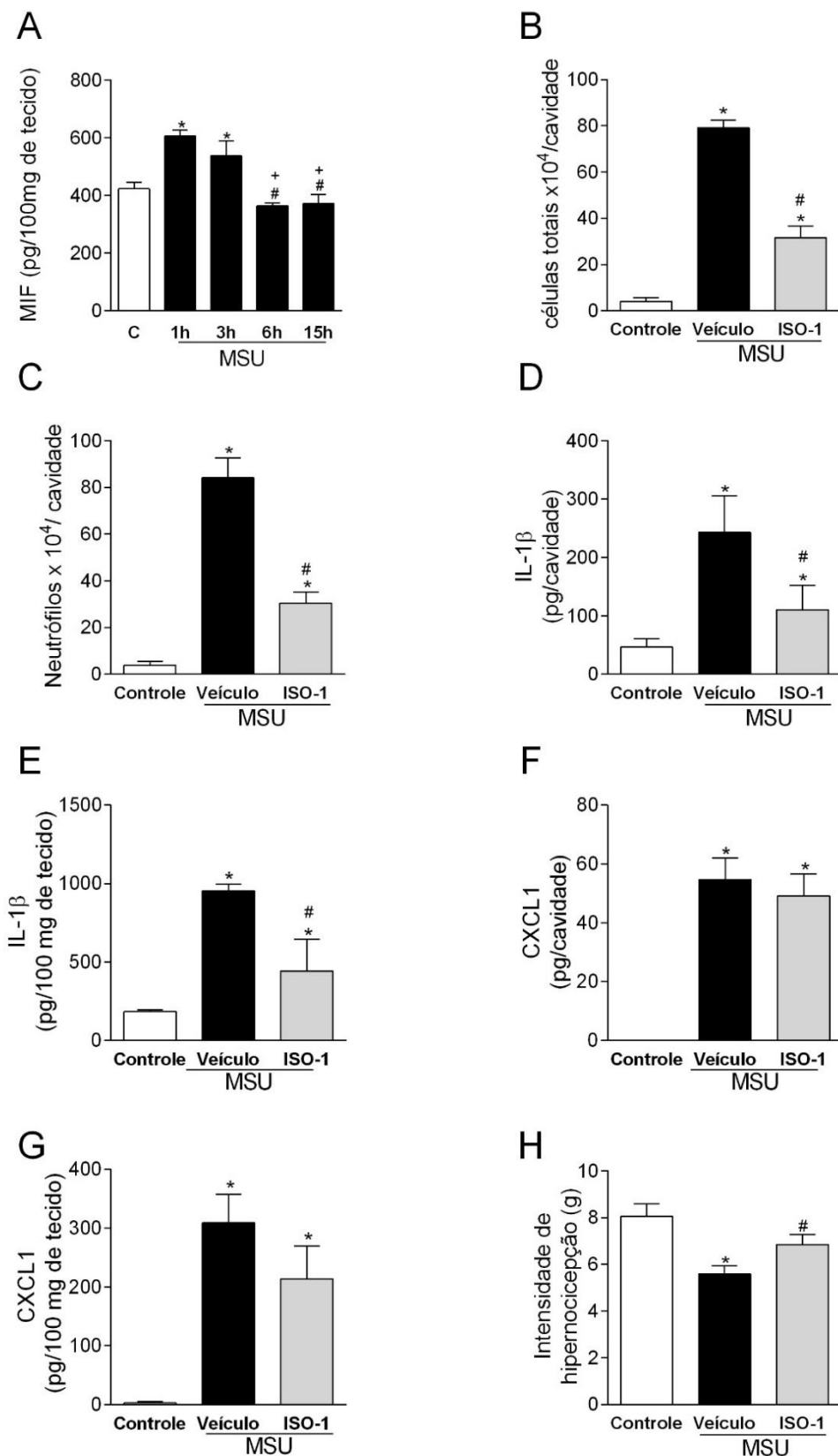


Figura 11. MIF participa da resposta inflamatória induzida por MSU.

MSU é capaz de induzir MIF no tecido periarticular (ELISA)(A). Animais pré-tratados com o inibidor de MIF (ISO-1 - 50 μ g/cavidade) 10 minutos antes do desafio com 100 μ g

de MSU reduziu todos os parâmetros inflamatórios avaliados. O inibidor ISO-1 reduziu recrutamento celular (B), especialmente de neutrófilos (C). Além disso, o inibidor reduziu a citocina IL-1 β na cavidade articular (D) e no tecido periarticular (E) e não foi observado diferença nos níveis de CXCL1 na cavidade articular (F) e no tecido periarticular (G). O pré-tratamento aumentou o limiar de retirada da pata (H). As barras representam a média \pm desvio padrão de 5 camundongos por grupo. (A) - (*) para $p < 0,05$ quando comparado à média do grupo controle, (#) para $p < 0,05$ quando comparado à média do grupo 1 hora (A), (+) $p < 0,05$ quando comparado a média do grupo 3 horas; (B,C,D,E,F,G e H) - (*) para $p < 0,05$ quando comparado à média do grupo controle e (#) para $p < 0,05$ comparado com o grupo veículo (gota não tratado) (ANOVA seguida pelo pós-teste Student-Newman-Keuls).

A partir dos resultados apresentados na Figura 11, foi avaliado se um tratamento com ISO-1 após o início da resposta inflamatória induzida pela injeção de MSU, seria eficaz na redução dos parâmetros inflamatórios avaliados. Os animais C57/Bl6 foram desafiados com uma injeção intra-articular de cristais de ácido úrico (MSU – 100 μ g/cavidade) e 3 horas após o desafio (tempo onde já existe um grande influxo de neutrófilos na cavidade) foram tratados com uma injeção intra-articular de um inibidor de MIF (ISO-1 – 50 μ g/ cavidade). O tratamento foi feito em um tempo em que os níveis de MIF ainda estavam elevados, como apresentado na Figura 11A. A redução dos parâmetros inflamatórios observados no pré-tratamento com o inibidor de MIF (ISO-1) também foi observada no pós-tratamento com este inibidor. Como apresentado na Figura 12, o bloqueio da atividade de MIF, mesmo após o início do processo inflamatório, foi capaz de reverter o processo, reduzindo o recrutamento de leucócitos, especialmente neutrófilos, além de reduzir a secreção da citocina IL-1 β no tecido periarticular.

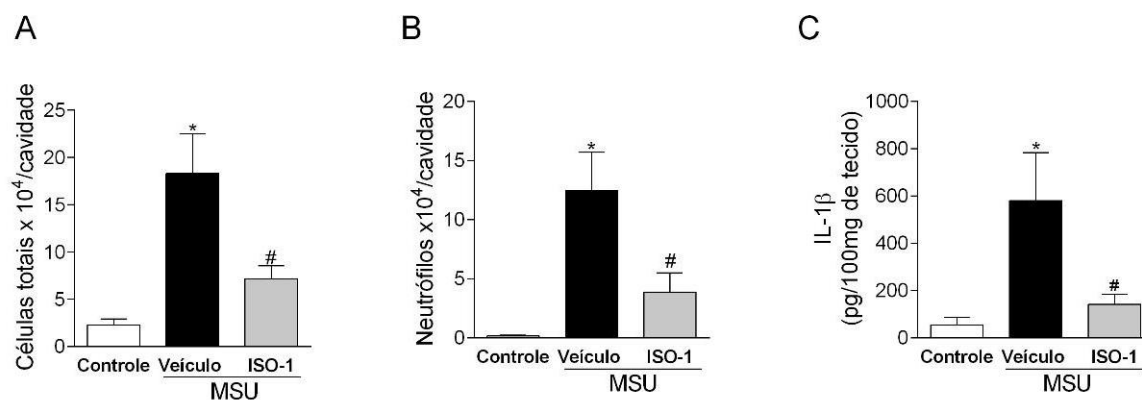


Figura 12. Efeito do tratamento com ISO-1 após o início da inflamação induzida por MSU.

Animais C57/Bl6 foram desafiados com 100 μ g de MSU. 3 horas após desafio os animais foram tratados com o inibidor de MIF (ISO-1 - 50 μ g/cavidade). O inibidor ISO-1 reduziu recrutamento leucócitos (A) especialmente neutrófilos (B). Além disso, o inibidor reduziu a citocina IL-1 β no tecido periarticular (C). As barras representam a média \pm desvio padrão de 5 camundongos por grupo. (*) para $p < 0,05$ quando comparado a média do grupo controle e (#) para $p < 0,05$ comparado com o grupo veículo (gota não tratada) (ANOVA seguida pelo pós-teste Student-Newman-Keuls).

5.8. MIF contribui para a inflamação na gota, através da indução de produção de pró- IL-1 β

Nossos resultados mostraram que rMIF induz a secreção da citocina IL-1 β na cavidade e no tecido periarticular (Figura 10). Além disso, o bloqueio da atividade de MIF através do tratamento com ISO-1 reduziu os níveis desta citocina no modelo de gota (Figura 11). Nas duas avaliações, os níveis da citocina IL-1 β foram avaliados sugerindo que MIF pode estar interferindo na indução gênica desta proteína. Para verificar esta possibilidade, nós avaliamos a síntese do RNA mensageiro (mRNA) de pró-IL-1 β *in vitro* e *in vivo*. Usando macrófagos derivados de medula (BMDM), rMIF teve um efeito significativo na síntese do mRNA de IL-1 β após 1 hora de desafio (Figura 13A). A injeção de rMIF na articulação tíbio-femoral aumentou a expressão do mRNA de IL-1 β 1 hora após o desafio no tecido sinovial quando comparado com a injeção de salina. Além disso, a injeção intra-articular de cristais de MSU aumentou os níveis do mRNA de IL-1 β no tecido periarticular 3 horas após o desafio (Figura 13B) e o pré-tratamento com ISO-1 10 minutos antes do desafio reduziu a

expressão de IL-1 β (Figura 13C). Portanto, MIF tem um papel em dirigir a síntese do mRNA de IL-1 β após a injeção de cristais de MSU.

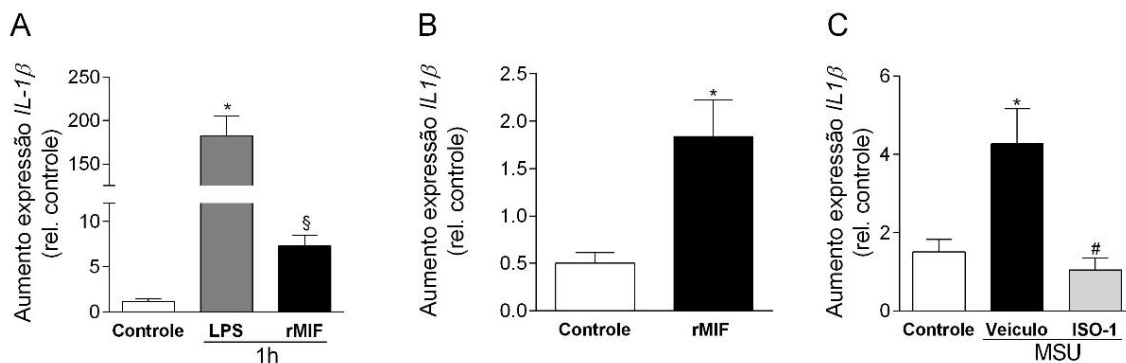


Figura 13. MIF contribui para inflamação na gota através da síntese de IL-1 β .

Macrófagos derivados de medula (BMDM) foram estimulados com MIF recombinante (rMIF; 200 ng/mL) e LPS (1 μ g/mL) por 1 hora e o RNA mensageiro (mRNA) foi extraído para dosagem de IL-1 β por PCR quantitativo. rMIF e LPS aumentaram os níveis de IL-1 β (A). A injeção intra-articular de rMIF (100 ng/cavidade) aumentou a expressão do mRNA de IL-1 β 1 hora após o desafio (B) e o bloqueio de MIF (ISO-1 - 50 μ g/cavidade) reduziu a expressão do mRNA de IL-1 β 3 horas após o desafio com cristais de MSU (100 μ g/cavidade) (C) no tecido sinovial. As barras representam a média \pm desvio padrão de 5 camundongos por grupo. (*) para $p < 0,05$ quando comparado a média do grupo controle (#) para $p < 0,05$ comparado com o grupo veículo (gota não tratado) e (ANOVA seguida pelo pós-teste Student-Newman-Keuls). (&) para $p < 0,05$ comparado com o grupo controle (teste t-student).

5.9. O bloqueio de IL-1 β não interfere no recrutamento celular induzido por MIF

Conforme demonstrado anteriormente, MIF participa da inflamação induzida por cristais de MSU através da síntese de pró-IL-1 β , amplificando a resposta inflamatória. Posteriormente, nós investigamos se o recrutamento de leucócitos induzido por MIF era via ação de IL-1 β . Para isso, animais C57/Bl6 foram pré-tratados com antagonista do receptor de IL-1 β (IL-1RA – 30 mg/Kg) 40 minutos antes da injeção intra-articular de MIF recombinante humano (100 ng/cavidade). O tratamento com o antagonista do receptor de IL-1 β não foi capaz de reduzir o recrutamento total de leucócitos (Figura 14A) e neutrófilos (Figura 14B) para a cavidade articular induzidos por rMIF (leucócitos 14A e neutrófilos

14B), sugerindo que o recrutamento neutrofílico induzido por MIF não depende de IL-1 β .

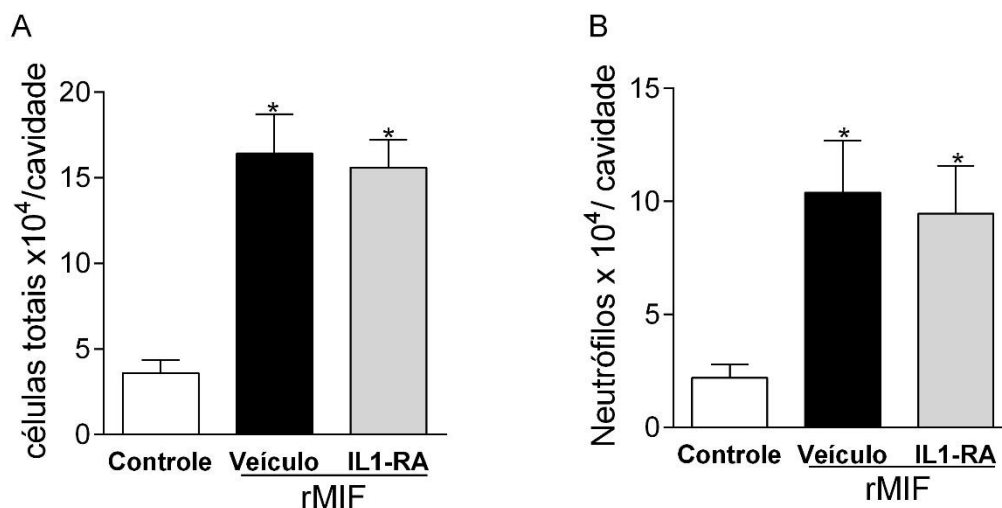


Figura 14. MIF induz o recrutamento de leucócitos independente das ações de IL-1 β .

Animais receberam pré-tratamento com o antagonista do receptor de IL-1 β (IL1RA – 30 mg/Kg) 40 minutos antes da injeção intra-articular de MIF recombinante humano (rMIF 100 ng/cavidade). O tratamento com IL-1Ra não alterou o recrutamento de leucócitos (A) especialmente neutrófilos (B) induzido por rMIF, 6 horas após o desafio. As barras representam a média \pm desvio padrão de 5 camundongos por grupo. (*) para $p < 0,05$ quando comparado a média do grupo controle (ANOVA seguida pelo pós-teste Student-Newman-Keuls).

5.10. Os níveis de MIF se correlacionam com os níveis de IL-1 β no fluido sinovial humano

Foi demonstrado até o momento que MIF contribui para inflamação induzida por cristais de MSU em um modelo experimental de gota, através da estimulação da síntese de pró-IL-1 β e promovendo recrutamento de neutrófilos para o tecido inflamado. Dessa forma, nós avaliamos produção de MIF no líquido sinovial de pacientes com gota e o resultado pode ser observado na Figura 15A. Os pacientes apresentam a associação clínica típica, com presença de cristais de MSU e neutrófilos no fluido sinovial (Figura 15C). Quando quantificamos as citocinas MIF e IL-1 β no fluido sinovial desses pacientes encontramos uma

correlação positiva entre as duas citocinas. A análise pela correlação de Pearson mostrou que os níveis de MIF estão diretamente relacionados com os níveis de IL-1 β ($r=0,636$) e esta relação foi estatisticamente significativa (valor de $p=0,026$) (Figura 15B). Os pacientes com osteoartrite apresentaram níveis aumentados de MIF sem alteração significativa dos níveis de IL-1 β (dado não mostrado).

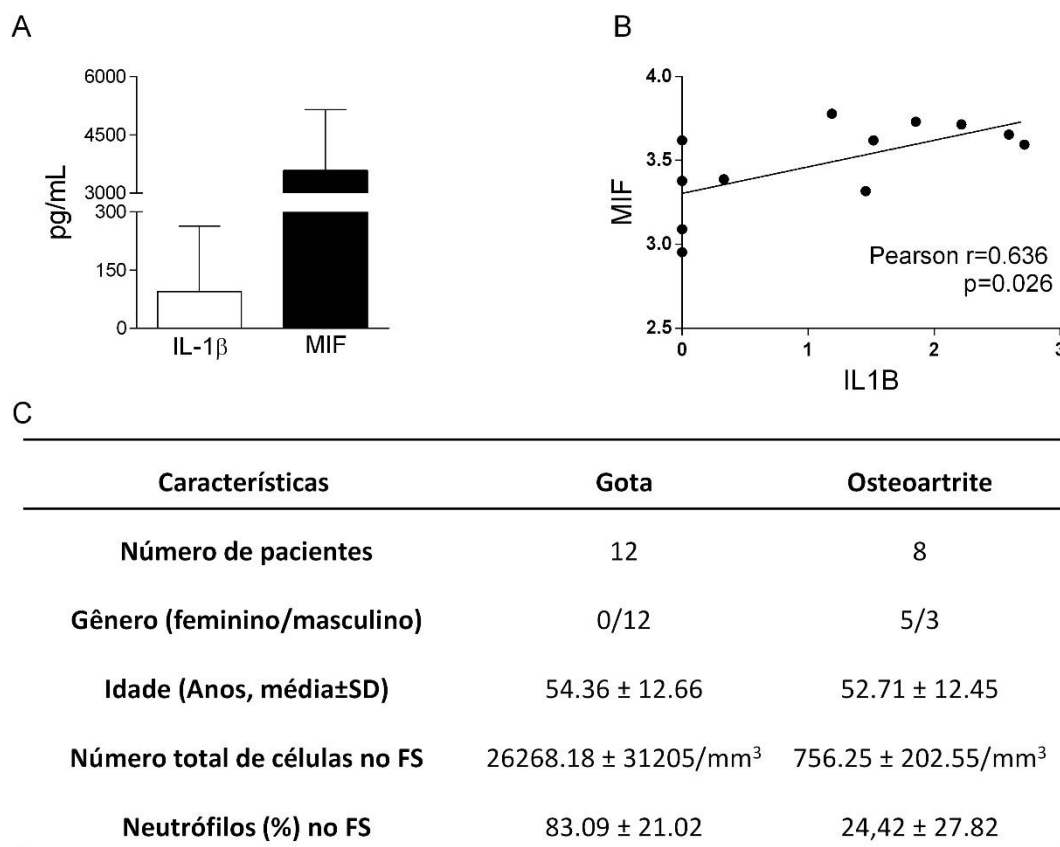


Figura 15. MIF e IL-1 β estão fortemente correlacionados no fluido sinovial de pacientes com gota.

Fluido sinovial foi obtido de pacientes com gota aguda. MIF e IL-1 β foram quantificados por ELISA (A). A análise de correlação de Pearson mostrou associação significativa entre os altos níveis de MIF e os altos níveis de IL-1 β , $r=0,636$ e valor de $P=0,026$ (B). Tabela com as características dos pacientes analisados (C). (*) para $p<0,05$ quando comparado a média do grupo controle (ANOVA seguida pelo pós-teste Student-Newman-Keuls).

Resultados do objetivo 2: Estudar o papel de Anexina A1 na resolução da inflamação em uma modelo de gota

5.11. A inflamação articular induzida por cristais de MSU está associada com o aumento da expressão de AnxA1 no tecido sinovial

Como já mostrado anteriormente (Amaral, Costa et al. 2012) e reforçado aqui (Figura 9A), a injeção intra-articular com 100 µg de cristais de MSU induz um influxo de neutrófilos de maneira dependente do tempo para a cavidade nos animais. Esse influxo possui aumento significativo com 6 horas e número máximo de neutrófilos na cavidade entre 12 e 15 horas após o desafio. O número de neutrófilos cai com 24 horas, desaparecendo com 48 horas após o desafio (Figura 16A). A expressão de AnxA1 intacta (AnxA1 – 37kDa) aumenta em consonância com a resposta inflamatória envolvida na gota e sua clivagem (AnxA1 33kDa) é prevenida no tempo em que não há mais neutrófilos na cavidade sinovial, 48 horas após o desafio (figura 16B).

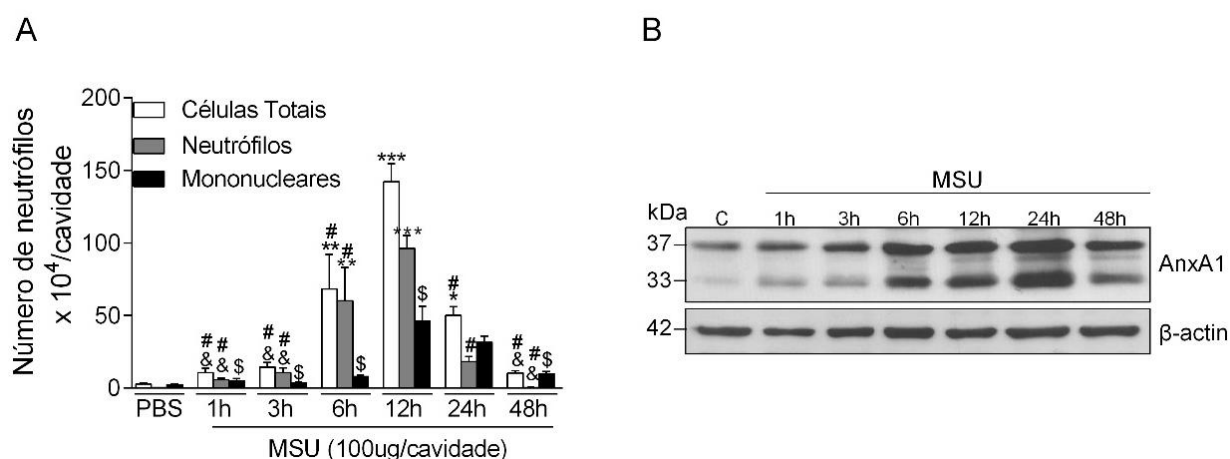


Figura 16. Expressão de AnxA1 durante a inflamação induzida por cristais de MSU.

Os animais BALB/c foram desafiados com injeção intra-articular de cristais de MSU (100 µg) e o lavado articular foi realizado 1, 3, 6, 12, 24 e 48 horas após o desafio. O número de leucócitos (A) e a expressão de AnxA1 por Western blot (B) foram avaliados. As membranas foram normalizadas com β-actina. Em A, os resultados são expressos em números de leucócitos por cavidade e as barras representam a média ± desvio padrão de 5 camundongos por grupo. (*) para $p < 0,05$ quando comparado a média do grupo controle, (&) para $p < 0,05$ quando comparado com a média do grupo 6 horas, (#) para $p < 0,05$ quando comparado a média do grupo 12 horas, (\$) para $p < 0,05$ quando

comparado a média do grupo 24 horas. (ANOVA seguida pelo pós-teste Student-Newman-Keuls).

5.12. A inibição de AnxA1 e o bloqueio do seu receptor previnem a resolução espontânea da inflamação induzida por cristais de MSU

A relevância funcional da AnxA1 no modelo de gota foi avaliada utilizando duas estratégias farmacológicas de inibição da ação de AnxA1. A primeira estratégia foi o uso de um antagonista não seletivo de FPR2/ALXR (receptor de AnxA1). A administração de BOC-1 foi feita intraperitonealmente 6 horas e 12 horas após o desafio e os animais foram eutanasiados 24 horas após o desafio, tempo onde se observa uma diminuição significativa de neutrófilos na cavidade articular (Figura 16A). O tratamento com BOC-1 preveniu a resolução neutrofílica espontânea, mantendo os níveis de leucócitos elevados, dos quais eram constituídos principalmente de neutrófilos, 24 horas após o desafio comparando com o controle não tratado (Figuras 17A e 17B). A segunda estratégia utilizada foi a administração intraperitoneal de anticorpo neutralizante anti-AnxA1 1 hora antes do desafio e 6 horas após o desafio com MSU (100 µg). Corroborando o dado anterior, observou-se a persistência de neutrófilos na cavidade articular no tempo de 24 horas comparado com o grupo não tratado (Figuras 17C e 17D). Estes dados mostram que a inibição da atividade da AnxA1 ou do seu receptor previnem a resolução natural da gota murina, sugerindo que AnxA1 seja um modulador endógeno da resposta inflamatória desencadeada pela injeção de MSU.

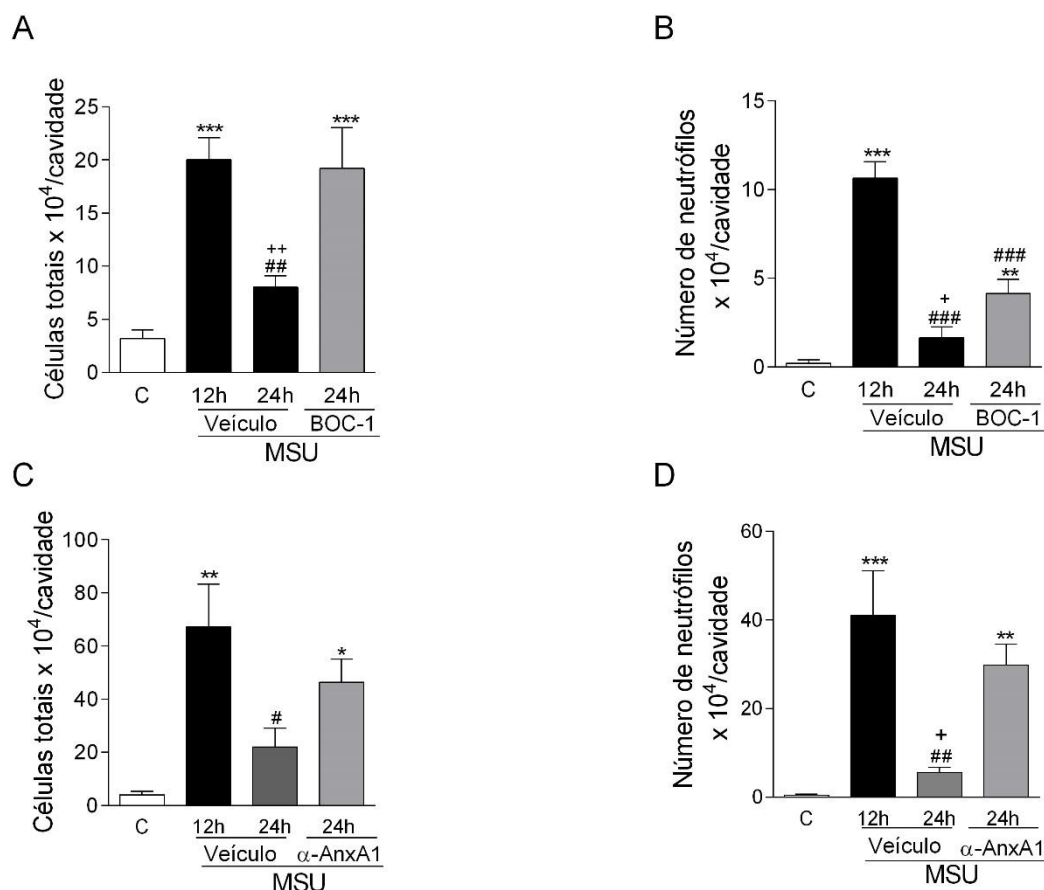


Figura 17. A inibição de anexina A1 retarda a resolução natural da resposta inflamatória induzida por MSU.

Camundongos BALB/c foram tratados com BOC-1, um antagonista não específico de FPR2/AXLR, 6 horas e 12 horas após a injeção de cristais de MSU (A e B). Em outra estratégia, os animais receberam tratamento com um anticorpo neutralizante para anexina A1, 1 hora antes e 6 horas depois da injeção de cristais de MSU (C e D). Animais foram eutanasiados no pico na inflamação (12 horas) e na fase de resolução (24 horas) e o lavado foi coletado para contagem de leucócitos (A e C) e neutrófilos (B e D). Os resultados são expressos em números de leucócitos por cavidade e as barras representam a média \pm desvio padrão de 5 camundongos por grupo. (*) para $p < 0,05$ quando comparado a média do grupo controle, (#) para $p < 0,05$ quando comparado a média do grupo 12 horas. (ANOVA seguida pelo pós-teste Student-Newman-Keuls).

Além das estratégias farmacológicas utilizadas acima, nós avaliamos a relevância de AnxA1 na modulação da resposta inflamatória da gota, utilizando animais geneticamente deficientes para este gene (animais deficientes em AnxA1). Assim, nós desafiamos os animais com 100 μ g de cristais de MSU em diferentes tempos e avaliamos o recrutamento neutrofílico comparando com os animais sem essa deficiência genética (WT- tipo selvagens). Foi observado que os animais deficientes para AnxA1 (AnxA1^{-/-}) apresentaram maior recrutamento

e acúmulo de neutrófilos nos tempos de 6, 12, e 24 horas após o desafio comparados com o grupo selvagem (WT). Ambos os genótipos, selvagens e *AnxA1*^{-/-}, apresentaram números reduzidos de neutrófilos no tempo 36 horas (Figura 18A), mostrando que apesar da inflamação mais exacerbada os animais deficientes em *AnxA1* resolvem a inflamação no tempo de 36 h da mesma forma que os animais WT. Foi observado ainda um aumento da expressão de *AnxA1* nos animais selvagens 12 horas (Figura 18B) após o desafio com MSU. Estes resultados sugerem a participação de *AnxA1* endógena, tanto na fase inicial de recrutamento neutrofílico quanto na fase de resolução da inflamação induzida por cristais de MSU.

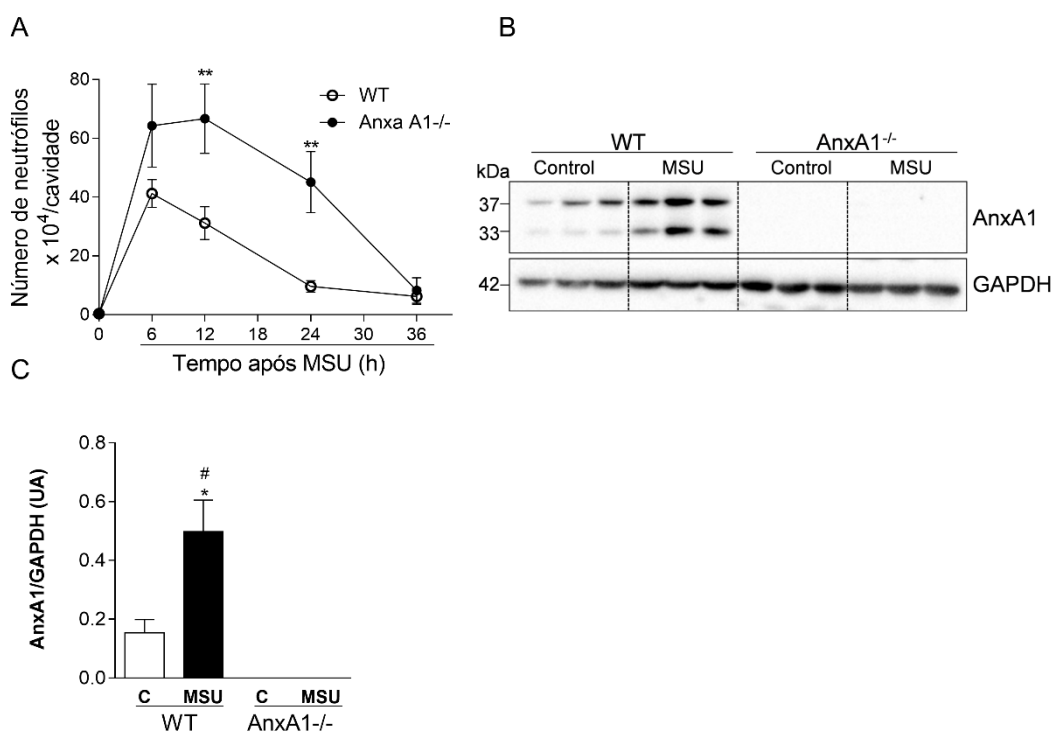


Figura 18. Animais deficientes em *AnxA1* (*AnxA1*^{-/-}) recrutam mais neutrófilos durante a inflamação induzida por cristais de MSU.

Os animais receberam uma injeção intra-articular de cristais de MSU (100 µg) sendo eutanasiados em diferentes tempos. O lavado da cavidade articular foi feito para contagem de neutrófilos (A). Os resultados são expressos em números de neutrófilo por cavidade, cada ponto representa a média ± desvio padrão de 5 camundongos por grupo. Em B está representado o western blot para anexina A1 no tecido periarticular 12 horas após a injeção de MSU e em C a densitometria respectiva. Na figura A (*) para $p < 0,05$ quando comparado aos animais WT nos tempos de 12 e 24 horas. Na figura C (*) para $p < 0,05$ quando comparado a média do grupo controle. (#) para $p < 0,05$ quando comparado a média do grupo MSU nos animais *AnxA1*^{-/-} (ANOVA seguida pelo pós-teste Student-Newman-Keuls).

5.13. O pré- e pós- tratamento com peptídeo bioativo de AnxA1, Ac2-26, possui efeito anti-inflamatório e pró-resolutivo

Uma vez observado que AnxA1 endógena é importante no processo de resolução espontânea no modelo de gota, experimentos foram realizados para avaliar o efeito da administração exógena de AnxA1 no curso da inflamação induzida por cristais de MSU. Para essa avaliação, nós utilizamos dois protocolos experimentais através da injeção intraperitoneal do peptídeo Ac2-26, no qual contém a porção N-terminal ativa de AnxA1. No primeiro protocolo, nós injetamos Ac2-26 (150 µg/camundongo) 1 hora antes do desafio com cristais de MSU e coletamos o lavado articular e tecido periarticular no pico da inflamação (12 horas após o desafio com cristais de MSU). Observamos que o pré-tratamento com Ac2-26 reduziu os níveis de leucócitos, nos quais eram constituídos principalmente de neutrófilos, além de reduzir os níveis da citocina IL-1β nos tecidos dos animais tratados quando comparados com os animais não tratados (Figuras 19 A-C).

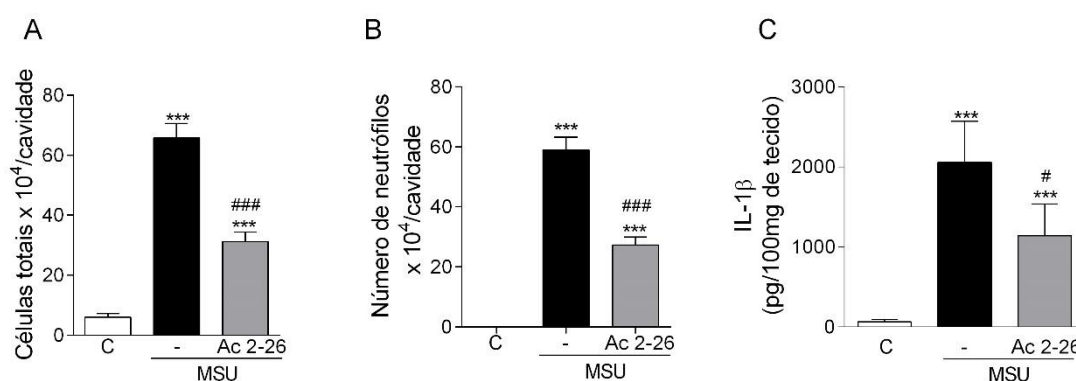


Figura 19. O pré-tratamento com peptídeo derivado de AnxA1, Ac2-26, reduz resposta inflamatória induzida por cristais de MSU.

Animais foram pré-tratados com Ac2-26 (150 µg/i.p.) 30 minutos antes do desafio intra-articular com cristais de MSU (100 µg). Os animais foram eutanasiados 12 horas após o desafio e o lavado articular foi feito para avaliar contagem de leucócitos (A) e neutrófilos (B). O tecido periarticular foi coletado para dosagem de IL-1β por ELISA (C). As barras representam a média ± desvio padrão de 5 camundongos por grupo. (***) para p<0,001 quando comparado à média do grupo controle, (###) para p<0,001 quando

comparado à média do grupo veículo (não tratado). (ANOVA seguida pelo pós-teste Student-Newman-Keuls).

Os índices de resolução têm sido empregados para avaliar o efeito pró-resolutivo de várias moléculas (Bannenberg, Chiang et al. 2005, Chiang, Schwab et al. 2008, Kamaly, Fredman et al. 2013). Dessa forma, para avaliar o potencial terapêutico e quantificar os índices de resolução, nós utilizamos um segundo protocolo no qual tratamos os animais com peptídeo Ac2-26 no pico da inflamação (12 horas após o desafio com cristais de MSU). Foi feito o lavado articular 6, 12 e 24 horas após o tratamento. O peptídeo Ac2-26 reduziu de forma significativa o número de neutrófilos na cavidade articular e o intervalo de resolução (Ri) para aproximadamente 5 horas (Figuras 20A e B). Além disso, o tratamento também reduziu significativamente os níveis da citocina IL-1 β (Figura 20C). Para avaliar se o tratamento com Ac2-26 melhora o dano tecidual foi realizado a histologia desses animais 18 horas após o desafio. O corte histológico está representado na Figura 21A, sendo que as imagens localizadas à esquerda possuem aumento de 40 vezes e um local de interesse foi selecionado e está representado à direita em um aumento de 400 vezes. O *score* articular está representado na Figura 21B e foi realizado considerando os critérios descritos na metodologia. Foi possível observar a diminuição significativa do *score* articular no grupo tratado com Ac2-26 quando comparado com o grupo que somente recebeu injeção intra-articular de cristais de MSU. Os animais do grupo controle receberam injeção intra-articular de salina, e por esse motivo apresentam alguns aspectos de um processo inflamatório leve, porém não comparável com o grupo que recebeu injeção intra-articular com cristais de MSU, nos quais apresentaram elevados todos os critérios avaliados. Estes resultados sugerem que administração exógena de um peptídeo mimético de AnxA1 possui efeito anti-inflamatório e pró-resolutivo na inflamação induzida por cristais de MSU.

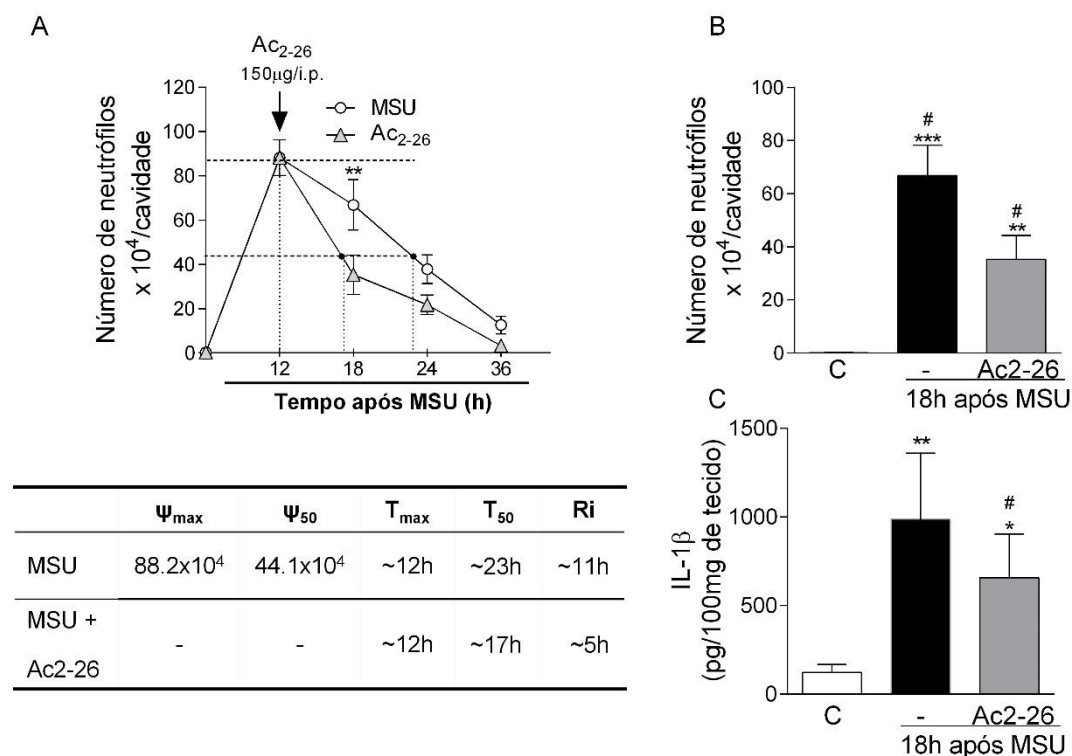


Figura 20. O tratamento com Ac2-26 melhora os índices de resolução durante a resposta inflamatória induzida por MSU.

Os animais foram desafiados com uma injeção intra-articular de cristais de MSU (100 µg) e 12 horas após a injeção um grupo foi tratado com Ac-2-26 (150 µg/i.p.). A contagem de neutrófilos foi avaliada 12, 18, 24 e 36 horas após a injeção intra-articular de MSU e o índice de resolução foi calculado (A). T_{max} = 12h é o tempo em que é observado o número máximo de neutrófilos na cavidade; T_{50} Ac₂₋₂₆ ~17h é o tempo em que o número de neutrófilos chegaram a metade do número máximo; e índice de resolução Ri Ac₂₋₂₆ ~5h é período de tempo em que o tratamento conseguiu reduzir o número de neutrófilos pela metade na cavidade articular comparado ao grupo não tratado. Em B e C, os animais receberam injeção articular de cristais de MSU e foram tratados com Ac₂₋₂₆ (150 µg/i.p.) 12 horas após o desafio e eutanasiados 18 horas após o desafio. O lavado foi coletado para contagem de neutrófilos (B) e o tecido periarticular foi coletado para dosar os níveis de IL-1 β (C). As barras representam a média \pm desvio padrão de 5 camundongos por grupo. (*) para $p < 0,05$, (**) para $p < 0,01$ e (***) para $p < 0,001$ quando comparado a média do grupo controle, (#) para $p < 0,05$ e (##) para $p < 0,01$ quando comparado a média do grupo veículo (não tratado). (ANOVA seguida pelo pós-teste Student-Newman-Keuls).

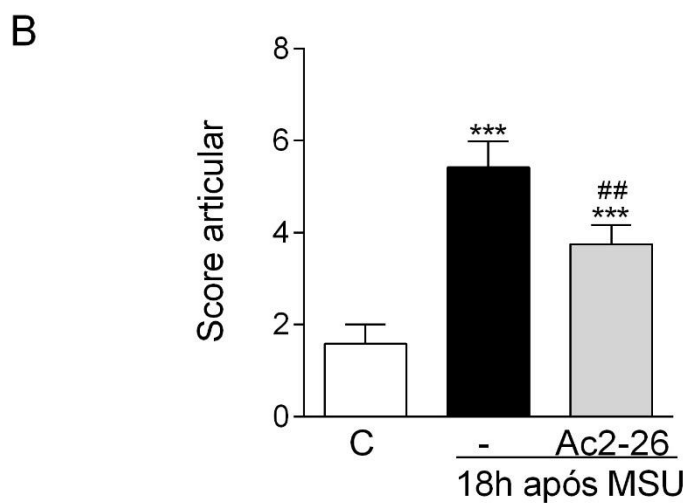
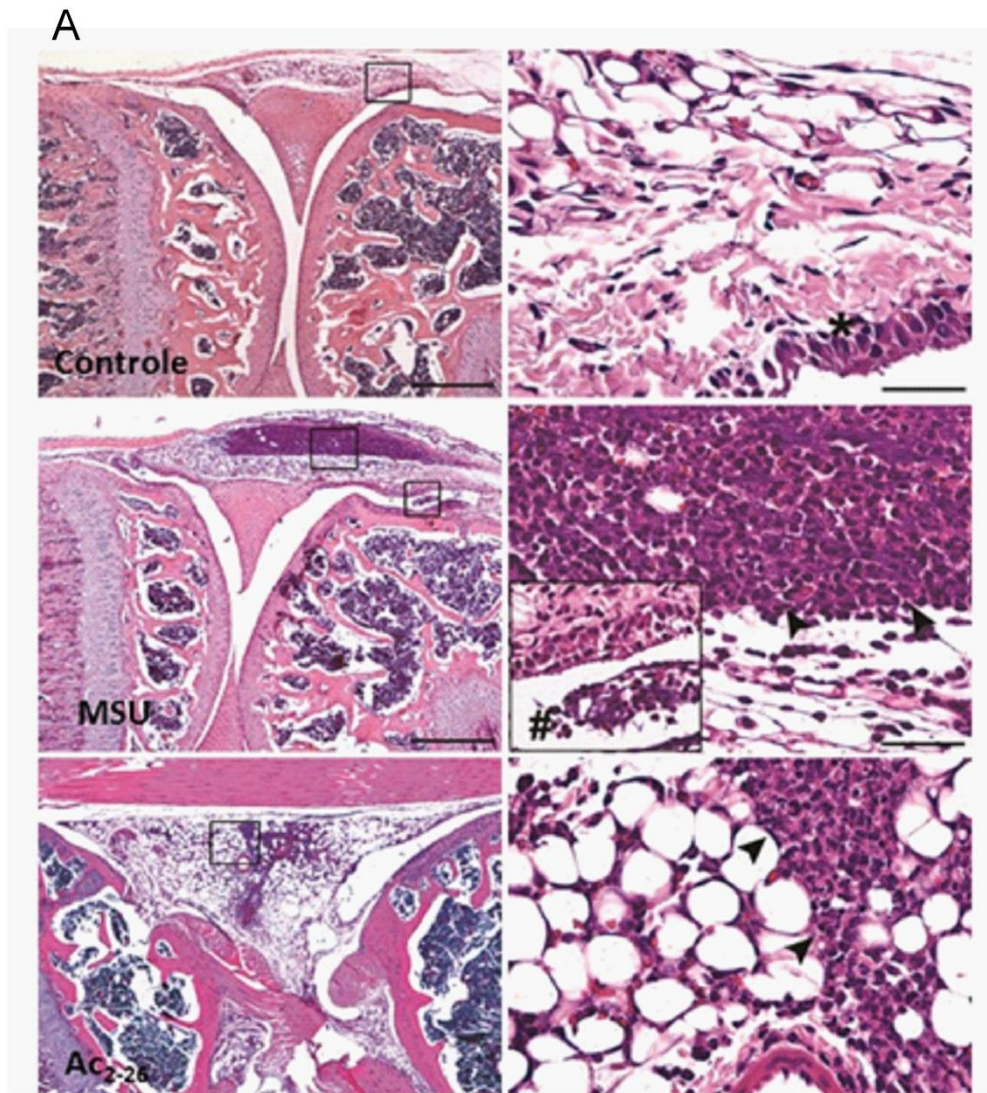


Figura 21. O tratamento com Ac2-26 reduz a inflamação articular promovida pela injeção de MSU

Os animais foram desafiados com uma injeção intra-articular de cristais de MSU (100 μ g) e 12 horas após a injeção um grupo foi tratado com Ac-2-26 (150 μ g/i.p.). Para a

histologia foram utilizados 4 animais por grupo. No corte histológico (A) as imagens cabeça de seta indica infiltrado inflamatório, seta indica vaso hiperemiado, (*) indica hiperplasia da sinóvia e (#) indica células inflamatórias no espaço articular. As imagens da esquerda estão em aumento de 40 vezes e as imagens da direita e inserto estão em aumento de 400 vezes. A soma dos parâmetros histológicos avaliados foi expressa com *score* articular (B). As barras representam a média \pm desvio padrão por grupo, (***) para $p < 0,001$ quando comparado a média do grupo controle, (##) para $p < 0,01$ quando comparado a média do grupo veículo (não tratado). (ANOVA seguida pelo pós-teste Student-Newman-Keuls).

5.14. A resolução da gota induzida por Ac2-26 é dependente de caspase

Para investigar se a resolução promovida por Ac2-26 seria através da indução apoptose de neutrófilos, foi administrado nos animais um inibidor de caspase de amplo espectro (zVAD-fmk – 1 mg/kg) pela via intraperitoneal, 15 minutos antes da administração do peptídeo Ac2-26 (150 ug/cavidade). Os tratamentos foram feitos no pico da inflamação (12 horas após o desafio com cristais de MSU) e o lavado articular foi realizado 6 horas após os tratamentos. Os resultados mostraram novamente o efeito de Ac2-26 na redução do recrutamento neutrofílico e o efeito do inibidor de caspase revertendo o efeito pró-resolutivo do Ac2-26 (Figuras 22A e B). O tratamento somente com zVAD não alterou o recrutamento de neutrófilos para a cavidade articular (dado não mostrado). De forma interessante, a porcentagem de neutrófilos com morfologia apoptótica, avaliada pela contagem das preparações de citospin, mostrou que o tratamento com Ac2-26 promoveu a apoptose de neutrófilos, efeito este revertido pelo pré-tratamento com zVAD-fmk (Figura 22 C). Estes dados sugerem que a apoptose contribui para o efeito resolutivo de Ac2-26 nos neutrófilos e essa apoptose depende da participação de caspase.

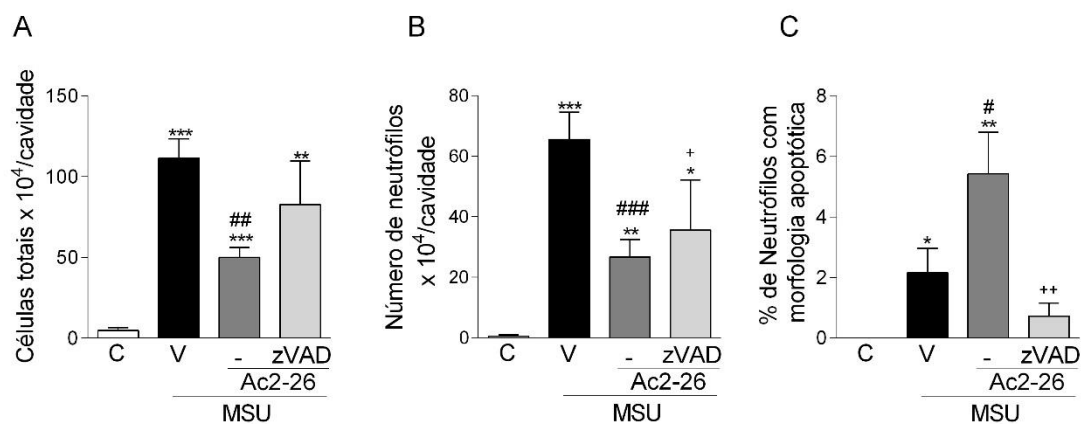


Figura 22. Tratamento com Ac2-26 induz resolução na gota através da apoptose de neutrófilos.

Animais foram desafiados com injeção intra-articular de cristais de MSU (100 µg) e 12 horas após o desafio foram tratados com Ac2-26 (150 µg/i.p.) e 30 minutos antes do tratamento com Ac2-26 os animais receberam tratamento com inibidor de caspase zVAD-fmk (1 mg/Kg i.p.). O número total de leucócitos (A), neutrófilos (B) e porcentagem de neutrófilos apoptóticos (C) foram avaliados 6 horas após o tratamento com Ac2-26. As barras representam a média ± desvio padrão de 5 camundongos por grupo. (*) para $p < 0,05$, (**) para $p < 0,01$ e (***) para $p < 0,001$ quando comparado a média do grupo controle, (#) para $p < 0,05$ e (##) para $p < 0,01$ quando comparado a média do grupo veículo (não tratado). (+) para $p < 0,05$ e (++) para $p < 0,01$ quando comparado com o grupo tratado com Ac2-26 (ANOVA seguida pelo pós-teste Student-Newman-Keuls).

6. Discussão

A gota é uma doença causada pela deposição de cristais de MSU nas articulações, com inflamação local significativa e dor intensa. No presente estudo nós identificamos pela primeira vez que MIF é um importante mediador da inflamação causada por cristais de MSU, principalmente na fase inicial da resposta inflamatória e que a proteína AnxA1 possui papel indispensável no controle do recrutamento de neutrófilos para articulação além de participar da fase de resolução da resposta inflamatória.

Os principais achados são sumarizados a seguir:

1) a injeção de MIF recombinante na articulação produziu uma resposta inflamatória observada na gota incluindo recrutamento de neutrófilos, aumento de citocinas e hipernocicepção;

2) a injeção de cristais de MSU aumentou os níveis de MIF e o seu bloqueio reduziu a inflamação articular;

3) Como mecanismo, MIF é necessário para a produção de IL-1 β , citocina essencial no contexto da gota, pela estimulação da síntese do mRNA de IL-1 β ;

4) existe uma correlação positiva entre a produção de MIF e IL-1 β no fluido sinovial de pacientes com gota aguda;

5) AnxA1 é expressa no tecido sinovial durante a inflamação induzida por cristais de MSU e os níveis de expressão estão associados ao influxo leucocitário;

6) a inibição de AnxA1, pelo bloqueio do receptor ou pela neutralização da proteína, preveniu a resolução espontânea da gota;

7) animais deficientes em AnxA1 apresentam inflamação exacerbada com um maior número de neutrófilos recrutados e mantidos na cavidade após a injeção de cristais de MSU;

8) o pré- e pós-tratamento com Ac2-26 (peptídeo ativo N-terminal de AnxA1), diminuiu o número de neutrófilos e os níveis de IL-1 β na cavidade articular e reduziu o intervalo de resolução;

9) Como mecanismo proposto, o efeito pró-resolutivo de Ac2-26 foi devido a um aumento de apoptose de neutrófilos na cavidade articular.

MIF é conhecido por possuir ações quimioatrativas em diferentes células, incluindo monócitos, células T, células B e neutrófilos (Bernhagen, Krohn et al. 2007, Klasen, Ohi et al. 2014). MIF possui papel em condições inflamatórias crônicas e agudas tais como artrite reumatoide, aterosclerose e lúpus eritematoso (Santos and Morand 2009). Nas nossas condições experimentais, a injeção de MIF na articulação tíbio-femoral foi capaz de promover o recrutamento de neutrófilos. É importante lembrar que o influxo de neutrófilos para a cavidade articular é um marcador do ataque agudo de gota e contribui para a lesão e dor articulares (Popa-Nita and Naccache 2010). Além disso, mostramos que rMIF aumenta os níveis da citocina IL-1 β e da quimiocina CXCL1, moléculas já conhecidas por também contribuírem para o recrutamento de neutrófilos para a cavidade articular (Amaral, Costa et al. 2012).

Sob estimulação de TNF- α , neutrófilos maduros, nos quais estão presentes em sítios inflamatórios, são capazes de liberar MIF (Daryadel, Grifone et al. 2006). Nós demonstramos que a injeção de cristal de MSU aumenta os níveis de MIF na articulação nas primeiras horas após a injeção, tempo onde somente poucos neutrófilos podem ser detectados na articulação dado já mostrado por Amaral et al 2012 (Amaral, Costa et al. 2012) e reforçado aqui.

Diferentes estudos já demonstraram que o recrutamento de leucócitos é reduzido em diferentes condições inflamatórias, como na artrite autoimune, na ausência de MIF ou através do seu bloqueio com anticorpos neutralizantes (Leech, Metz et al. 1998, Gregory, Leech et al. 2004, Santos, Fan et al. 2011). Foi descrito que uma molécula pequena denominada ISO-1 inibe a atividade enzimática tautomerase de MIF, suprimindo, dessa forma, sua atividade pró-inflamatória (Lubetsky, Dios et al. 2002). Neste trabalho, nós utilizamos ISO-1 para bloquear o MIF endógeno e suprimir sua atividade pró-inflamatória *in vivo* como descrito por (Al-Abed, Dabideen et al. 2005). Nossos resultados demonstraram que o bloqueio de MIF, através do uso de ISO-1, reduziu o recrutamento de neutrófilos induzidos por cristais de MSU. Além disso, o tratamento com ISO-1 reduziu a hipernocicepção associada com a inflamação induzida por cristais de MSU. Neste sistema, nós demonstramos recentemente que a hipernocicepção induzida por cristais de MSU é dependente do influxo de neutrófilos (Amaral, Costa et al. 2012). Dessa forma, MIF contribui para o influxo inicial de neutrófilos e dor associada a este influxo neste modelo.

A participação da citocina IL-1 β na inflamação induzida por MSU, como mediador importante para influxo neutrofílico e dor já é bem descrita na literatura (Amaral, Costa et al. 2012, Mitroulis, Kambas et al. 2013). IL-1 β é produzida inicialmente em sua forma imatura, denominada pró-IL-1 β , na qual é então clivada e liberada em sua forma ativa IL-1 β através da ativação de inflamassoma NLRP3 (Martinon, Petrilli et al. 2006). Nossos resultados demonstraram que MIF aumenta os níveis de IL-1 β na articulação inflamada. Este achado consiste com a habilidade de MIF induzir IL-1 β em outras condições (Toh, Aeberli et al. 2006, Assuncao-Miranda, Bozza et al. 2010). Além disso, o bloqueio da ação de MIF através do uso de ISO-1, está associado com a inibição dos níveis de IL-1 β em resposta a injeção de cristais de MSU. O tratamento com ISO-1 previne o aumento de pró-IL-1 β induzido por cristais de MSU sugerindo que o controle de transcrição gênica de IL-1 β é o mecanismo pelo qual MIF controla a inflamação neste contexto. Este mecanismo corrobora com um estudo *in vitro*, o qual, mostra que a pró-IL-1 β é regulada positivamente por MIF em fibroblastos sinoviais (Onodera, Nishihira et al. 2004); e com um estudo *in vivo*, o qual, descreve a menor expressão de mRNA de IL-1 β em tecido sinovial de animais deficientes em MIF em um modelo de artrite induzido por transferência de soro (K/BxN) (Santos, Fan et al. 2011).

De forma interessante, nossos resultados mostram que apesar de MIF induzir IL-1 β e ser importante para sua formação durante a resposta inflamatória induzida por cristais de MSU, o bloqueio de IL-1 β parece não ter efeito no influxo neutrofílico induzido por MIF, porém esse dado deve ser confirmado. No nosso modelo, a injeção articular de rMIF promove recrutamento de neutrófilos, que parece ser independente de IL-1 β . Ao contrário, no contexto de gota, Amaral et al 2012 demonstraram que o tratamento com IL1-Ra reduz a inflamação, incluindo diminuição do recrutamento de neutrófilos e resposta hipernociceptiva (Amaral, Costa et al. 2012). Dessa forma, nossos resultados demonstram claramente que o MIF é necessário no estágio inicial da resposta inflamatória, promovendo a produção de IL-1 β e recrutamento de neutrófilos, amplificando a resposta inflamatória induzida por cristais de MSU.

Alguns estudos prévios avaliaram os níveis de MIF no fluido sinovial e sugeriram um papel relevante de MIF na patogênese de algumas doenças como artrite idiopática juvenil (Meazza, Travaglini et al. 2002), osteoartrite (Liu and Hu

2012) e artrite reumatoide (Onodera, Tanji et al. 1999). Nos pacientes avaliados no nosso estudo, os níveis de MIF puderam ser detectados em todas as amostras e correlacionados positivamente com níveis de IL-1 β , corroborando com os nossos resultados obtidos no modelo animal. Os níveis de MIF em pacientes com gota ($8060,62 \pm 6121,63$ pg/mL) foram similares aos encontrados em pacientes com osteoartrite ($8005,47 \pm 6112,25$ pg/mL). Nós não tivemos acesso às amostras de pacientes saudáveis, desta forma não houve como compararmos com este grupo controle. Um estudo prévio demonstrou que os níveis de MIF no fluido sinovial foi maior em pacientes com osteoartrite quando comparados aos pacientes controles (Liu and Hu 2012), sugerindo que os níveis de MIF encontrados no nosso estudo devem estar elevados quando comparados a níveis basais. Em contraste, indivíduos com osteoartrite não apresentaram altos níveis de IL-1 β ($54,27 \pm 79,50$ pg/mL) quando comparados com pacientes com gota ($147,75 \pm 231,09$ pg/mL). Dessa forma, parece que MIF é importante para a produção de IL-1 β no contexto de gota, porém, parece não ser importante para produção de IL-1 β em pacientes com osteoartrite.

A inflamação causada por cristais de MSU é desencadeada pelo reconhecimento do cristal por células locais, as quais, secretam mediadores inflamatórios que promovem recrutamento de neutrófilos além dos sinais clínicos já caracterizados. Apesar desta resposta inflamatória ser limitada, é necessário um fino controle do processo inicial para evitar a inflamação persistente e dano tecidual.

Já foi previamente descrito por Amaral et al (2012) que a injeção de cristais de MSU na articulação tíbio-femoral induz o influxo de neutrófilos para a cavidade de maneira tempo-dependente com um pico em 15 horas após desafio (Amaral, Costa et al. 2012). Nossos resultados também mostram que a inflamação induzida por cristais de MSU é dependente do recrutamento de neutrófilos, com pico em 12 horas. Além disso, mostramos que AnxA1 é expressa no tecido sinovial de animais desafiados com cristais de MSU. Essa expressão aumenta com o tempo e com recrutamento de neutrófilos para a cavidade articular. Corroborando com nossos achados, Morand et al 2006 mostra que anexina A1 é constitutivamente expressa em sinoviócitos de humanos com artrite reumatoide (Morand, Hall et al. 2006).

A anexina A1 é uma proteína de ação anti-inflamatória que ao se ligar no seu receptor FPR2/ALXR promove o destacamento de neutrófilos do endotélio e dessa forma controla o recrutamento de neutrófilos (Perretti 2003). O uso de BOC-1, um antagonista desse receptor, implica na inibição da ação de AnxA1 sobre a transmigração de neutrófilos (Walther, Riehemann et al. 2000). Esse efeito também foi observado nos nossos resultados, onde o tratamento com BOC-1 promoveu a persistência de neutrófilos na cavidade articular após 24 horas. Com 24 horas é possível observar a resolução natural nesse modelo, uma vez que nesse tempo o número de neutrófilos em animais desafiados, mas não tratados, já caiu significativamente. O BOC-1 é um antagonista inespecífico de AnxA1 uma vez que pode também, em concentrações maiores, agir no receptor FPR1. Além disso, o receptor FPR2/ALXR é compartilhado com lipoxina A4, molécula que também possui efeitos anti-inflamatórios através da limitação do recrutamento de neutrófilos (Yazid, Norling et al. 2012). Dessa forma, para uma avaliação mais específica do papel da AnxA1 na resolução natural da gota utilizamos o tratamento com um anticorpo neutralizante anti-AnxA1. O tratamento com anti-AnxA1 preveniu a resolução natural, observada pela persistência de neutrófilos na cavidade articular 24 horas após o desafio, corroborando com os dados obtidos com BOC-1. De acordo com estes achados, estudos do nosso grupo de pesquisa mostraram a participação de AnxA1 endógena no controle do recrutamento de neutrófilos após estímulo inflamatório com LPS (Vago, Nogueira et al. 2012), sugerindo que AnxA1 modula a resposta inflamatória em vários modelos experimentais de inflamação.

Além das estratégias farmacológicas, animais deficientes em AnxA1 foram utilizados para confirmar a importância desta proteína na modulação da inflamação da gota. Hannon et al (2002) descreveram que animais deficientes em AnxA1 exibem uma resposta exagerada em resposta a estímulos inflamatórios tais como carragenina e zymosan caracterizada pelo aumento da emigração de leucócitos (Hannon, Croxtall et al. 2003). Além disso, Damazo et al. (2006) mostram um maior infiltrado neutrofilico com maior produção de citocinas e quimiocinas em animais AnxA1^{-/-} comparados aos WT, mas seguido de resolução em ambos (Damazo, Yona et al. 2006). Corroborando com esses achados, nossos resultados também mostram um maior recrutamento de neutrófilos nos animais deficientes em AnxA1 comparados com os animais

selvagens. Além do maior número de neutrófilos na cavidade dos animais deficientes em AnxA1 nas primeiras horas após o estímulo inflamatório com cristais de MSU, os neutrófilos persistem por mais tempo na cavidade, como observado no tempo de 24 horas. Estes dados sugerem que AnxA1 atue modulando a chegada e a permanência dos neutrófilos no sítio inflamatório da gota, confirmando os dados obtidos com os inibidores de AnxA1.

Estudos recentes têm demonstrado que a administração terapêutica de peptídeo sintético derivado de AnxA1 é eficiente na prevenção do recrutamento de leucócitos e indução da resolução da inflamação (Vago, Nogueira et al. 2012, Girol, Mimura et al. 2013, Guido, Zanatelli et al. 2013, Trentin, Ferreira et al. 2015). Nossos dados estão de acordo com a literatura uma vez que o pré-tratamento com Ac2-26, peptídeo sintético da porção N-terminal de Anxina A1, reduziu o número de neutrófilos recrutados e os níveis da citocina IL-1 β . Além disso, o pós-tratamento com Ac2-26 também reduziu o recrutamento de neutrófilos e os níveis de IL-1 β . Interessantemente, o tratamento com Ac2-26 no pico da inflamação reduziu o intervalo de resolução por aproximadamente 5 horas, sugerindo, dessa forma, que o Ac2-26 e outros peptídeos miméticos de AnxA1, como o Ac2-50 resistente à clivagem (Dalli, Consalvo et al. 2013), possam se constituir em possíveis estratégias terapêuticas em pacientes com ataque de gota.

A AnxA1 participa da resolução da inflamação através de dois mecanismos. Primeiramente induzindo apoptose de neutrófilos recrutados para o local da inflamação (Solito, Kamal et al. 2003, Vago, Nogueira et al. 2012). Além disso, AnxA1 funciona como um sinal de ache-me (“find me”) para aumentar a eferocitose de neutrófilos apoptóticos por células mononucleares (Scannell and Maderna 2006). Outro estudo interessante mostrou que AnxA1 externalizada pelos neutrófilos em apoptose tardia se constitui em um mecanismo para recrutamento de células mononucleares facilitando dessa forma o *clearance* destas células do local (Blume, Soeroes et al. 2012). Como já descrito anteriormente, durante a resolução da gota, os neutrófilos recrutados entram em apoptose e o *clearance* por células mononucleares deve ser feito para uma resolução efetiva (Rose and Liu-Bryan 2006). A partir dessa informação, nós avaliamos se o tratamento com Ac2-26 promoveria apoptose de neutrófilos, o que foi confirmado pela contagem morfológica. Além disso, observamos que o

tratamento com zVAD-fmk, um inibidor amplo de caspase, preveniu a resolução (queda do número de neutrófilos e aumento da apoptose destas células) induzida por Ac2-26 sugerindo a participação de caspases no controle da apoptose induzida por Ac2-26

Nos dados mostrados aqui, a expressão de MIF aumenta nas primeiras 3 horas após o desafio, e sua expressão decai a partir de 6 horas após o desafio. Já a expressão de AnxA1 aumenta a partir de 6 horas após o desafio permanecendo aumentada até 48 horas. Esses dados estão de acordo com Sun et al. (2013) que demonstraram que MIF suprime a expressão de AnxA1 e na ausência de MIF a expressão de AnxA1 aumenta (Sun, Wang et al. 2013). Como já descrito na literatura, MIF promove o recrutamento de neutrófilos e antagoniza o efeito anti-inflamatório de glicocorticóide (Gregory, Hall et al. 2009). Estudos têm demonstrado que na ausência de MIF endógeno há um aumento da sensibilidade aos glicocorticóides através da expressão de MKP-1 (Roger, Chanson et al. 2005, Aeberli, Yang et al. 2006). Outro mecanismo pelo qual MIF contra regula o efeito de glicocorticóide pode ser via AnxA1 (Sun, Wang et al. 2013). Dessa forma, nossos dados sugerem que MIF e AnxA1 participam da patogênese da inflamação induzida por MSU de maneira orquestrada. Inicialmente, MIF através do aumento da expressão de IL-1 β induz influxo de neutrófilos, e posteriormente, AnxA1 que controla controle esse influxo neutrofílico e induz resolução.

Estas observações sugerem novas estratégias terapêuticas para os pacientes que não apresentam resposta satisfatória aos tratamentos convencionais. Além de tratamentos farmacológicos, tratamentos adjuvantes como o uso de probióticos tem demonstrado eficácia clínica através da redução de citocinas pró-inflamatórias e do aumento de mediadores anti-inflamatórios (Vieira, Teixeira et al. 2013) capazes de regular a atividade de leucócitos, além de contribuir para a resolução da inflamação (Serhan, Brain et al. 2007). Neste contexto, o uso do probiótico *Bifidobacterium longum* 5^{1A} por via oral durante 7 dias em animais com gota levou a um efeito anti-inflamatório significativo no modelo, reduzindo o número de neutrófilos recrutados e hipernocicepção (Vieira, Galvão et al. 2015 *in press*) (ANEXO3).

7. Conclusão

Em conclusão, o presente trabalho demonstrou que diferentes estratégias farmacológicas contribuem de forma significativa no controle da inflamação, seja pela inibição de mediadores pró-inflamatórios, seja por aumento de mediadores pró-resolutivos.

Nós mostramos neste estudo que MIF participa da inflamação induzida por cristais de MSU. O mecanismo pelo qual MIF controla a inflamação é dependente da sua habilidade em controlar a produção de mRNA de IL-1 β . Além disso, MIF pode contribuir diretamente para o recrutamento de neutrófilos para a cavidade articular, fato importante para promoção de dano articular. Os níveis de MIF no líquido sinovial de pacientes com gota correlacionam-se fortemente com os níveis de IL-1 β o que corrobora com os nossos achados no modelo murino de gota.

Nós mostramos ainda que AnxA1 tem papel fundamental no processo de resolução da inflamação induzida por cristais de MSU. Além disso, o peptídeo derivado de AnxA1 diminuiu o recrutamento e acúmulo de neutrófilos na cavidade articular e reduzir o intervalo de resolução. Mecanicamente, AnxA1 resolve a inflamação induzida por cristais de MSU através da indução de apoptose e redução dos níveis de IL-1 β .

Assim, concluímos que MIF é um importante mediador no processo inicial da inflamação da gota, mimetizando um ataque agudo de gota e pode ser usado como alvo para controle de inflamação intensa desencadeada pela deposição de cristais de MSU. Além disso, AnxA1 participa do processo de resolução da inflamação da gota, controlando o recrutamento de neutrófilos e induzindo a resolução através da indução de apoptose em neutrófilos recrutados. O tratamento terapêutico com peptídeo derivado de AnxA1 pode ser uma importante estratégia terapêutica para reduzir o tempo de resolução do ataque agudo de gota.

8. Referências:

Aeberli, D., et al. (2006). "Endogenous macrophage migration inhibitory factor modulates glucocorticoid sensitivity in macrophages via effects on MAP kinase phosphatase-1 and p38 MAP kinase." FEBS Lett **580**(3): 974-981.

Al-Abed, Y., et al. (2005). "ISO-1 binding to the tautomerase active site of MIF inhibits its pro-inflammatory activity and increases survival in severe sepsis." J Biol Chem **280**(44): 36541-36544.

Alessandri, A. L., et al. (2013). "Resolution of inflammation: mechanisms and opportunity for drug development." Pharmacol Ther **139**(2): 189-212.

Amaral, F. A., et al. (2012). "NLRP3 inflammasome-mediated neutrophil recruitment and hypernociception depend on leukotriene B(4) in a murine model of gout." Arthritis Rheum **64**(2): 474-484.

An, L. L., et al. (2014). "Complement C5a potentiates uric acid crystal-induced IL-1beta production." Eur J Immunol **44**(12): 3669-3679.

Assuncao-Miranda, I., et al. (2010). "Pro-inflammatory response resulting from sindbis virus infection of human macrophages: implications for the pathogenesis of viral arthritis." J Med Virol **82**(1): 164-174.

Bannenberg, G. L., et al. (2005). "Molecular circuits of resolution: formation and actions of resolvins and protectins." J Immunol **174**(7): 4345-4355.

Bardin, T. and P. Richette (2014). "Definition of hyperuricemia and gouty conditions." Curr Opin Rheumatol **26**(2): 186-191.

Bernhagen, J., et al. (1993). "MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxaemia." Nature **365**(6448): 756-759.

Bernhagen, J., et al. (2007). "MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment." Nat Med **13**(5): 587-596.

Blume, K. E., et al. (2012). "Cleavage of annexin A1 by ADAM10 during secondary necrosis generates a monocytic "find-me" signal." J Immunol **188**(1): 135-145.

Calandra, T., et al. (1994). "The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor." J Exp Med **179**(6): 1895-1902.

Calandra, T. and T. Roger (2003). "Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity." Nat Rev Immunol **3**(10): 791-800.

Chen, C. J., et al. (2006). "MyD88-dependent IL-1 receptor signaling is essential for gouty inflammation stimulated by monosodium urate crystals." J Clin Invest **116**(8): 2262-2271.

Chen, Y. H., et al. (2011). "Spontaneous resolution of acute gouty arthritis is associated with rapid induction of the anti-inflammatory factors TGFbeta1, IL-10 and soluble TNF receptors and the intracellular cytokine negative regulators CIS and SOCS3." Ann Rheum Dis **70**(9): 1655-1663.

Chiang, N., et al. (2008). "Anesthetics impact the resolution of inflammation." PLoS One **3**(4): e1879.

Chiang, N., et al. (2013). "Inhaled carbon monoxide accelerates resolution of inflammation via unique proresolving mediator-heme oxygenase-1 circuits." J Immunol **190**(12): 6378-6388.

Choi, H. K., et al. (2005). "Pathogenesis of gout." Ann Intern Med **143**(7): 499-516.

Coelho, F. M., et al. (2008). "The chemokine receptors CXCR1/CXCR2 modulate antigen-induced arthritis by regulating adhesion of neutrophils to the synovial microvasculature." Arthritis Rheum **58**(8): 2329-2337.

D'Acquisto, F., et al. (2008). "Annexin-A1: a pivotal regulator of the innate and adaptive immune systems." Br J Pharmacol **155**(2): 152-169.

Dalli, J., et al. (2013). "Proresolving and tissue-protective actions of annexin A1-based cleavage-resistant peptides are mediated by formyl peptide receptor 2/lipoxin A4 receptor." J Immunol **190**(12): 6478-6487.

Dalli, J., et al. (2012). "Annexin A1 regulates neutrophil clearance by macrophages in the mouse bone marrow." FASEB J **26**(1): 387-396.

Damazo, A. S., et al. (2006). "Spatial and temporal profiles for anti-inflammatory gene expression in leukocytes during a resolving model of peritonitis." J Immunol **176**(7): 4410-4418.

Daryadel, A., et al. (2006). "Apoptotic neutrophils release macrophage migration inhibitory factor upon stimulation with tumor necrosis factor- α ." J Biol Chem **281**(37): 27653-27661.

Daun, J. M. and J. G. Cannon (2000). "Macrophage migration inhibitory factor antagonizes hydrocortisone-induced increases in cytosolic I κ B α ." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **279**(3): R1043-1049.

David, J. R. (1966). "Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction." Proc Natl Acad Sci U S A **56**(1): 72-77.

Dhanda, S., et al. (2011). "A re-look at an old disease: a multimodality review on gout." Clin Radiol **66**(10): 984-992.

Dubois, C. M., et al. (1990). "Transforming growth factor beta is a potent inhibitor of interleukin 1 (IL-1) receptor expression: proposed mechanism of inhibition of IL-1 action." J Exp Med **172**(3): 737-744.

EGgebeen, A. T. (2007). "Gout: an update." Am Fam Physician **76**(6): 801-808.

Englen, M. D., et al. (1995). "Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor is expressed and secreted in cultures of murine L929 cells." J Immunol Methods **184**(2): 281-283.

Flower, R. J. and G. J. Blackwell (1979). "Anti-inflammatory steroids induce biosynthesis of a phospholipase A2 inhibitor which prevents prostaglandin generation." Nature **278**(5703): 456-459.

Fullerton, J. N., et al. (2013). "Pathways mediating resolution of inflammation: when enough is too much." J Pathol **231**(1): 8-20.

Gavins, F. N. and M. J. Hickey (2012). "Annexin A1 and the regulation of innate and adaptive immunity." Front Immunol **3**: 354.

George, M., et al. (2013). "Evaluating appropriate use of prophylactic colchicine for gout flare prevention." Arthritis Care Res (Hoboken).

Gerber, A., et al. (2013). "Gout: a critical analysis of scientific development." Rheumatol Int **33**(11): 2743-2750.

Ghaemi-Oskouie, F. and Y. Shi (2011). "The role of uric acid as an endogenous danger signal in immunity and inflammation." Curr Rheumatol Rep **13**(2): 160-166.

Girol, A. P., et al. (2013). "Anti-inflammatory mechanisms of the annexin A1 protein and its mimetic peptide Ac2-26 in models of ocular inflammation in vivo and in vitro." J Immunol **190**(11): 5689-5701.

Gregory, J. L., et al. (2009). "Independent roles of macrophage migration inhibitory factor and endogenous, but not exogenous glucocorticoids in regulating leukocyte trafficking." Microcirculation **16**(8): 735-748.

Gregory, J. L., et al. (2004). "Reduced leukocyte-endothelial cell interactions in the inflamed microcirculation of macrophage migration inhibitory factor-deficient mice." Arthritis Rheum **50**(9): 3023-3034.

Gregory, J. L., et al. (2006). "Macrophage migration inhibitory factor induces macrophage recruitment via CC chemokine ligand 2." J Immunol **177**(11): 8072-8079.

Guido, B. C., et al. (2013). "Annexin-A1 peptide down-regulates the leukocyte recruitment and up-regulates interleukin-10 release into lung after intestinal ischemia-reperfusion in mice." J Inflamm (Lond) **10**(1): 10.

Hamburger, M., et al. (2011). "2011 Recommendations for the diagnosis and management of gout and hyperuricemia." Postgrad Med **123**(6 Suppl 1): 3-36.

Hannon, R., et al. (2003). "Aberrant inflammation and resistance to glucocorticoids in annexin 1^{-/-} mouse." FASEB J **17**(2): 253-255.

Hornung, V., et al. (2008). "Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization." Nat Immunol **9**(8): 847-856.

Kamaly, N., et al. (2013). "Development and in vivo efficacy of targeted polymeric inflammation-resolving nanoparticles." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(16): 6506-6511.

Kingsbury, S. R., et al. (2011). "The role of the NLRP3 inflammasome in gout." J Inflamm Res **4**: 39-49.

Klasen, C., et al. (2014). "MIF promotes B cell chemotaxis through the receptors CXCR4 and CD74 and ZAP-70 signaling." J Immunol **192**(11): 5273-5284.

Kollias, G., et al. (2011). "Animal models for arthritis: innovative tools for prevention and treatment." Ann Rheum Dis **70**(8): 1357-1362.

Krishnan, E. and L. Chen (2013). "Trends in physician diagnosed gout and gout therapies in the US: results from the national ambulatory health care surveys 1993 to 2009." Arthritis Res Ther **15**(6): R181.

Kuo, C. F., et al. (2015). "Rising burden of gout in the UK but continuing suboptimal management: a nationwide population study." Ann Rheum Dis **74**(4): 661-667.

Leech, M., et al. (1999). "Macrophage migration inhibitory factor in rheumatoid arthritis: evidence of proinflammatory function and regulation by glucocorticoids." Arthritis Rheum **42**(8): 1601-1608.

Leech, M., et al. (1998). "Involvement of macrophage migration inhibitory factor in the evolution of rat adjuvant arthritis." Arthritis Rheum **41**(5): 910-917.

Leng, L., et al. (2003). "MIF signal transduction initiated by binding to CD74." J Exp Med **197**(11): 1467-1476.

Liu-Bryan, R., et al. (2005). "Innate immunity conferred by Toll-like receptors 2 and 4 and myeloid differentiation factor 88 expression is pivotal to monosodium urate monohydrate crystal-induced inflammation." Arthritis Rheum **52**(9): 2936-2946.

Liu, M. and C. Hu (2012). "Association of MIF in serum and synovial fluid with severity of knee osteoarthritis." Clin Biochem **45**(10-11): 737-739.

Lubetsky, J. B., et al. (2002). "The tautomerase active site of macrophage migration inhibitory factor is a potential target for discovery of novel anti-inflammatory agents." J Biol Chem **277**(28): 24976-24982.

Maderna, P., et al. (2005). "Modulation of phagocytosis of apoptotic neutrophils by supernatant from dexamethasone-treated macrophages and annexin-derived peptide Ac(2-26)." J Immunol **174**(6): 3727-3733.

Martin, W. J., et al. (2009). "Resident macrophages initiating and driving inflammation in a monosodium urate monohydrate crystal-induced murine peritoneal model of acute gout." Arthritis Rheum **60**(1): 281-289.

Martinon, F. (2010). "Mechanisms of uric acid crystal-mediated autoinflammation." Immunol Rev **233**(1): 218-232.

Martinon, F., et al. (2006). "Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome." Nature **440**(7081): 237-241.

Meazza, C., et al. (2002). "Macrophage migration inhibitory factor in patients with juvenile idiopathic arthritis." Arthritis Rheum **46**(1): 232-237.

Mitroulis, I., et al. (2013). "Neutrophils, IL-1beta, and gout: is there a link?" Semin Immunopathol **35**(4): 501-512.

Moller, K. A., et al. (1998). "Assessing mechanical allodynia in the rat paw with a new electronic algometer." J Neurosci Methods **84**(1-2): 41-47.

Morand, E. F., et al. (2006). "Regulation of annexin I in rheumatoid synovial cells by glucocorticoids and interleukin-1." Mediators Inflamm **2006**(2): 73835.

Ng, G., et al. (2008). "Receptor-independent, direct membrane binding leads to cell-surface lipid sorting and Syk kinase activation in dendritic cells." Immunity **29**(5): 807-818.

Nuki, G. and P. A. Simkin (2006). "A concise history of gout and hyperuricemia and their treatment." Arthritis Res Ther **8 Suppl 1**: S1.

Onodera, S., et al. (2004). "Macrophage migration inhibitory factor up-regulates the expression of interleukin-8 messenger RNA in synovial fibroblasts of rheumatoid arthritis patients: common transcriptional regulatory mechanism between interleukin-8 and interleukin-1beta." Arthritis Rheum **50**(5): 1437-1447.

Onodera, S., et al. (1999). "High expression of macrophage migration inhibitory factor in the synovial tissues of rheumatoid joints." Cytokine **11**(2): 163-167.

Patel, H. B., et al. (2012). "The impact of endogenous annexin A1 on glucocorticoid control of inflammatory arthritis." Ann Rheum Dis **71**(11): 1872-1880.

Pederzoli-Ribeil, M., et al. (2010). "Design and characterization of a cleavage-resistant Annexin A1 mutant to control inflammation in the microvasculature." Blood **116**(20): 4288-4296.

Perez-Ruiz, F., et al. (2014). "Clinical Manifestations and Diagnosis of Gout." Rheum Dis Clin North Am **40**(2): 193-206.

Perretti, M. (2003). "The annexin 1 receptor(s): is the plot unravelling?" Trends Pharmacol Sci **24**(11): 574-579.

Perretti, M. and F. D'Acquisto (2009). "Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation." Nat Rev Immunol **9**(1): 62-70.

Pinho, V., et al. (2007). "Tissue- and stimulus-dependent role of phosphatidylinositol 3-kinase isoforms for neutrophil recruitment induced by chemoattractants in vivo." J Immunol **179**(11): 7891-7898.

Popa-Nita, O. and P. H. Naccache (2010). "Crystal-induced neutrophil activation." Immunol Cell Biol **88**(1): 32-40.

Punzi, L., et al. (2012). "Gout as autoinflammatory disease: new mechanisms for more appropriated treatment targets." Autoimmun Rev **12**(1): 66-71.

Queiroz-Junior, C. M., et al. (2011). "Experimental arthritis triggers periodontal disease in mice: involvement of TNF-alpha and the oral Microbiota." J Immunol **187**(7): 3821-3830.

Reber, L. L., et al. (2014). "Mast cell-derived IL-1beta contributes to uric acid crystal-induced acute arthritis in mice." Arthritis Rheumatol.

Richette, P., et al. (2014). "Improving cardiovascular and renal outcomes in gout: what should we target?" Nat Rev Rheumatol **10**(11): 654-661.

Robinson, P. C. and S. Horsburgh (2014). "Gout: joints and beyond, epidemiology, clinical features, treatment and co-morbidities." Maturitas **78**(4): 245-251.

Robinson, P. C., et al. (2013). "Hospital admissions associated with gout and their comorbidities in New Zealand and England 1999-2009." Rheumatology (Oxford) **52**(1): 118-126.

Rock, K. L., et al. (2013). "Uric acid as a danger signal in gout and its comorbidities." Nat Rev Rheumatol **9**(1): 13-23.

Roddy, E. and H. K. Choi (2014). "Epidemiology of gout." Rheum Dis Clin North Am **40**(2): 155-175.

Roger, T., et al. (2005). "Macrophage migration inhibitory factor promotes innate immune responses by suppressing glucocorticoid-induced expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1." Eur J Immunol **35**(12): 3405-3413.

Rose, D. M. and R. Liu-Bryan (2006). "Innate immunity in triggering and resolution of acute gouty inflammation." Curr Rheumatol Rep **8**(3): 209-214.

Sachs, D., et al. (2011). "Cooperative role of tumour necrosis factor-alpha, interleukin-1beta and neutrophils in a novel behavioural model that concomitantly demonstrates articular inflammation and hypernociception in mice." Br J Pharmacol **162**(1): 72-83.

Santos, L. L., et al. (2011). "Macrophage migration inhibitory factor regulates neutrophil chemotactic responses in inflammatory arthritis in mice." Arthritis Rheum **63**(4): 960-970.

Santos, L. L. and E. F. Morand (2009). "Macrophage migration inhibitory factor: a key cytokine in RA, SLE and atherosclerosis." Clin Chim Acta **399**(1-2): 1-7.

Scannell, M. and P. Maderna (2006). "Lipoxins and annexin-1: resolution of inflammation and regulation of phagocytosis of apoptotic cells." ScientificWorldJournal **6**: 1555-1573.

Schiff, M. H. (2000). "Role of interleukin 1 and interleukin 1 receptor antagonist in the mediation of rheumatoid arthritis." Ann Rheum Dis **59 Suppl 1**: i103-108.

Scott, P., et al. (2006). "Engagement of CD14 mediates the inflammatory potential of monosodium urate crystals." J Immunol **177**(9): 6370-6378.

Serhan, C. N., et al. (2007). "Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms." FASEB J **21**(2): 325-332.

Shi, X., et al. (2006). "CD44 is the signaling component of the macrophage migration inhibitory factor-CD74 receptor complex." Immunity **25**(4): 595-606.

Shi, Y., et al. (2003). "Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells." Nature **425**(6957): 516-521.

Shi, Y., et al. (2010). "Monosodium urate crystals in inflammation and immunity." Immunol Rev **233**(1): 203-217.

Singh, J. A. (2013). "Racial and gender disparities among patients with gout." Curr Rheumatol Rep **15**(2): 307.

Smith, S. F., et al. (1990). "Detection of lipocortin 1 in human lung lavage fluid: lipocortin degradation as a possible proteolytic mechanism in the control of inflammatory mediators and inflammation." Environ Health Perspect **85**: 135-144.

So, A., et al. (2007). "A pilot study of IL-1 inhibition by anakinra in acute gout." Arthritis Res Ther **9**(2): R28.

Solito, E., et al. (2003). "A novel calcium-dependent proapoptotic effect of annexin 1 on human neutrophils." FASEB J **17**(11): 1544-1546.

Sousa, L. P., et al. (2013). "Pharmacological strategies to resolve acute inflammation." Curr Opin Pharmacol **13**(4): 625-631.

Sousa, L. P., et al. (2010). "PDE4 inhibition drives resolution of neutrophilic inflammation by inducing apoptosis in a PKA-PI3K/Akt-dependent and NF-kappaB-independent manner." J Leukoc Biol **87**(5): 895-904.

Souza, D. G., et al. (2007). "The required role of endogenously produced lipoxin A4 and annexin-1 for the production of IL-10 and inflammatory hyporesponsiveness in mice." J Immunol **179**(12): 8533-8543.

Steiger, S. and J. L. Harper (2013). "Neutrophil cannibalism triggers transforming growth factor beta1 production and self regulation of neutrophil inflammatory function in

monosodium urate monohydrate crystal-induced inflammation in mice." Arthritis Rheum **65**(3): 815-823.

Steiger, S. and J. L. Harper (2014). "Mechanisms of spontaneous resolution of acute gouty inflammation." Curr Rheumatol Rep **16**(1): 392.

Sun, Y., et al. (2013). "Macrophage migration inhibitory factor counter-regulates dexamethasone-induced annexin 1 expression and influences the release of eicosanoids in murine macrophages." Immunology **140**(2): 250-258.

Toh, M. L., et al. (2006). "Regulation of IL-1 and TNF receptor expression and function by endogenous macrophage migration inhibitory factor." J Immunol **177**(7): 4818-4825.

Trentin, P. G., et al. (2015). "Annexin A1 mimetic peptide controls the inflammatory and fibrotic effects of silica particles in mice." Br J Pharmacol **172**(12): 3058-3071.

Tsao, F. H., et al. (1998). "Degradation of annexin I in bronchoalveolar lavage fluid from patients with cystic fibrosis." Am J Respir Cell Mol Biol **18**(1): 120-128.

Turner, M., et al. (1991). "Induction of the interleukin 1 receptor antagonist protein by transforming growth factor-beta." Eur J Immunol **21**(7): 1635-1639.

Vago, J. P., et al. (2012). "Annexin A1 modulates natural and glucocorticoid-induced resolution of inflammation by enhancing neutrophil apoptosis." J Leukoc Biol **92**(2): 249-258.

Vago, J. P., et al. (2015). "The role and effects of glucocorticoid-induced leucine zipper in the context of inflammation resolution." J Immunol **194**(10): 4940-4950.

VanItallie, T. B. (2010). "Gout: epitome of painful arthritis." Metabolism **59 Suppl 1**: S32-36.

Vieira, A. T., et al. (2013). "The role of probiotics and prebiotics in inducing gut immunity." Front Immunol **4**: 445.

Vong, L., et al. (2007). "Annexin 1 cleavage in activated neutrophils: a pivotal role for proteinase 3." J Biol Chem **282**(41): 29998-30004.

Walther, A., et al. (2000). "A novel ligand of the formyl peptide receptor: annexin I regulates neutrophil extravasation by interacting with the FPR." Mol Cell **5**(5): 831-840.

Yagnik, D. R., et al. (2004). "Macrophage release of transforming growth factor beta1 during resolution of monosodium urate monohydrate crystal-induced inflammation." Arthritis Rheum **50**(7): 2273-2280.

Yan, Y., et al. (2013). "Omega-3 fatty acids prevent inflammation and metabolic disorder through inhibition of NLRP3 inflammasome activation." Immunity **38**(6): 1154-1163.

Yang, Y. H., et al. (2013). "Annexin A1: potential for glucocorticoid sparing in RA." Nat Rev Rheumatol **9**(10): 595-603.

Yang, Y. H., et al. (2004). "Modulation of inflammation and response to dexamethasone by Annexin 1 in antigen-induced arthritis." Arthritis Rheum **50**(3): 976-984.

Yazid, S., et al. (2012). "Anti-inflammatory drugs, eicosanoids and the annexin A1/FPR2 anti-inflammatory system." Prostaglandins Other Lipid Mediat **98**(3-4): 94-100.

Zhu, Y., et al. (2011). "Prevalence of gout and hyperuricemia in the US general population: the National Health and Nutrition Examination Survey 2007-2008." Arthritis Rheum **63**(10): 3136-3141.

Zouki, C., et al. (2000). "The anti-inflammatory peptides, antinflammins, regulate the expression of adhesion molecules on human leukocytes and prevent neutrophil adhesion to endothelial cells." FASEB J **14**(3): 572-580.

ANEXO 1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 165/2008**, relativo ao projeto intitulado "**Cristais de ácido úrico monossódico induzem hipernocicepção articular em camundongos: participação dos mediadores inflamatórios no modelo experimental de gota articular aguda**", que tem como responsável(is) **Danielle da Glória de Souza**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **24/ 09/2008**.

Este certificado expira-se em **24/ 09/ 2013**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 165/2008**, related to the project entitled "**Monosodium urate crystals induced joint hypernociception in mice: the participation of inflammatory mediators in an experimental model of articular acute gout**", under the supervisors of **Danielle da Glória de Souza**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **September 24, 2008**.

This certificate expires in **September 24, 2013**.


Belo Horizonte, 30 de Setembro de 2008.

Prof. Humberto Pereira Oliveira
Coordenador do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4532
www.ufmg.br/nioetica/cetea - cetea@pmpg.ufmg.br

(Mod.Cert. v1.0)

ANEXO 2

 UFMG	UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS CEUA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
CERTIFICADO Certificamos que o Protocolo nº. 2 / 2015, relativo ao projeto intitulado "ESTUDO DA RESOLUÇÃO E DA INFLAMAÇÃO INDUZIDA POR CRISTAIS DE ÁCIDO ÚRICO EM UM MODELO DE GOTA AGUDA EM CAMUNDONGOS", que tem como responsável Flávio Almeida Amaral, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 28/04/2015. Este certificado espira-se em 28/04/2020.	
CERTIFICATE We hereby certify that the Protocol nº. 2 / 2015, related to the Project entitled "STUDY OF RESOLUTION AND THE INFLAMMATION INDUCED BY MONOSSODIUM URATE CRYSTALS IN A MODEL OF ACUTE GOUT IN MICE", under the supervision of Flávio Almeida Amaral, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 28/04/2015. This certificates expires in 28/04/2020.	
Cleuza Maria de Faria Rezende Coordenador(a) da CEUA/UFMG Belo Horizonte, 28/04/2015.	
Atenciosamente.	
Sistema CEUA-UFMG https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/	
Universidade Federal de Minas Gerais Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005 31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592 www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br	

ANEXO 3

Beneficial Microbes

Decision Letter (BM-2015-02-0015.R2)**From:** editor-in-chief@beneficialmicrobes.org**To:** flaviano@icb.ufmg.br**CC:****Subject:** Beneficial Microbes - Decision on Manuscript ID BM-2015-02-0015.R2**Body:** 04-May-2015

Dear Dr. Martins,

I am pleased to inform you that your manuscript entitled "Oral treatment with *Bifidobacterium longum* 5^{1A} reduced inflammation in a murine experimental model of gout" is accepted for publication in Beneficial Microbes, under condition that no problems arise during the editing stage at the publisher. The comments of the reviewer(s) who reviewed your manuscript are included at the foot of this letter.

I also would like to draw your attention to the possibility of publishing your manuscript as 'open access' for 1800 Euro in Beneficial Microbes. With open access, your article will be free available online for everyone. Open access publishing significantly increases the exposure and citation of your work. Often research grants have funding available for dissemination of the results of the research.

Note that that the publisher needs a signed Copyright Transfer Agreement (CTA) from the first or the corresponding author before the manuscript can be published. Please fax (+31 317 453417) or send the CTA by email to the publisher (bm@wageningenacademic.com) as soon as possible if you have not done already. For your convenience a blank CTA is attached to this email.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of the Beneficial Microbes, we look forward to your continued contributions to the Journal. Beneficial Microbes has a First Impact Factor of 1.5 (2013 Journal Citation Report, Thomson Reuters 2014).

Sincerely,

Dr. Koen Venema
Editor in Chief, Beneficial Microbes
editor-in-chief@beneficialmicrobes.org

Reviewer(s)' Comments to Author:

Additional Section Editor Comments to Author:

Section Editor
Comments to the Author:
(There are no comments.)

Date Sent: 04-May-2015**File 1:** [* CTA-Beneficial-Microbes.doc](#)

Beneficial Microbes



Oral treatment with *Bifidobacterium longum* 5^{1A} reduced inflammation in a murine experimental model of gout

Journal:	<i>Beneficial Microbes</i>
Manuscript ID:	BM-2015-02-0015.R2
Manuscript Type:	Research article
Date Submitted by the Author:	02-May-2015
Complete List of Authors:	Vieira, Angélica; Federal University of Minas Gerais, Biochemistry and Immunology; Federal University of Minas Gerais, Microbiology Galvao, Izabela; Federal University of Minas Gerais, Biochemistry and Immunology Amaral, Flávio; Federal University of Minas Gerais, Biochemistry and Immunology Teixeira, Mauro M.; Federal University of Minas Gerais, Biochemistry and Immunology Nicoli, Jacques; Federal University of Minas Gerais, Microbiology Martins, Flaviano; Federal University of Minas Gerais, Microbiology
Keywords:	B. longum, inflammation, probiotics, gout

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1 **Research article**

2
3
4 **Oral treatment with *Bifidobacterium longum* 5^{1A} reduced inflammation**
5 **in a murine experimental model of gout**

6
7 *A.T. Vieira^{1,2,*}, I. Galvão^{2,*}, F.A. Amaral², M.M. Teixeira², J.R. Nicoli¹ and F.S.*
8 *Martins^{1,#}*

9
10 ¹*Department of Microbiology, Institute of Biological Sciences, Federal University of*
11 *Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil*

12 ²*Department of Biochemistry and Immunology, Institute of Biological Sciences, Federal*
13 *University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil*

14
15
16 *Both authors contributed equally to this work.

17
18
19 Running headline: Probiotic benefits in gout

20
21
22 #Correspondence: Prof. Flaviano S. Martins, PhD, Laboratório de Agentes
23 Bioterapêuticos, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas,
24 Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Presidente Antônio Carlos, 6627, C.P.
25 486, Pampulha - Campus UFMG, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brasil. Tel: +55 31
26 3409 2738, Fax: +55 31 3409 2730. E-mail: flaviano@icb.ufmg.br

27

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

28 **Abstract**

29

30 Gout is an acute inflammatory disease characterized by the presence of uric acid
31 crystals in the joint. This event promotes neutrophil infiltration and activation that leads
32 to tissue damage. We investigated here whether the oral administration of the probiotic
33 strain *Bifidobacterium longum* 5^{1A} (BL) could ameliorate monosodium urate crystal
34 (MSU)-induced inflammation in a murine model of gout. Mice received oral
35 administration of BL or saline daily for 7 days and then were injected with MSU in the
36 knee cavity. Treatment with BL significantly alleviated the inflammatory parameters, as
37 seen by reduced hypernociception, reduced neutrophil accumulation in the joint and
38 myeloperoxidase activity (MPO) in periarticular tissue. There was inhibition of the
39 production of CXCL1 and IL-1 β in joints. Levels of the anti-inflammatory cytokine IL-
40 10 were significantly higher in the knee tissue of mice treated with than control mice
41 injected with MSU. In conclusion, oral BL treatment reduced the inflammatory
42 response in an experimental murine model of gout, suggesting it may be useful as an
43 adjuvant treatment in patients with gout.

44

45 **Keywords:** probiotics, *Bifidobacterium*, inflammation, gout

46

Peer Review

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
6047 **Introduction**

48
49 Gout is an inflammatory disease that can affect both men and women and that is caused
50 by deposition of monosodium urate (MSU) crystals in joints (Harrold *et al.*, 2006). The
51 prevalence of this disease has been increasing over the years, and both genetic and diet
52 are important risk factors associated with gout development (Bardin and Richette, 2014;
53 Robinson and Horsburgh, 2014; Roddy and Choi, 2014). Acute gout flares are usually
54 extremely painful and the inflammation response usually resolves spontaneously in a
55 few days. However, inadequate inflammatory resolution and repeated episodes of acute
56 gout may lead to irreversible tissue damage. The intense joint pain can be debilitating
57 and affect the occupational function of patients (Robinson and Horsburgh, 2014).
58 The injection of MSU crystals in the knee joint of mice may stimulate leucocytes to
59 release the active form of the inflammatory cytokine IL-1 β (Amaral *et al.*, 2012;
60 Martinon *et al.*, 2006). The release of IL-1 β in gout is pivotal for downstream
61 stimulation of synovial cells, release of chemoattractants, recruitment of inflammatory
62 cells and progressive tissue damage (Amaral *et al.*, 2012; Hachicha *et al.*, 1995; Martin
63 *et al.*, 2009; Terkeltaub and Ginsberg, 1988). Neutrophils are crucial for the
64 pathogenesis of gout (Terkeltaub, 2009) and their timely removal is essential for the
65 resolution of inflammation and avoidance of tissue injury (Busso and So, 2010; Martin
66 and Harper, 2010; Perez *et al.*, 2014). Several treatment strategies may be used to
67 control the high levels of uric acid and thereby prevent crystal formation and gout
68 attacks (Rees *et al.*, 2014). Treatment is not effective in all patients, especially those
69 with long standing hyperuricemia and gout.
70 There is a large set of evidence showing the influence of gut microbiota on the
71 development and maintenance of innate and adaptive immune responses (Arpaia *et al.*,
72 2013; Maslowski *et al.*, 2009; Vieira *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2010). In the therapeutic
73 panorama, this raises the possibility of using gut commensal bacteria as probiotics to
74 modify the systemic inflammatory response. Probiotics are defined as “live
75 microorganisms, which, when administered in adequate amounts, confer a health benefit
76 on the host” (Reid *et al.*, 2003). Most probiotics are commensal bacteria from the
77 human gut, including bifidobacteria and lactic acid bacteria, which have been shown to
78 modulate the immune system locally and systematically (Vieira *et al.*, 2013).
79 *Bifidobacterium longum* 5^{1A} has been isolated from the feces of a healthy child and
80 selected as a candidate for probiotic use based on *in vitro* (Souza *et al.*, 2013) and *in*
81 *vivo* criteria (Souza *et al.*, 2012), and in a clinical trial (Guerra *et al.*, 2011). The
82 beneficial effects of *B. longum* 5^{1A} as an anti-inflammatory probiotic have been
83 demonstrated before (Souza *et al.*, 2012; Souza *et al.*, 2013). Therefore, in the present
84 study, we aimed to investigate the potential beneficial effects of oral administration of
85 the probiotic *B. longum* 5^{1A} in a model of inflammation induced by injection of MSU
86 crystals in the knee joint of mice.

87

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
6088 **Materials and methods**

89

90 *Animals*

91

92 Eight-to-ten-week-old male C57BL/6J (wild type) mice were purchased from the Center
93 for Bioterism of the Federal University of Minas Gerais (UFMG) in Belo Horizonte,
94 MG, Brazil. Water and commercial autoclavable diet (Nuvital, Curitiba, PR, Brazil)
95 were sterilized by steam and offered *ad libitum* to animals which were maintained in a
96 ventilated animal caging system (Alesco Ltda., Campinas, SP, Brazil) with controlled
97 lighting (12 h light, 12 h dark) and temperature ($22.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$). All experimental
98 procedures were carried out according to the standards set forth by the Brazilian Society
99 of Laboratory Animal Science/Brazilian College for Animal Experimentation
100 (SBCAL/COBEA, 2006. Available at: <http://www.cobea.org.br/>). The study was
101 approved by the Ethics Committee in Animal Experimentation of the UFMG (CETEA
102 165/2008).

103

104 *Oral treatment with Bifidobacterium longum*

105

106 *Bifidobacterium longum* 5^{1A} (BL) used in this experiment was isolated from the feces of
107 a healthy child, identified by Multiplex PCR and belongs to the culture collection of the
108 Laboratory of Ecology and Physiology of Microorganisms, UFMG, Belo Horizonte,
109 MG, Brazil. The bacterium was grown in De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) broth
110 medium (Difco, Sparks, MD, USA) for 48 hours in an anaerobic chamber (Forma
111 Scientific Company, Marietta, OH, USA,) containing an atmosphere of 85% N₂, 10%
112 H₂ and 5 %CO₂, at 37°C. A single daily dose of 0.1 ml containing 10⁸ colony-forming
113 units (CFU) was administrated by intragastric gavage to each mouse during 7 days prior
114 to monosodium urate (MSU) crystals injection. A control group received intragastrically
115 phosphate buffer saline (PBS).

116

117 *Experimental model*

118

119 After anesthesia (60:80 mg/kg ketamine:xylazine; i.p. Syntec, São Paulo, Brazil), mice
120 were injected with MSU crystals (100 µg) into the tibio-femoral joint. Inflammation
121 parameters were evaluated at different time points after MSU crystals injection (6 and
122 15 hours). A control group was injected with PBS.

123

124 *Experimental design*

125

126 Four groups of 6-7 mice each were evaluated: 1) Control group injected with PBS
127 (PBS); 2) Control group injected with PBS and orally treated with *B. longum* (PBS +
128 BL); 3) Group injected with MSU crystals and orally treated with PBS (MSU); and 4)
129 Group injected with MSU crystals and orally treated with *B. longum* (MSU + BL). All
130 mice were sacrificed by cervical dislocation, and the knee articular cavity was removed
131 and washed with PBS containing 3% bovine serum albumin (2 x 5 µL) for cell counts.
132 Leukocytes from the articular cavity were determined in a Neubauer chamber after
133 staining with Turk's solution. Differential counts were performed in Cytospin (Shandon
134 III, Thermo Shandon, Frankfurt, Germany) preparations by evaluating the percentage of
135 each leukocyte on a slide stained with May-Grunwald-Giemsa. Periarticular tissue was
136 removed from the joints for cytokine and chemokine evaluation and myeloperoxidase
137 activity.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

138

Evaluation of hypernociception

139

140

141 Evaluation of mechanical hypernociception was performed as previously described
142 (Sachs *et al.*, 2011), using an electronic pressure meter (INSIGHT Instruments, Ribeirão
143 Preto, São Paulo, Brazil). The flexion-elicited withdrawal threshold was used to infer
144 behavioral responses associated with pain. Mice under pain tolerate lower pressure.
145 Results are expressed as mean measurements (in gram).

146

Cytokine and chemokine determination

147

148

149 Periarticular knee tissue were collected and homogenized in PBS containing anti-
150 proteases (0.1 mM PMSF, 0.1 mM benzethonium chloride, 10 mM EDTA, and 20
151 Kallikrein Inhibitor Units of aprotinin A - all purchased from Sigma-Aldrich, St. Louis,
152 MO, USA) and 0.05% Tween 20 (Sigma-Aldrich), as previously described (Coelho *et al.*,
153 2008). Samples were homogenized and the supernatant was used for cytokine and
154 chemokine concentrations measured by ELISA in accordance with the manufacturer's
155 Kit instructions (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

156

Quantification of neutrophil tissue accumulation by myeloperoxidase (MPO) activity measurement

157

158

159

160 The extent of neutrophils accumulation in the periarticular knee tissue was measured by
161 assaying myeloperoxidase (MPO) activity, as previously described (Amaral *et al.*, 2012;
162 Vieira *et al.* 2015). This enzyme is present at a high specific activity within neutrophils.
163 Briefly, the tissue was removed and snap-frozen in liquid nitrogen. Upon thawing, the
164 tissue (100 mg) was homogenized with 1.9 mL buffer (0.1 M NaCl, 0.02 M NaH₂PO₄
165 1H₂O, 0.015 M Na₂-EDTA, pH 4.7) and centrifuged at 3,000 g for 10 minutes at 4°C.
166 The supernatant was discarded and the precipitate was subjected to hypotonic lysis.
167 After further centrifugation, the precipitate was resuspended in a 0.05 M NaH₂PO₄
168 buffer (pH 5.4) containing 0.5% hexadecyltrimethyl-ammonium bromide (HTAB)
169 (Sigma-Aldrich), frozen three times in liquid nitrogen, and centrifuged at 4°C at 3,000 g
170 for 10 minutes, and homogenates supernatants were stored at -20°C until used for MPO
171 assay. The assay used 25 µL of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB; Sigma Chemical
172 Co.), dissolved in dimethyl sulfoxide (Merck, Rahway, NJ) in a final concentration of
173 1.6 mM, 100 µL H₂O₂, dissolved in phosphate buffer (0.05 M Na₃PO₄, 0.5% HETAB,
174 pH 5.4) in a final concentration of 0.003% v/v and 25 µL of supernatant from tissue
175 sample processing. The reaction was started at 37°C for 5 minutes in a 96-well
176 microplate by adding the supernatant and the TMB solution. After that, H₂O₂ was
177 added, and the mixture incubated at 37°C for 5 minutes. The reaction was stopped by
178 adding 100 µL of 4 M H₂SO₄ and was quantified at 450 nm in a spectrophotometer. The
179 neutrophil content was calculated from a standard curve based on MPO activity
180 expressed as absorbance increase at 450 nm from 5% casein peritoneal-induced
181 neutrophils assayed in parallel. We used casein-elicited neutrophils from mice to
182 construct the standard curves. Under the conditions described here, the MPO assay
183 failed to detect macrophages obtained from the peritoneal cavity of thioglycollate-
184 treated mice and processed the same way.

185

Statistical analysis

186

187

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

188 All experiments were repeated at least three times. Data were expressed as means \pm
189 standard error and analysis performed using the statistical software GraphPad Prism
190 5.00 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Differences between means were
191 evaluated using analysis of variance (ANOVA test), followed by Newman-Keuls test.
192 Results with $p < 0.05$ were considered significant.
193

For Peer Review

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60194 **Results**195
196 *Oral B. longum 5^{1A} treatment decreased hypernociception and leukocyte accumulation*
197 *induced by MSU crystals*198
199 First, joint dysfunction was evaluated by measuring the hypernociceptive response of
200 mice to MSU injection. We have previously described that the injection of 100 µg of
201 MSU crystals induces a hypernociceptive response, a clinical marker of pain in animals,
202 characterized by a decrease of the withdrawal threshold in response to mechanical
203 stimulation of the inflamed limb (Amaral *et al.*, 2012). This increase of
204 hypernociception was observed 15 hours after MSU injection (Figure 1). Treatment
205 with BL greatly decreased hypernociception to values observed in the PBS group
206 (Figure 1).207 Next, we investigated if oral treatment with BL could reduce the joint inflammation
208 induced by MSU crystals. As presented in Figure 2, MSU injection induced an influx of
209 leukocyte to the joint starting after 6 hours and peaking 15 hours post injection (Figure
210 2A). This infiltrate was predominantly constituted of neutrophils as determined by
211 differential count (Figure 2B). It have been described that neutrophils are the pathologic
212 hallmark of inflammation induced by MSU crystals (Amaral *et al.*, 2012; Popa-Nita and
213 Naccache, 2010). When we gave mice a preparation of BL by oral gavage 7 days prior
214 to MSU challenge, there was a demonstrable decrease in the total numbers of leukocytes
215 (Figure 2A), basically due to reduced neutrophil recruitment to the knee cavity (Figure
216 2B). Altogether, these results show that previous oral BL treatment improved the
217 clinical parameters in the experimental murine model of gout, as demonstrated by the
218 reduction of hypernociception and leukocyte recruitment.219
220 *Oral B. longum 5^{1A} treatment reduces myeloperoxidase activity and production of pro-*
221 *inflammatory mediators but induces high production of anti-inflammatory cytokines in*
222 *gouty mice*223
224 In order to confirm if oral BL treatment reduced inflammatory parameters associated
225 with the neutrophil influx seen in gout, we investigated the MPO activity and
226 production of some cytokines. Oral BL treatment reduced the MPO activity in the
227 periarticular tissue 6 and 15 hours after MSU injection (Figure 3) corroborating with the
228 reduction of neutrophils accumulation into the articular cavity (Figure 2B). We also
229 investigated the production of the pro-inflammatory mediators CXCL1 and IL-1β and
230 the anti-inflammatory mediator IL-10 (Figure 4). MSU crystal increased the levels of
231 CXCL1 and IL-1β in the periarticular knee tissue of mice 6 and 15 hours after injection.
232 These high levels are associated with neutrophil recruitment 6 and 15 hours after the
233 challenge observed in the previous figures. Although oral treatment with BL induced
234 higher levels of CXCL1 at 6 hours comparing to untreated mice (Figure 4A), these
235 levels dropped significantly 15 hours after MSU crystals injection in the MSU + BL
236 group (Figure 4A). Similar results were found for IL-1β levels in the periarticular knee
237 tissue of the same group of mice (Figure 4B). High levels of IL-1β were also observed
238 after 6 hours in the MSU + BL group, but these levels similarly reduced rapidly 15
239 hours after the injection when compared to the MSU group (Fig. 4B).240 Interestingly, mice treated with BL showed higher levels of the anti-inflammatory IL-10
241 cytokine after 6 hours of MSU injection when compared to the MSU group (Figure 4C)
242 although there was no difference at 15 hours. Increased levels of IL-10 are generally
243 associated with spontaneous resolution of gout (Chen *et al.*, 2011), whereas reduction of

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

244 IL-1 β levels are associated with a decrease of inflammatory and hypernociception
245 response (Amaral *et al.*, 2012). Altogether, these data suggest that oral BL treatment
246 might induce the resolution of the inflammatory response induced by MSU crystals.
247

For Peer Review

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60248 **Discussion**

249

250 The present study evaluated the effects of prophylactic administration of
251 *Bifidobacterium longum* 5^{1A} in a model of gout in mice. Our findings showed that daily
252 oral treatment with *B. longum* 5^{1A} for seven days reduced inflammation by decreasing
253 the number of inflammatory leukocytes recruited to the joint, reduced levels of pro-
254 inflammatory cytokines and hypernociception induced by injection of MSU crystals in
255 the knee joint. It was also found that such treatment increased the levels of the anti-
256 inflammatory cytokine IL-10 in the knee tissue.

257 Gout is the most prevalent form of inflammatory arthritis and is associated with
258 impaired quality of life and development of the metabolic syndrome (Lee *et al.*, 2009;
259 Roddy *et al.*, 2007b). The prevalence of the disease has risen within the last decades,
260 rendering gout an important health care issue. This increase could be attributed to
261 various factors including increase in longevity, lifestyle and dietary modifications
262 (Roddy *et al.*, 2007a). Although there are some treatment modalities for acute gout
263 episodes, this disease still represents a substantial health issue and dietary therapy
264 emerges as a new promising alternative. The association between gout and dietary
265 factors has been recognized for centuries but only recently this has been confirmed by
266 epidemiological studies (Roddy and Doherty, 2010). Another factor influenced by both
267 dietary modifications and arthritis development is the gut microbiota (Maslowski and
268 Mackay, 2011). Altered gut microbiota (dysbiosis) has been found in patients with
269 arthritis (Eerola *et al.*, 1994) and the use of gnotobiotic animals also confirmed the role
270 of gut microbial communities in arthritis development (Scher and Abramson, 2011).
271 Probiotics seem to be capable of normalizing gut microbiota in a beneficial way in
272 situations of dysbiosis, as well as to have anti-inflammatory properties, not only locally
273 in the gut but also systematically (Homayouni Rad *et al.*, 2013). Additionally, clinical
274 trials showed that treatment with probiotics in arthritis reduced disease activity
275 (Hatakka *et al.*, 2003; Pineda Mde *et al.*, 2011).

276 Bacteria pertaining to the genus *Bifidobacterium* are important constituents of the
277 indigenous microbiota of the human gut and their well-known beneficial effects on the
278 health of the human gastrointestinal tract explain its widely use as probiotics to prevent
279 and/or to treat intestinal disorders (Picard *et al.*, 2005; Vieira *et al.*, 2013). Interestingly,
280 *Bifidobacterium* fecal levels have been found reduced in arthritic rats (Vaahtovuori *et al.*,
281 2008) and administration of a *Bifidobacterium bifidum* strain produced a significant
282 reduction of inflammatory biomarkers with simultaneous colonization of bifidobacteria
283 in the colon (Al-Okbi, 2011). To explain this effect, Fukuda *et al.* (Fukuda *et al.*, 2011)
284 proposed recently a mechanism involving the production of short chain fatty acids
285 (SCFA) by these bacteria. Our group has previously demonstrated that acetate, the
286 mostly abundant SCFA produced by fermentable commensal bacteria in the gut, had
287 anti-inflammatory effects in many chronic diseases such as, asthma, colitis and also
288 arthritis (Maslowski *et al.*, 2009). Although, we did not explore in the current study the
289 effects of such metabolites produced by BL, this may be an alternative mechanism by
290 how this bacterium could be acting in the gout model used here. A probable underlying
291 mechanism through which probiotics affect systemic immunity is also through the
292 interaction with microorganism associated molecular patterns and pattern recognition
293 receptors (MAMPs and PRRs, respectively) and others receptors such as, G-coupled
294 protein receptors 43 (Lebeer *et al.*, 2010; Vieira *et al.*, 2013). These findings put
295 forward the ability of oral treatment with probiotic to diseases that occur outside the gut.
296 However, the immunomodulatory properties of probiotics are strain specific, which has
297 to be taken into account when it exerts the desired effects in a particular health

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

298 condition.

299 In the present work, BL treatment reduced both the recruitment of neutrophils and the
300 MPO activity at the site of inflammation, but for the first parameter this reduction was
301 only observed in the last phase of the experimental gout period (15 hours). Clinically,
302 gout is characterized by an edema of the joints, with consequent severe pain, and a
303 strong infiltration of neutrophils in the intra- and periarticular area. In our murine model
304 of gout induced by injection of MSU crystals, the chemokine CXCL1 is necessary for
305 the recruitment of neutrophils to the inflammation site (Amaral *et al.*, 2012; Coelho *et*
306 *al.*, 2008; Kobayashi, 2008). Neutrophils are an important cell population as first line of
307 defense, especially in the early stage of an infection where they have been largely
308 known to participate in antimicrobial host defense (Nathan, 2006). Neutrophils remain
309 in high local levels and contribute significantly to tissue damage by production of
310 several inflammatory mediators (Amaral *et al.*, 2012; Nathan, 2006). Thus, their timely
311 removal is essential for the resolution of inflammation and strategies to promote their
312 withdrawal from the inflammatory site would be clinically beneficial. Consistently, we
313 showed here the ability of BL treatment to induce resolution of experimental gout
314 inflammation concomitant with reduction of hypernociception (pain).

315 In addition to the low levels of CXCL-1, the reduction of neutrophils was also
316 associated with a falling in IL-1 β levels. The production and the release of the active
317 form of IL-1 β is crucial step that initiates gouty inflammation and promotes the
318 recruitment of vast numbers of neutrophils at the site of inflammation (Amaral *et al.*,
319 2012; Martinon *et al.*, 2006). Here, the mechanisms by which BL acts on IL-1 β
320 signaling were not clarified, and this would be an important objective for further
321 studies. However, the production of IL-10 was significantly increased in knee tissue of
322 mice previously treated with BL and then challenged with MSU crystals. IL-10 is an
323 anti-inflammatory cytokine whose quantitative determination has been used recently to
324 assess the immunomodulatory effects of probiotic (Foligne *et al.*, 2007; Shida *et al.*,
325 2011). It has been reported as a good indicator of clinical efficacy of probiotic strains
326 under investigation, since high levels of IL-10 are associated with down-regulation of
327 leukocytes activity contributing to the resolution of inflammation and restoration of
328 tissue homeostasis (Serhan *et al.*, 2007).

329

330 Conclusion

331

332 The data presented in the current study show that *B. longum* 5^{1A} has significant anti-
333 inflammatory effect in a murine model of gout. However, further studies are necessary
334 to elucidate the underlying mechanisms of this beneficial action and whether they
335 should also be beneficial in humans. In this regard, it may be of interest to consider
336 probiotic therapies using promising candidates, such as *B. longum* 5^{1A} in future clinical
337 trials to treat gastrointestinal and extra-intestinal inflammatory diseases, such as gout.

338

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

339 **Acknowledgments**

340

341 We thank Ilma Marçal (ICB/UFMG) for technical support. This work was supported by
342 grants from Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) and Fundação de Amparo à
343 Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG).

344

For Peer Review

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

345 **References**

- 346
347 Al-Okbi, S.Y., 2011. Role of Bifidobacterium bifidum and plant food extracts in
348 improving microflora
349 and biochemical and cytogenetic parameters in adjuvant arthritis. GRASAS Y
350 ACEITES 62: 12.
- 351 Amaral, F.A., Costa, V.V., Tavares, L.D., Sachs, D., Coelho, F.M., Fagundes, C.T.,
352 Soriani, F.M., Silveira, T.N., Cunha, L.D., Zamboni, D.S., Quesniaux, V., Peres, R.S.,
353 Cunha, T.M., Cunha, F.Q., Ryffel, B., Souza, D.G. and Teixeira, M.M., 2012. NLRP3
354 inflammasome-mediated neutrophil recruitment and hypernociception depend on
355 leukotriene B(4) in a murine model of gout. Arthritis Rheum 64: 474-484.
- 356 Arpaia, N., Campbell, C., Fan, X., Dikiy, S., van der Veecken, J., deRoos, P., Liu, H.,
357 Cross, J.R., Pfeffer, K., Coffey, P.J. and Rudensky, A.Y., 2013. Metabolites produced
358 by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. Nature 504:
359 451-455.
- 360 Bardin, T. and Richette, P., 2014. Definition of hyperuricemia and gouty conditions.
361 Curr Opin Rheumatol 26: 186-191.
- 362 Busso, N. and So, A., 2010. Mechanisms of inflammation in gout. Arthritis Res Ther
363 12: 206.
- 364 Chen, Y.H., Hsieh, S.C., Chen, W.Y., Li, K.J., Wu, C.H., Wu, P.C., Tsai, C.Y. and Yu,
365 C.L., 2011. Spontaneous resolution of acute gouty arthritis is associated with rapid
366 induction of the anti-inflammatory factors TGFbeta1, IL-10 and soluble TNF receptors
367 and the intracellular cytokine negative regulators CIS and SOCS3. Ann Rheum Dis 70:
368 1655-1663.
- 369 Coelho, F.M., Pinho, V., Amaral, F.A., Sachs, D., Costa, V.V., Rodrigues, D.H., Vieira,
370 A.T., Silva, T.A., Souza, D.G., Bertini, R., Teixeira, A.L. and Teixeira, M.M., 2008.
371 The chemokine receptors CXCR1/CXCR2 modulate antigen-induced arthritis by
372 regulating adhesion of neutrophils to the synovial microvasculature. Arthritis Rheum
373 58: 2329-2337.
- 374 Eerola, E., Mottonen, T., Hannonen, P., Luukkainen, R., Kantola, I., Vuori, K.,
375 Tuominen, J. and Toivanen, P., 1994. Intestinal flora in early rheumatoid arthritis. Br J
376 Rheumatol 33: 1030-1038.
- 377 Foligne, B., Nutten, S., Grangette, C., Dennin, V., Goudercourt, D., Poiret, S., Dewulf,
378 J., Brassart, D., Mercenier, A. and Pot, B., 2007. Correlation between in vitro and in
379 vivo immunomodulatory properties of lactic acid bacteria. World J Gastroenterol 13:
380 236-243.
- 381 Fukuda, S., Toh, H., Hase, K., Oshima, K., Nakanishi, Y., Yoshimura, K., Tobe, T.,
382 Clarke, J.M., Topping, D.L., Suzuki, T., Taylor, T.D., Itoh, K., Kikuchi, J., Morita, H.,
383 Hattori, M. and Ohno, H., 2011. Bifidobacteria can protect from enteropathogenic
384 infection through production of acetate. Nature 469: 543-547.
- 385 Guerra, P.V., Lima, L.N., Souza, T.C., Mazochi, V., Penna, F.J., Silva, A.M., Nicoli,
386 J.R. and Guimaraes, E.V., 2011. Pediatric functional constipation treatment with

- 1
2
3 387 Bifidobacterium-containing yogurt: a crossover, double-blind, controlled trial. *World J*
4 388 *Gastroenterol* 17: 3916-3921.
- 5
6 389 Hachicha, M., Naccache, P.H. and McColl, S.R., 1995. Inflammatory microcrystals
7 390 differentially regulate the secretion of macrophage inflammatory protein 1 and
8 391 interleukin 8 by human neutrophils: a possible mechanism of neutrophil recruitment to
9 392 sites of inflammation in synovitis. *J Exp Med* 182: 2019-2025.
- 10
11 393 Harrold, L.R., Yood, R.A., Mikuls, T.R., Andrade, S.E., Davis, J., Fuller, J., Chan,
12 394 K.A., Roblin, D., Raebel, M.A., Von Worley, A., Platt, R. and Saag, K.G., 2006. Sex
13 395 differences in gout epidemiology: evaluation and treatment. *Ann Rheum Dis* 65: 1368-
14 396 1372.
- 15
16
17 397 Hatakka, K., Martio, J., Korpela, M., Herranen, M., Poussa, T., Laasanen, T., Saxelin,
18 398 M., Vapaatalo, H., Moilanen, E. and Korpela, R., 2003. Effects of probiotic therapy on
19 399 the activity and activation of mild rheumatoid arthritis--a pilot study. *Scand J*
20 400 *Rheumatol* 32: 211-215.
- 21
22 401 Homayouni Rad, A., Torab, R., Ghalibaf, M., Norouzi, S. and Mehrabany, E.V., 2013.
23 402 Might patients with immune-related diseases benefit from probiotics? *Nutrition* 29: 583-
24 403 586.
- 25
26 404 Kobayashi, Y., 2008. The role of chemokines in neutrophil biology. *Front Biosci* 13:
27 405 2400-2407.
- 28
29
30 406 Lebeer, S., Vanderleyden, J. and De Keersmaecker, S.C., 2010. Host interactions of
31 407 probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. *Nat*
32 408 *Rev Microbiol* 8: 171-184.
- 33
34 409 Lee, S.J., Hirsch, J.D., Terkeltaub, R., Khanna, D., Singh, J.A., Sarkin, A. and
35 410 Kavanaugh, A., 2009. Perceptions of disease and health-related quality of life among
36 411 patients with gout. *Rheumatology (Oxford)* 48: 582-586.
- 37
38 412 Martin, W.J. and Harper, J.L., 2010. Innate inflammation and resolution in acute gout.
39 413 *Immunol Cell Biol* 88: 15-19.
- 40
41 414 Martin, W.J., Herst, P.M., Chia, E.W. and Harper, J.L., 2009. Sesquiterpene
42 415 dialdehydes inhibit MSU crystal-induced superoxide production by infiltrating
43 416 neutrophils in an in vivo model of gouty inflammation. *Free Radic Biol Med* 47: 616-
44 417 621.
- 45
46
47 418 Martinon, F., Petrilli, V., Mayor, A., Tardivel, A. and Tschopp, J., 2006. Gout-
48 419 associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* 440: 237-241.
- 49
50 420 Maslowski, K.M. and Mackay, C.R., 2011. Diet, gut microbiota and immune responses.
51 421 *Nat Immunol* 12: 5-9.
- 52
53 422 Maslowski, K.M., Vieira, A.T., Ng, A., Kranich, J., Sierro, F., Yu, D., Schilter, H.C.,
54 423 Rolph, M.S., Mackay, F., Artis, D., Xavier, R.J., Teixeira, M.M. and Mackay, C.R.,
55 424 2009. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant
56 425 receptor GPR43. *Nature* 461: 1282-1286.
- 57
58
59
60

- 1
2
3 426 Nathan, C., 2006. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev*
4 427 *Immunol* 6: 173-182.
- 5
6 428 Perez, D.A., Vago, J.P., Athayde, R.M., Reis, A.C., Teixeira, M.M., Sousa, L.P. and
7 429 Pinho, V., 2014. Switching off key signaling survival molecules to switch on the
8 430 resolution of inflammation. *Mediators Inflamm* 2014: 829851.
- 9
10 431 Picard, C., Fioramonti, J., Francois, A., Robinson, T., Neant, F. and Matuchansky, C.,
11 432 2005. Review article: bifidobacteria as probiotic agents -- physiological effects and
12 433 clinical benefits. *Aliment Pharmacol Ther* 22: 495-512.
- 13
14 434 Pineda Mde, L., Thompson, S.F., Summers, K., de Leon, F., Pope, J. and Reid, G.,
15 435 2011. A randomized, double-blinded, placebo-controlled pilot study of probiotics in
16 436 active rheumatoid arthritis. *Med Sci Monit* 17: CR347-354.
- 17
18 437 Popa-Nita, O. and Naccache, P.H., 2010. Crystal-induced neutrophil activation.
19 438 *Immunol Cell Biol* 88: 32-40.
- 20
21 439 Rees, F., Hui, M. and Doherty, M., 2014. Optimizing current treatment of gout. *Nat Rev*
22 440 *Rheumatol* 10: 271-283.
- 23
24 441 Reid, G., Jass, J., Sebulsky, M.T. and McCormick, J.K., 2003. Potential uses of
25 442 probiotics in clinical practice. *Clin Microbiol Rev* 16: 658-672.
- 26
27 443 Robinson, P.C. and Horsburgh, S., 2014. Gout: joints and beyond, epidemiology,
28 444 clinical features, treatment and co-morbidities. *Maturitas* 78: 245-251.
- 29
30 445 Roddy, E. and Choi, H.K., 2014. Epidemiology of gout. *Rheum Dis Clin North Am* 40:
31 446 155-175.
- 32
33 447 Roddy, E. and Doherty, M., 2010. Epidemiology of gout. *Arthritis Res Ther* 12: 223.
- 34
35 448 Roddy, E., Zhang, W. and Doherty, M., 2007a. The changing epidemiology of gout. *Nat*
36 449 *Clin Pract Rheumatol* 3: 443-449.
- 37
38 450 Roddy, E., Zhang, W. and Doherty, M., 2007b. Is gout associated with reduced quality
39 451 of life? A case-control study. *Rheumatology (Oxford)* 46: 1441-1444.
- 40
41 452 Sachs, D., Coelho, F.M., Costa, V.V., Lopes, F., Pinho, V., Amaral, F.A., Silva, T.A.,
42 453 Teixeira, A.L., Souza, D.G. and Teixeira, M.M., 2011. Cooperative role of tumour
43 454 necrosis factor-alpha, interleukin-1beta and neutrophils in a novel behavioural model
44 455 that concomitantly demonstrates articular inflammation and hypernociception in mice.
45 456 *Br J Pharmacol* 162: 72-83.
- 46
47 457 Scher, J.U. and Abramson, S.B., 2011. The microbiome and rheumatoid arthritis. *Nat*
48 458 *Rev Rheumatol* 7: 569-578.
- 49
50 459 Serhan, C.N., Brain, S.D., Buckley, C.D., Gilroy, D.W., Haslett, C., O'Neill, L.A.,
51 460 Perretti, M., Rossi, A.G. and Wallace, J.L., 2007. Resolution of inflammation: state of
52 461 the art, definitions and terms. *FASEB J* 21: 325-332.
- 53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 462 Shida, K., Nanno, M. and Nagata, S., 2011. Flexible cytokine production by
4 463 macrophages and T cells in response to probiotic bacteria: a possible mechanism by
5 464 which probiotics exert multifunctional immune regulatory activities. *Gut Microbes* 2:
6 465 109-114.
7
8 466 Souza, T.C., Silva, A.M., Drews, J.R., Gomes, D.A., Vinderola, C.G. and Nicoli, J.R.,
9 467 2013. In vitro evaluation of Bifidobacterium strains of human origin for potential use in
10 468 probiotic functional foods. *Benef Microbes* 4: 179-186.
11
12 469 Souza, T.C., Zacarias, M.F., Silva, A.M., Binetti, A., Reinheimer, J., Nicoli, J.R. and
13 470 Vinderola, G., 2012. Cell viability and immunostimulating and protective capacities of
14 471 Bifidobacterium longum 51A are differentially affected by technological variables in
15 472 fermented milks. *J Appl Microbiol* 112: 1184-1192.
16
17 473 Terkeltaub, R., 2009. Gout. Novel therapies for treatment of gout and hyperuricemia.
18 474 *Arthritis Res Ther* 11: 236.
19
20 475 Terkeltaub, R.A. and Ginsberg, M.H., 1988. The inflammatory reaction to crystals.
21 476 *Rheum Dis Clin North Am* 14: 353-364.
22
23 477 Vahtovuo, J., Munukka, E., Korkeamaki, M., Luukkainen, R. and Toivanen, P., 2008.
24 478 Fecal microbiota in early rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 35: 1500-1505.
25
26 479 Vieira, A.T., Macia, L., Galvao, I., Martins, F.S., Cecilia, M., Canesso, C., Amaral,
27 480 F.A., Garcia, C.C., Maslowski, K.M., De Leon, E., Shim, D., Nicoli, J., Harper, J.L.,
28 481 Teixeira, M.M. and Mackay, C.R., 2015. A role for the gut microbiota and the
29 482 metabolite sensing receptor GPR43 in a murine model of gout. *Arthritis Rheumatol*.
30
31 483 Vieira, A.T., Teixeira, M.M. and Martins, F.S., 2013. The role of probiotics and
32 484 prebiotics in inducing gut immunity. *Front Immunol* 4: 445.
33
34 485 Wu, H.J., Ivanov, I., Darce, J., Hattori, K., Shima, T., Umesaki, Y., Littman, D.R.,
35 486 Benoist, C. and Mathis, D., 2010. Gut-residing segmented filamentous bacteria drive
36 487 autoimmune arthritis via T helper 17 cells. *Immunity* 32: 815-827.
37
38 488
39 489
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

490 **Legends to figures**

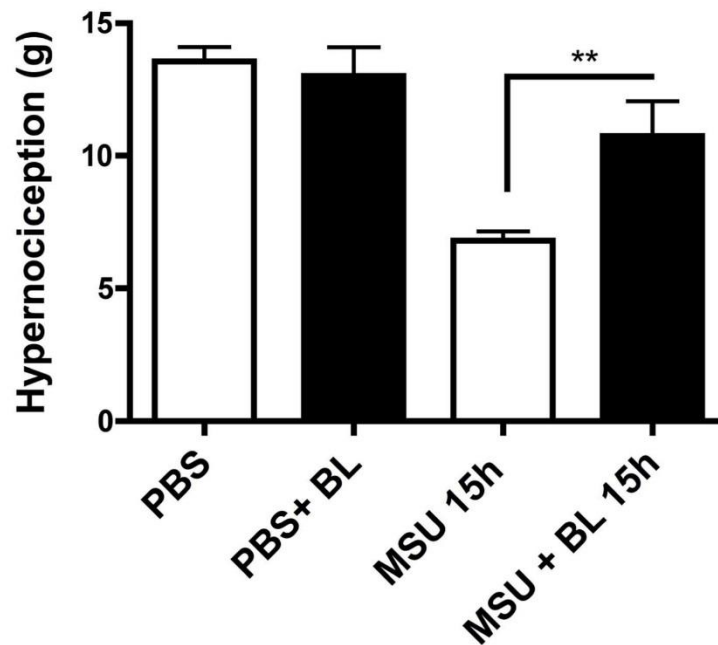
491
492 **Figure 1.** Nociceptive response to mechanical stimulation after MSU injection. Mice
493 were sacrificed 6 or 15 hours after intraarticular injection of 100 µg of MSU crystals.
494 Oral treatment with BL was done by daily gavage 7 days prior MSU crystals injection
495 and until sacrifice. Bars show the mean ± SEM results in 6 mice per group. **p<0.01.

496
497 **Figure 2.** Recruitment of leukocytes after oral *B. longum* treatment and MSU induced-
498 inflammation. Intraarticular injection of 100 µg of MSU crystals promoted an influx of
499 total leukocytes (A). This influx was compound mainly by neutrophils (B) in the
500 intraarticular knee cavity. Bars show the mean ± SEM results in 6 mice per group.
501 *p<0.05.

502
503 **Figure 3.** Accumulation of neutrophils in the periarticular tissue assessed by
504 myeloperoxidase activity (MPO). Intraarticular injection of 100 µg of MSU crystals
505 induced an accumulation of neutrophils in the periarticular tissue 15 hours after the
506 challenge. The pre-treatment for 7 days with BL reduced this accumulation. Bars show
507 the mean ± SEM results in 6 mice per group. *p<0.05 and ***p<0.001.

508
509 **Figure 4.** Levels of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the
510 periarticular tissue after oral *B. longum* treatment. The pro-inflammatory cytokines
511 CXCL1 (A) and IL-1β (B) and anti-inflammatory cytokine IL-10 (C) were determined
512 by ELISA in the periarticular knee tissue from mice 6 and 15 hours after intraarticular
513 injection of 100 µg of MSU crystals. Bars show the mean ± SEM results in 6 mice per
514 group. *p<0.05 and **p<0.01.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



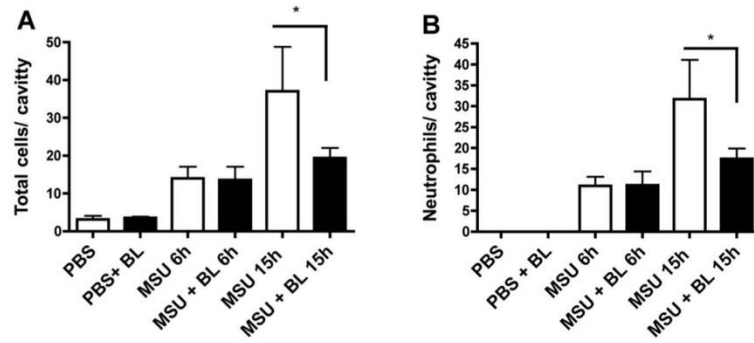
Nociceptive response to mechanical stimulation after MSU injection. Mice were sacrificed 6 or 15 hours after intraarticular injection of 100 μ g of MSU crystals. Oral treatment with BL was done by daily gavage 7 days prior MSU crystals injection and until sacrifice. Bars show the mean \pm SEM results in 6 mice per group.

** $p < 0.01$.

138x126mm (300 x 300 DPI)



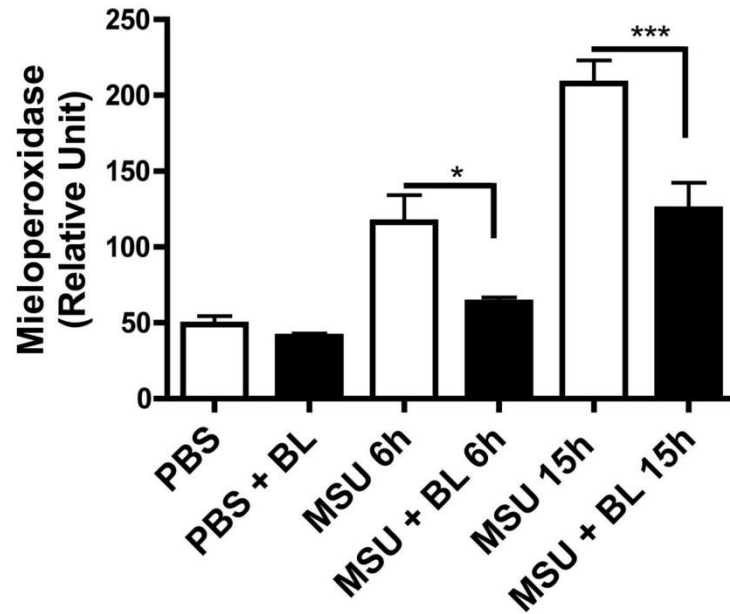
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



Recruitment of leukocytes after oral *B. longum* treatment and MSU induced-inflammation. Intraarticular injection of 100 μ g of MSU crystals promoted an influx of total leukocytes (A). This influx was compound mainly by neutrophils (B) in the intraarticular knee cavity. Bars show the mean \pm SEM results in 6 mice per group. * $p < 0.05$.
83x40mm (300 x 300 DPI)

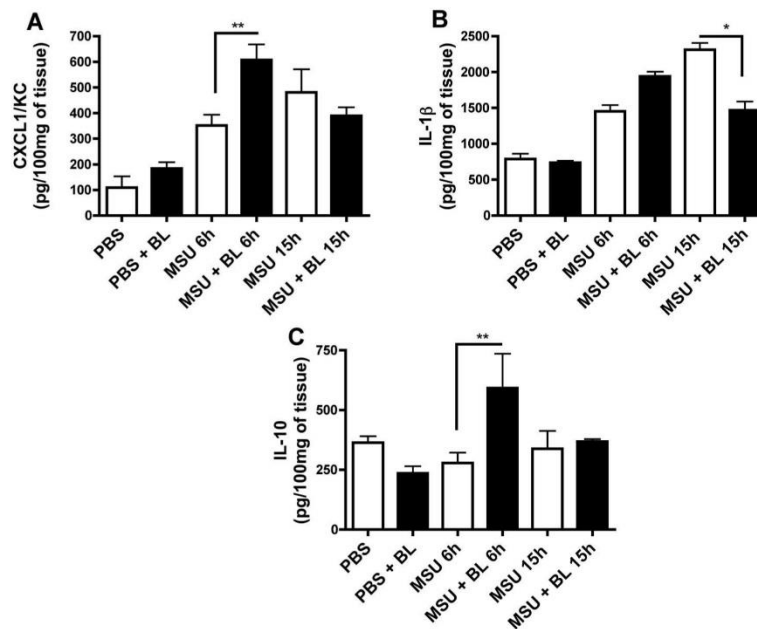
Peer Review

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



Accumulation of neutrophils in the periarticular tissue assessed by myeloperoxidase activity (MPO). Intraarticular injection of 100 μ g of MSU crystals induced an accumulation of neutrophils in the periarticular tissue 15 hours after the challenge. The pre-treatment for 7 days with BL reduced this accumulation. Bars show the mean \pm SEM results in 6 mice per group. * p <0.05 and *** p <0.001.
154x132mm (300 x 300 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



Levels of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the periarticular tissue after oral *B. longum* treatment. The pro-inflammatory cytokines CXCL1 (A) and IL-1 β (B) and anti-inflammatory cytokine IL-10 (C) were determined by ELISA in the periarticular knee tissue from mice 6 and 15 hours after intraarticular injection of 100 μ g of MSU crystals. Bars show the mean \pm SEM results in 6 mice per group. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

174x143mm (300 x 300 DPI)

ANEXO 4

13-May-2015

All co-authors have received a copy of this e-mail

Dear Prof. Amaral,

Thank you for submitting your manuscript "The crucial role of Macrophage migration inhibitory factor for joint inflammation induced by uric acid crystals" to Rheumatology. The paper will now be considered by the editorial team and forwarded for peer review if appropriate. The Editor will inform you of his decision as quickly as possible. This paper is being considered on the understanding it has not been submitted or published elsewhere. The editorial process normally takes four to six weeks, although delays do occur from time to time, particularly in finding appropriate referees who will agree to review the manuscript promptly.

Your paper has been assigned manuscript number RHE-15-0739. The full list of authors is: Galvão, Izabela; Tavares, Livia; Dias, Ana Carolina; Rodrigues, Irla Paula; de Oliveira, René Donizeti Ribeiro; Louzada-Junior, Paulo; Souza, Daniele; Sousa, Lirlandia; Teixeira, Mauro; Amaral, Flavio.

You may view the status of your manuscript at any time by logging on to your account at Rheumatology Manuscript Central (<https://mc.manuscriptcentral.com/rheumatology>). Your manuscript will be assigned the status 'With Associate Editor' until the review process is complete and a decision has been made, whereupon the decision will be posted on your account.

OPTIONAL OPEN ACCESS: Please note that if your manuscript is accepted for publication in Rheumatology, you will have the option, at an additional charge, to make your paper freely available online immediately upon publication, under the Oxford Open initiative (see <http://www.oxfordjournals.org/oxfordopen/>). Applicable Oxford Open charges can be found in the Authors Instructions http://www.oxfordjournals.org/brheum/for_authors/index.html. Please note that authors are not asked to make this decision until after acceptance of their manuscript and hence it is not part of the editorial process.

If you need to contact the Editorial Office for any reason, please be prepared to quote the reference number for your manuscript.

Yours sincerely,

Rheumatology Editorial Office

The crucial role of Macrophage migration inhibitory factor for joint inflammation induced by uric acid crystals

Izabela Galvão¹, Livia Duarte Tavares², Ana Carolina Fialho Dias¹, Irla Paula Stopa Rodrigues¹, Rene Donizeti Ribeiro³, Paulo Louzada-Junior³, Daniele Glória Souza², Lirlandia Pires Souza⁴, Mauro Martins Teixeira¹, Flávio Almeida Amaral¹.

Affiliation

1. Department of Biochemistry and Immunology, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil.

2. Department of Microbiology, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil.

3. Division of Rheumatology, School of Medicine of Ribeirao Preto, University of São Paulo, Av. Prof. Almeida Prado, 1280, 05508-070, São Paulo, SP, Brazil.

4. Department of Clinical Analysis and Toxicological, College of Pharmacy, Universidade Federal de Minas Gerais Av. Antônio Carlos, 6627, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brasil.

*Corresponding author. Tel: +55 31 3409-2644 Fax: +55 31 3409-2651. E-mail address: famaral@icb.ufmg.br (F. A. Amaral)

Abbreviation List

BMDM – Bone marrow-derived macrophage

DMEM - Dulbecco's modified Eagle's medium

DTH – Delayed-type hypersensitivity

FBS – Fetal bovine serum

LCCM – L929 cell-conditioned medium

LPS - Lipopolysaccharide

M-CSF – Macrophage colony-stimulating factor

MIF – Macrophage migration inhibitory factor

MSU – Monosodium urate

PBS – Phosphate buffered saline

rMIF – Recombinant MIF

SF – Synovial Fluid

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

Abstract

Objectives: The aim of this study is to evaluate the role of Macrophage migration inhibitory factor (MIF) in inflammation caused by monosodium urate (MSU) crystals.

Methods: MSU crystals and recombinant MIF were injected into the tibiofemoral joint of C57Bl/6J male mice. Cell influx and levels of IL-1 β and CXCL1 were evaluated in the joint. Mechanical hypernociception was analyzed by electronic pressure meter. MIF was also measured in synovial fluid obtained from patients with gout.

Results: Intra-articular injection of rMIF promoted neutrophil recruitment and increased the levels of IL-1 β and CXCL1 in the joint. MSU crystals increased the levels of MIF at early time points and treatment with ISO-1, a small molecule inhibitor of MIF, reduced neutrophil recruitment induced by MSU crystals. Injection of rMIF induced IL-1 β mRNA synthesis both *in vitro* and *in vivo* and the inhibition of MIF activity decreased IL-1 β synthesis following MSU crystals injection. However, blockade of IL-1 β did not reduce the recruitment of neutrophils induced by MIF. In patients with acute gout, MIF was detectable in synovial fluid and there was a positive correlation with IL-1 β levels.

Conclusion: In the model used in this study, MIF is upregulated by MSU crystals and its inhibition causes reduced joint inflammation. Mechanistically, MIF promotes neutrophil recruitment and IL-1 β synthesis, two crucial events contributing to the pathogenesis of gout.

Key words: Gout, MIF, IL-1 β , neutrophil

Introduction

Gout is an ancient disease caused by the deposition of monosodium urate (MSU) crystals in the joints (Nuki and Simkin 2006). This disease is directly correlated with life style, such as an excessive consumption of alcohol and purine-rich foods and also by genetic factors that regulate uric acid metabolism, a byproduct of purine degradation (Robinson and Horsburgh 2014). Importantly, the incidence of gout has constantly increased over the past few decades (Roddy and Choi 2014). Hyperuricemia is necessary but not sufficient to cause gout attacks and joint disease. During the acute phase of gout, the deposition of MSU crystals triggers an extremely painful inflammatory attack in the affected joints, accompanied by edema and erythema of the overlying skin. The persistence of the stimulus contributes to the appearance of tophi, joint limitation, joint swelling and deformity, characteristic symptoms and signs of the chronic stage of gout (Perez-Ruiz, Castillo et al. 2014).

Resident cells, including macrophages, fibroblasts and mast cells, interact with MSU crystals and initiate the production of several inflammatory mediators, which lead to a massive neutrophil infiltration to the joint, amplifying the inflammation (Martin, Walton et al. 2009) (Reber, Marichal et al. 2014). It is well known that MSU crystals trigger NLRP3 inflammasome activation, culminating in the release of the active form of IL-1 β , a major cytokine driving inflammatory changes in response to MSU crystal (Martinon, Petrilli et al. 2006). The influx of neutrophils into the joint is a hallmark of acute gout attack (Popa-Nita and Naccache 2010). Experimentally, neutrophil recruitment that occurs in gout is dependent on the chemokine receptor CXCR2 and its related chemokines, CXCL1 and CXCL2, that are produced under IL-1 β action (Amaral, Costa et al. 2012). Once in the joint, neutrophils release a series of inflammatory mediators that

contribute to joint inflammation and pain, including ROS, cytokines, chemokines, NETs and granule constituents, such as proteolytic enzymes (Mitroulis, Kambas et al. 2013).

MIF was one of the first cytokines described and was identified in a delayed-type hypersensitivity (DTH) reaction and released by T lymphocytes (David 1966). MIF has important functions in innate immunity and is expressed constitutively in immune cells, which release MIF after stimulation with microbial products and pro-inflammatory cytokines (Calandra and Roger 2003). MIF appears to contribute to the pathogenesis of certain acute and chronic inflammatory diseases, including rheumatoid arthritis (Leech, Metz et al. 1999). The major actions triggered by MIF occur by binding to the extracellular domain of CD74 molecule, the cell-surface form of the MHC class-II-associated invariant chain (Leng, Metz et al. 2003). However, in addition to the direct effect on CXCR2, MIF up-regulates IL-8, the cognate ligand of CXCR2 dependent neutrophil recruitment, and also IL-1 β messenger RNAs via a complex system (Onodera, Nishihira et al. 2004). In the present study, we investigated whether MIF could be involved in the inflammatory cascade and injury that follows injection of MSU crystals in mice.

Methodology

Animals

Eight-to-ten-week-old male C57BL/6J (wild type) mice were purchased from the Centro de Bioterismo of the Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) in Brazil. All animals were maintained with filtered water and food ad libitum and kept in a controlled environment. Experiments received prior approval by the animal ethics committee of UFMG (protocol n° 165/2008 and 2/2015).

Articular inflammation

Mice were placed under anesthesia (150:10 mg/kg ketamine:xylazine; i.p. Syntec, São Paulo, Brazil) and were injected with human recombinant MIF (rMIF – 100 ng/cavity – PeproTech Inc., Rocky Hill, NJ, USA) or MSU crystals (100 µg/cavity) into the tibiofemoral joint. In different set of experiments, mice received an injection of MIF antagonist (ISO-1 - 50µg/cavity - Calbiochem, US and Canada), into the tibiofemoral joint before MSU crystals injection or the administration of IL-1 receptor antagonist (IL-1ra - 5mg/kg - Biogen) intraperitoneously before rMIF injection. Inflammation parameters were evaluated at different time points after injection of rMIF injection (6 and 15 hours) or MSU crystals (1, 3, 6 and 15 hours). Mice were culled in a CO₂ chamber followed by cervical dislocation, and the articular cavity was washed with phosphate buffered saline (PBS) containing 3 % bovine serum albumin (2 x 5 µL) for cell counts. Periarticular tissue was removed from the joints for cytokine and chemokine evaluation. Leukocyte numbers in the articular cavity were determined in a Neubauer chamber after staining with Turk's solution. Differential counts were performed in Cytospin (Shandon III, Thermo Shandon, Frankfurt, Germany) preparations by evaluating the percentage of

each leukocyte on a slide stained with May-Grunwald-Giemsa (Amaral, Costa et al. 2012).

MSU preparation

For preparation of MSU, 1.68 mg of uric acid was dissolved in 500 mL of 0.01 M NaOH solution heated to 70 °C, the pH adjusted to 7.1-7.2 and filtered (0.2 µm). The solution was maintained at room temperature with slow stirring until crystals were formed (around 24 h). The supernatant was discarded and the crystals washed in ethanol followed by short sonication. The crystals were then dried and resuspended in PBS just before use.

Evaluation of hypernociception

Evaluation of mechanical hypernociception was performed as previously described (Sachs, Coelho et al. 2011), using an electronic pressure meter (INSIGHT Instruments, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil). The flexion-elicited withdrawal threshold was used to infer behavioral responses associated with pain. Results are expressed as the change in withdrawal threshold (in grams).

Cytokine and chemokine determination

Periarticular tissues were collected and homogenized in PBS containing antiproteases (Coelho, Pinho et al. 2008). Samples were homogenized and the supernatant was used for cytokine and chemokine concentrations, in accordance with the manufacturer's instructions (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

Western blot analysis

Periarticular tissue samples (20-40 mg tissue) were homogenised at 500 µl of lysis buffer using a homogenizer Electrical (Power Gen 125 - Pennsylvania Fisher Scientific, USA). The whole-cell extracts were prepared as described earlier (Vago, Nogueira et al. 2012). Protein amounts were quantified with the Bradford assay reagent from Bio-Rad (Hercules, CA, USA). Extracts (30 g) were separated by electrophoresis on a denaturing, 15% polyacrylamide-SDS gel and electrotransferred to nitrocellulose membranes. Membranes were blocked overnight at 4°C with PBS containing 5% (w/v) nonfat dry milk and 0.1% Tween-20, washed three times with PBS containing 0.1% Tween-20, and then, incubated with specific primary antibodies (anti-CD74, Santa Cruz Biotechnology, INC. and anti-β-actin, Sigma-Andrich, St. Louis MO, USA) using a dilution of 1:1000 in PBS containing 5% (w/v) BSA and 0.1% Tween-20. After washing, membranes were incubated with appropriated HRP-conjugated secondary antibody (1:3000). Immunoreactive bands were visualized by using an ECL detection system, as described by the manufacturer (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA).

Real-Time PCR

Total RNA was isolated from synovial tissue using TRIzol reagent (Ambion, Life Technologies, USA) and from Bone Marrow Derived Macrophage using RNeasy mini kit (Qiagen, Hilden, Germany). The RNA obtained was resuspended in diethyl pyrocarbonate treated water and stocked at -70 °C until use. Real-time PCR quantitative mRNA analyses was performed on 7500 fast real time PCR system using Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, FosterCity, CA, USA) after reverse transcription reactions of 1 µg of RNA using SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Life technologies, USA). The relative level of gene expression was determined by the comparative threshold cycle method as described by the manufacturer,

whereby data for each sample were normalized to GAPDH constitutive gene and expressed as a fold change compared with control. The following primer pairs were used: for GAPDH 5'- ACG GCC GCA TCT TCT TGT GCA -3'(forward) and 5'- CGG CCA AAT CCG TTC ACA CCG A -3'(reverse); for IL-1 β 5'- CTA CAG GCT CCG AGA TGA ACA AC -3'(forward) and 5'- TCC ATT GAG GTG GAG AGC TTT C -3'(reverse).

***In vitro* study**

We used bone marrow-derived macrophages (BMDM). After euthanasia, mice were sprayed with 70 % ethanol and each femur and tibia flushed with 5 mL of Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Cultilab, São Paulo, Brazil) containing 100 U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin, and 2 mM Lglutamine). The resulting cell suspension was centrifuged, and the cells resuspended in bone marrow differentiation media containing DMEM, 10 % fetal bovine Serum (FBS; Cultilab) and 10 % L929 cell-conditioned medium (LCCM) as a source of macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) (Englen, Valdez et al. 1995). The cell suspension generated thereafter was filtered with cell strainer (BD Biosciences, Bedford, MA, USA) and transferred to a bottle culture, incubated for 3 hours at 37 °C in a 5 % of CO₂ atmosphere. The supernatant was collected, the bottle was washed twice with 5 mL of PBS and then centrifuged with 1200 rpm 10 min. Cells were resuspended in bone marrow differentiation media, seeded (5 x 10⁵ cell per well)

in 24 wells culture plates (BD Biosciences) and incubated at 37 °C in a 5 % CO₂ atmosphere (day 0). Four days later, 100 μ L of LCCM was added to the cultures and incubated for an additional 3 days. At day 7, the supernatants were discarded, 1mL of DMEM added and cells incubated for an additional 3 days. At the end of this process,

BMDM were obtained for further experimental procedure. Cells were stimulated with 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of lipopolysaccharide (LPS) from *Escherichia coli* (Sigma Aldrich, St. Louis MO, USA) and 200 ng/mL of rMIF for one hour (Klasen, Ohl et al. 2014). Cells were collected for real time PCR for IL-1 β .

Collection of synovial fluid

Synovial fluid (SF) was obtained from 12 patients diagnosed with gout by the identification of monosodium urate crystal in synovial fluid and from 8 patients diagnosed with osteoarthritis, level III. The definition of patients' population is shown in Table 1. The SF was harvested using a sterile syringe with the needle injected into the knee joint using a standardized anterolateral portal technique, strictly avoiding hemarthrosis. Synovial fluid was collected in tubes containing heparin to avoid coagulation. Cell counts were performed within 24 hours of aspiration and a 500 μL aliquot was centrifuged at 400 g for 5 minutes, supernatants collected and immediately stored at $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ until use for MIF and IL-1 β measurements. All patients provided informed consent to participate the study, which was approved by the Ethics Committee of the University Hospital of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil (protocol no. 4971/2012).

Statistical analysis

All results are presented as the mean \pm SEM. The analysis of the difference between two groups was performed by Student's t-test. Normalized data of three or more groups were analyzed by one-way ANOVA, and differences between groups were assessed using the Student-Newman-Keuls post-test. Pearson correlation was used for correlation in

normalized data. A *P* value <0.05 was considered significant. Calculations were performed using the Prism 5.0 software for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Results

In order to verify if MIF could induce joint inflammation akin to what has been observed after MSU crystals (Amaral, Costa et al. 2012), we injected 100ng of recombinant MIF (rMIF) into the tibiofemoral joint of mice. We choose that dose after a dose-response curve of hypernociception induced by i.pl. injection of rMIF (10, 30, 100 and 300 ng per paw), which peaked at the dose of 100 ng (data not shown). According to Figure 1, rMIF promoted the recruitment of leukocytes at 6 and 15 hours after injection [Figures 1A]. Neutrophils were the majority of infiltrating cells [Figure 1A]. Moreover, rMIF induced the expression of IL-1 β in the joint cavity and periarticular tissue [Figure 1B], mainly at 6 hours after injection. A similar profile was also seen for the chemokine CXCL1, detected in the cavity and in periarticular tissues [Figure 1C] after rMIF injection. Thus, MIF per se can cause joint inflammation that mimics certain parameters observed after injection of MSU crystals.

MIF contributed to the inflammatory response induced by MSU crystals

Next, we examined whether MIF has a role in the pathogenesis of MSU crystal-induced inflammation. The injection of MSU crystals into the joint of mice increased the levels of MIF and the expression of MIF receptor CD74 in periarticular tissue mainly at early time points [Figure 2A]. Next, mice were treated with ISO-1, an inhibitor of MIF activity, before injection of MSU crystals in the joint. Mice treated with ISO-1 (50 μ g/cavity) showed reduction of recruitment of neutrophils [Figure 2A], after injection of MSU crystals when compared to vehicle-treated mice. Moreover, the blockade of MIF reduced levels of IL-1 β in the cavity and in periarticular tissue [Figure 2B]. On the other hand, the levels of the chemokine CXCL1 in the joint cavity and periarticular tissue [Figure 2C] did not alter after ISO-1 treatment.

One of the striking features of acute gout is the painful inflammation triggered by deposition of MSU crystals. Pain is the most common clinical finding and the main reason why patients seek medical care (VanItallie 2010). In order to evaluate articular hypernociception in mice, we used a method previously described, which quantifies the withdrawal threshold after mechanical pressure of the inflamed limb (Sachs, Coelho et al. 2011). Corroborating the contribution of MIF to the pathogenesis of gout, the blockade of MIF activity reduced hypernociception induced by MSU crystals injection [Figure 2D]. Therefore, MIF contributes to inflammation and hypernociception caused by MSU crystals and the contribution of MIF can be associated to facilitation of IL-1 β release and neutrophil recruitment.

MIF contributes to inflammation in gout by the induction of IL-1 β mRNA synthesis

Our results showed that rMIF induced the secretion of cytokine IL-1 β in the cavity and periarticular tissue (Figure 1). Furthermore, the blockage of MIF activity through treatment with ISO-1 reduced the levels of this cytokine in the model of gout (Figure 2). In both tests, IL-1 β protein was measured suggesting that MIF could be interfering with induction of the gene. To evaluate the first possibility, we evaluated the synthesis of pro-IL-1 β mRNA both *in vitro* and *in vivo*. Using bone marrow derived macrophages (BMDM), rMIF had a significant effect on IL-1 β mRNA synthesis (Figure 3A). The injection of rMIF into the joint increased the expression of IL-1 β mRNA 1 hour later in periarticular tissue when compared to saline injection (Figure 3B). Moreover, MSU crystals injection increased the levels of IL-1 β mRNA 3 hours later in periarticular tissue and the treatment with ISO-1 10 minutes before MSU crystals injection reduced IL-1 β

mRNA expression (Figure 3C). Therefore, MIF has a major role in driving pro- IL-1 β mRNA after injection of MSU crystals.

IL-1 β blockade does not interfere with the cellular recruitment induced by MIF

Next, we investigated if the blockade of IL-1 β receptor interferes with the leukocyte recruitment induced by rMIF. The treatment with IL1-ra (Biogen, USA) 40 minutes before rMIF did not reduce the recruitment of leukocytes [Figure 4A], mostly neutrophils [Figure 4B], 6 hours after rMIF injection when compared to mice without IL-1ra treatment. These data suggest that although rMIF can induce IL-1 β production and can contribute to MSU crystal-induced IL-1 β production and consequent neutrophil recruitment, MIF-induced neutrophil recruitment is independent of IL-1 β .

MIF levels are correlate with IL-1 β levels in human synovial fluid

Once we had demonstrated that MIF contributed to MSU-induced inflammation in an experimental model of gout by stimulating the synthesis of IL-1 β mRNA and promoting neutrophil recruitment to inflamed tissue, we evaluated whether there was production of MIF in synovial fluid from patients with gout. Patients had a typical clinical presentation associated with the finding of MSU crystals and neutrophils in the synovial fluid (Table 1). When we quantified the cytokines MIF and IL-1 β in synovial fluid of these patients, we found a positive correlation between these two cytokines. Pearson correlation analysis showed that MIF levels were strongly related to IL-1 β levels ($r=0.636$) and this relation was statistically significant (p value= 0.026) (Figure 5).

Discussion

Gout is a disease caused by the deposition of MSU crystals in the joint, with a significant local inflammation and intense pain. In the present study we identify for the first time that MIF is an important mediator of inflammation caused by MSU crystals deposition in the joints. The major findings can be summarized as follows: 1) injection of MIF in the joint reproduced the inflammatory response observed in gout, including recruitment of neutrophils, increased levels of cytokines and pain; 2) injection of MSU crystals increased the levels of MIF and its receptor in the joint and the blockade of MIF reduced MSU crystals-induced joint inflammation; 3) mechanistically, MIF was necessary for the production of IL-1 β , an essential cytokine in the context of gout, by stimulating the synthesis of IL-1 β mRNA; 4) there is a positive correlation between MIF and IL-1 β in synovial fluid of patients with acute gout.

MIF is known to have chemotactic actions for different cell types, including monocytes, T and B cells, and neutrophils (Bernhagen, Krohn et al. 2007, Klasen, Ohl et al. 2014). MIF is thought to play a role in acute and chronic immunoinflammatory conditions including rheumatoid arthritis, atherosclerosis and lupus erythematosus (Santos and Morand 2009). MIF is released by mature blood and tissue neutrophils under TNF-stimulation, and has a positive feedback on neutrophil recruitment in different systems (Daryadel, Grifone et al. 2006). In our experiments, injection of MIF promoted neutrophil recruitment when injected into the tibiofemoral joint of mice. Of note, the influx of neutrophils into the joint is a hallmark of an acute gout attack and contributes to articular damage and pain (Popa-Nita and Naccache 2010). Moreover, we show that rMIF could increase levels of the cytokine IL-1 β and the chemokine CXCL1, molecules that are known to contribute to the recruitment of neutrophils to the joint. Importantly, we demonstrate here that the injection of MSU crystals increased the levels of MIF in the

joints only at early time points, at a time when only few neutrophils could be detected in the inflamed joint (Amaral, Costa et al. 2012). In addition, there was up regulation of the expression of the MIF receptor CD74.

Different studies have shown that the absence of MIF or its blockade by antibodies reduced the recruitment of leukocytes under inflammatory conditions, including autoimmune arthritis (Leech, Metz et al. 1998, Gregory, Leech et al. 2004, Santos, Fan et al. 2011). It was previously demonstrated that the small molecule ISO-1 inhibits MIF tautomerase activity, suppressing its pro-inflammatory activities (Lubetsky, Dios et al. 2002). Here, we used ISO-1 to target the endogenous MIF activity and suppress inflammation *in vivo* (Al-Abed, Dabideen et al. 2005). Our results demonstrate that treatment with ISO-1 greatly reduced neutrophil recruitment induced by injection of MSU crystals. Moreover, ISO-1 treatment also reduced the hypernociception associated with crystal-induced inflammation. In this system, we have previously shown that MSU crystal-induced hypernociception was dependent on the influx of neutrophils (Amaral, Costa et al. 2012). Therefore, MIF is produced early after injection of MSU crystals and contributes to neutrophil influx and neutrophil-dependent inflammatory pain in this model.

It has been previously shown that the cytokine IL-1 β is a critical mediator of the inflammation, including neutrophil influx and pain, caused by injection of MSU crystals (Amaral, Costa et al. 2012, Mitroulis, Kambas et al. 2013). IL-1 β is firstly produced in its immature form, called pro-IL-1 β , which is then cleaved and released in its active form by the NLRP3 inflammasome assembled in response to recognition of MSU crystals by specific cells. We demonstrate in this study that MIF increased the levels of IL-1 β in the inflamed joints. This is consistent with the ability of MIF to induce IL-1 β in other conditions (Toh, Aeberli et al. 2006, Assuncao-Miranda, Bozza et al. 2010). More

importantly, blockade of MIF action with ISO-1 was associated with inhibition of IL-1 β levels in response to injection of MSU crystals. ISO-1 prevented the increase of pro-IL-1 β mRNA induced by the MSU crystals suggesting that control of IL-1 β gene transcription is a major mechanism by which MIF controls inflammation in the context of MSU crystal induced inflammation and, probably, in gout. This mechanism is consistent with other *in vitro* studies showing that IL-1 β mRNA was up-regulated by MIF in synovial fibroblast (Onodera, Nishihira et al. 2004). Moreover, our results also corroborate with the findings of Santos et al 2011, that showed a decreased expression of IL-1 β mRNA in synovial tissue of MIF-deficient mice in K/BxN serum transfer arthritis (Santos, Fan et al. 2011).

An interesting finding of our study was that, although MIF induced IL-1 β and was important for MSU crystal-induced IL-1 β formation, blockade of IL-1 β had no effect on MIF-induced neutrophil influx. Therefore, in our system, exogenous administration of rMIF induced migration of neutrophils which seems to be direct effect and independent of IL-1 β . In contrast, in the context of gout, the induction of MIF by MSU crystals was necessary for the production of IL-1 β and subsequent neutrophil influx and inflammatory hypernociception. Amaral et al 2012 previously showed that the treatment with IL-1ra decrease the inflammatory, including neutrophil recruitment, and hypernociceptive responses following MSU crystals injection (Amaral, Costa et al. 2012). These differences likely reflect the higher amount of a single cytokine (in the case MIF) given alone versus its production in an inflammatory milieu where it interacts with many other mediators. In gout, our results clearly show that MIF is necessary in the first stage of the inflammation, promoting both IL-1 β production and neutrophil influx which, in turn, amplify the inflammatory response.

Previous studies evaluating levels of MIF in human synovial fluid have suggested that MIF had a relevant role in the pathogenesis of juvenile idiopathic arthritis (Meazza, Travaglini et al. 2002), osteoarthritis (Liu and Hu 2012) and rheumatoid arthritis (Onodera, Tanji et al. 1999). In our study population, levels of MIF could be detected in all samples and correlated positively with levels of IL-1 β , corroborating the results in mice. Levels of MIF in our gout population (8060.62 ± 6121.63 pg/mL) were similar to those found in a small cohort of patients with osteoarthritis (OA, 8005.47 ± 6112.25 pg/mL) and we had no access to samples of naïve individuals. A previous study showed that levels of MIF in synovial fluid was higher in patients with OA than control individuals (Liu and Hu 2012) suggesting that levels of MIF in our study should be indeed elevated when compared to background levels. In contrast, individuals with OA had much lower levels of IL-1 β (54.27 ± 79.50 pg/mL) than patients with gout (147.75 ± 231.09 pg/mL). Therefore, it appears that MIF is relevant for IL-1 β production in the context of gout but does not appear to be sufficient to induce production of IL-1 β protein in patients with OA.

In conclusion, we showed in this study that MIF plays a major role in MSU crystal-induced inflammation in mice. The mechanism by which MIF controls inflammation induced by MSU crystals is dependent on the ability of MIF to control the production of IL-1 β mRNA. Furthermore, MIF may directly contribute to neutrophil migration to the joint, a factor that imparts on articular damage. MIF levels in human synovial fluid are strongly correlated with increase levels of IL-1 β , which corroborates our findings in mice. Altogether, MIF appears to be a very important mediator in the initial process of inflammation in gout, mimicking an acute gout attack and could be a target to control the excessive inflammation triggered by the deposition of MSU crystals in the joints.

Key Messages:

- 1) MIF participates in the pathogenesis of gout by promoting IL-1 β synthesis and neutrophil recruitment;
- 2) The blockade of MIF activity could be important for the management of gouty arthritis.

Acknowledgements

We thank Ilma Marçal for technical assistance. We thank the funding agencies Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, Brazil) and European Community's Seventh Framework Programme (FP7- 2007-2013, TIMER consortium) under grant agreement n° HEALTH-F4-2011-281608, for financial support.

Disclosure statement: The authors have declared no conflicts of interest.

Reference

- 1 Nuki G, Simkin PA. A concise history of gout and hyperuricemia and their treatment. *Arthritis research & therapy* 2006;8 Suppl 1:S1.
- 2 Robinson PC, Horsburgh S. Gout: joints and beyond, epidemiology, clinical features, treatment and co-morbidities. *Maturitas* 2014;78(4):245-51.
- 3 Roddy E, Choi HK. Epidemiology of gout. *Rheumatic diseases clinics of North America* 2014;40(2):155-75.
- 4 Perez-Ruiz F, Castillo E, Chinchilla SP, Herrero-Beites AM. Clinical Manifestations and Diagnosis of Gout. *Rheumatic diseases clinics of North America* 2014;40(2):193-206.
- 5 Martin WJ, Walton M, Harper J. Resident macrophages initiating and driving inflammation in a monosodium urate monohydrate crystal-induced murine peritoneal model of acute gout. *Arthritis and rheumatism* 2009;60(1):281-9.
- 6 Reber LL, Marichal T, Sokolove J, et al. Mast cell-derived IL-1 β contributes to uric acid crystal-induced acute arthritis in mice. *Arthritis & rheumatology* 2014.
- 7 Martinon F, Petrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* 2006;440(7081):237-41.

- 8 Popa-Nita O, Naccache PH. Crystal-induced neutrophil activation. *Immunology and cell biology* 2010;88(1):32-40.
- 9 Amaral FA, Costa VV, Tavares LD, et al. NLRP3 inflammasome-mediated neutrophil recruitment and hypernociception depend on leukotriene B(4) in a murine model of gout. *Arthritis and rheumatism* 2012;64(2):474-84.
- 10 Mitroulis I, Kambas K, Ritis K. Neutrophils, IL-1beta, and gout: is there a link? *Seminars in immunopathology* 2013;35(4):501-12.
- 11 David JR. Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1966;56(1):72-7.
- 12 Calandra T, Roger T. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nature reviews. Immunology* 2003;3(10):791-800.
- 13 Leech M, Metz C, Hall P, et al. Macrophage migration inhibitory factor in rheumatoid arthritis: evidence of proinflammatory function and regulation by glucocorticoids. *Arthritis and rheumatism* 1999;42(8):1601-8.
- 14 Leng L, Metz CN, Fang Y, et al. MIF signal transduction initiated by binding to CD74. *The Journal of experimental medicine* 2003;197(11):1467-76.
- 15 Onodera S, Nishihira J, Koyama Y, et al. Macrophage migration inhibitory factor up-regulates the expression of interleukin-8 messenger RNA in synovial fibroblasts of rheumatoid arthritis patients: common transcriptional regulatory mechanism between interleukin-8 and interleukin-1beta. *Arthritis and rheumatism* 2004;50(5):1437-47.
- 16 Sachs D, Coelho FM, Costa VV, et al. Cooperative role of tumour necrosis factor-alpha, interleukin-1beta and neutrophils in a novel behavioural model that concomitantly demonstrates articular inflammation and hypernociception in mice. *British journal of pharmacology* 2011;162(1):72-83.
- 17 Coelho FM, Pinho V, Amaral FA, et al. The chemokine receptors CXCR1/CXCR2 modulate antigen-induced arthritis by regulating adhesion of neutrophils to the synovial microvasculature. *Arthritis and rheumatism* 2008;58(8):2329-37.
- 18 Vago JP, Nogueira CR, Tavares LP, et al. Annexin A1 modulates natural and glucocorticoid-induced resolution of inflammation by enhancing neutrophil apoptosis. *Journal of leukocyte biology* 2012;92(2):249-58.
- 19 Englen MD, Valdez YE, Lehnert NM, Lehnert BE. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor is expressed and secreted in cultures of murine L929 cells. *Journal of immunological methods* 1995;184(2):281-3.
- 20 Klasen C, Ohl K, Sternkopf M, et al. MIF promotes B cell chemotaxis through the receptors CXCR4 and CD74 and ZAP-70 signaling. *Journal of immunology* 2014;192(11):5273-84.
- 21 VanItallie TB. Gout: epitome of painful arthritis. *Metabolism: clinical and experimental* 2010;59 Suppl 1:S32-6.
- 22 Bernhagen J, Krohn R, Lue H, et al. MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment. *Nature medicine* 2007;13(5):587-96.
- 23 Santos LL, Morand EF. Macrophage migration inhibitory factor: a key cytokine in RA, SLE and atherosclerosis. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 2009;399(1-2):1-7.
- 24 Daryadel A, Grifone RF, Simon HU, Yousefi S. Apoptotic neutrophils release macrophage migration inhibitory factor upon stimulation with tumor necrosis factor-alpha. *The Journal of biological chemistry* 2006;281(37):27653-61.

- 25 Gregory JL, Leech MT, David JR, Yang YH, Dacumos A, Hickey MJ. Reduced leukocyte-endothelial cell interactions in the inflamed microcirculation of macrophage migration inhibitory factor-deficient mice. *Arthritis and rheumatism* 2004;50(9):3023-34.
- 26 Leech M, Metz C, Santos L, et al. Involvement of macrophage migration inhibitory factor in the evolution of rat adjuvant arthritis. *Arthritis and rheumatism* 1998;41(5):910-7.
- 27 Santos LL, Fan H, Hall P, et al. Macrophage migration inhibitory factor regulates neutrophil chemotactic responses in inflammatory arthritis in mice. *Arthritis and rheumatism* 2011;63(4):960-70.
- 28 Lubetsky JB, Dios A, Han J, et al. The tautomerase active site of macrophage migration inhibitory factor is a potential target for discovery of novel anti-inflammatory agents. *The Journal of biological chemistry* 2002;277(28):24976-82.
- 29 Al-Abed Y, Dabideen D, Aljabari B, et al. ISO-1 binding to the tautomerase active site of MIF inhibits its pro-inflammatory activity and increases survival in severe sepsis. *The Journal of biological chemistry* 2005;280(44):36541-4.
- 30 Toh ML, Aeberli D, Lacey D, et al. Regulation of IL-1 and TNF receptor expression and function by endogenous macrophage migration inhibitory factor. *Journal of immunology* 2006;177(7):4818-25.
- 31 Assuncao-Miranda I, Bozza MT, Da Poian AT. Pro-inflammatory response resulting from sindbis virus infection of human macrophages: implications for the pathogenesis of viral arthritis. *Journal of medical virology* 2010;82(1):164-74.
- 32 Meazza C, Travaglino P, Pignatti P, et al. Macrophage migration inhibitory factor in patients with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis and rheumatism* 2002;46(1):232-7.
- 33 Liu M, Hu C. Association of MIF in serum and synovial fluid with severity of knee osteoarthritis. *Clinical biochemistry* 2012;45(10-11):737-9.
- 34 Onodera S, Tanji H, Suzuki K, et al. High expression of macrophage migration inhibitory factor in the synovial tissues of rheumatoid joints. *Cytokine* 1999;11(2):163-7.

Figure legends

Figure 1. Recombinant MIF (rMIF) induces neutrophil recruitment and cytokine production in vivo. Intraarticular injection of rMIF (100 ng/cavity) induced total leukocyte and neutrophils [A] recruitment at both time points evaluated. rMIF increased the levels of the cytokine IL-1 β and CXCL1 into the articular cavity and periarticular tissue [B and C] mainly at 6 hours post injection. Control groups received saline injection (10 μ L). Bars show the mean \pm SEM results in 5 mice per group. * = $p < 0.05$ versus control group (ANOVA followed by Student-Newman-Keuls post test).

Figure 2. MIF participates in the inflammatory response induced by MSU crystals. Intraarticular injection of MSU crystals (100 μ g/cavity) induced the secretion of MIF and expression of CD74 mainly at 1 and 3 h post injection [A]. Mice treated with ISO-1 (50 μ g; i.a.) before MSU crystals injection (-1 h) reduced the recruitment of neutrophils [A] to the joint cavity 15 h after challenge. ISO-1 treatment also reduced the levels of the cytokine IL-1 β in the cavity and periarticular tissue [B] but no difference was observed in the chemokine CXCL1 in both compartments [C]. The paw withdrawal threshold was also restored when MIF was blocked by ISO-1 [D]. Control groups received saline injection (10 μ L). Bars show the mean \pm SEM results in 5 mice per group. * = $p < 0.05$ versus control group. # = $p < 0.05$ versus vehicle group (mice only challenged with MSU crystals) (ANOVA followed by Student-Newman-Keuls post test).

Figure 3. MIF contributes to gout inflammation through IL-1 β synthesis. Bone marrow derived macrophages (BMDM) were treated with recombinant MIF (rMIF; 200 ng/mL) and LPS (1 μ g/mL) for 1 hour and the mRNA were extracted from cells for IL-1 β measurement. LPS and rMIF increased the levels of IL-1 β mRNA [A]. The injection of rMIF (100 ng/cavity; 1 h) increased the levels of IL-1 β mRNA in periarticular compared to control group [B]. Mice treated with ISO-1 (50 μ g/cavity) 40 minutes before MSU crystals injection (100 μ g/cavity) reduces IL-1 β mRNA levels 3 hours after the challenge when compared to vehicle-treated mice [C]. Control groups received saline injection (10 μ L). Bars show the mean \pm SEM results in 5 mice per group. * = $p < 0.05$ versus control group. # = $p < 0.05$ versus vehicle group (mice only challenged with MSU crystal) (ANOVA followed by Student-Newman-Keuls post test). & = $p < 0.05$ versus control group (Student's t-test).

Figure 4. MIF induces leukocytes recruitment independently of IL-1 β actions. Mice were treated with IL1-Ra (30 mg/Kg; s.c.) 40 minutes before the injection of recombinant MIF (100 ng/cavity). The treatment with IL1-Ra does not reduce the recruitment of total leukocytes [A] neither neutrophils [B] 15 h after rMIF injection. Control groups received saline injection (10 μ L). Bars show the mean \pm SEM results in 5 mice per group. * = $p < 0.05$ versus control group (ANOVA followed by Student-Newman-Keuls post test).

Figure 5. Correlation between the levels of MIF and IL1 β synovial fluid of patients with gout. Synovial fluid was obtained from patients with acute gout. MIF and IL-1 β were quantified by ELISA [A]. Pearson correlation analysis had shown the association of high levels of MIF with increased levels of IL-1 β $r = 0,636$ and $p \text{ value} = 0,026$ [B].

Table 1 **Patients characteristics**

	Gout	Osteoarthritis
Number of patients	12	8
Gender (female/male)	0/12	5/3
Age (years, mean \pm SD)	54.36 \pm 12.66	52.71 \pm 12.45
Total cells in SF	26268.18 \pm 31205/mm ³	756.25 \pm 202.55/mm ³
Neutrophils (%) in SF	83.09 \pm 21.02	24,42 \pm 27.82

Figure 1

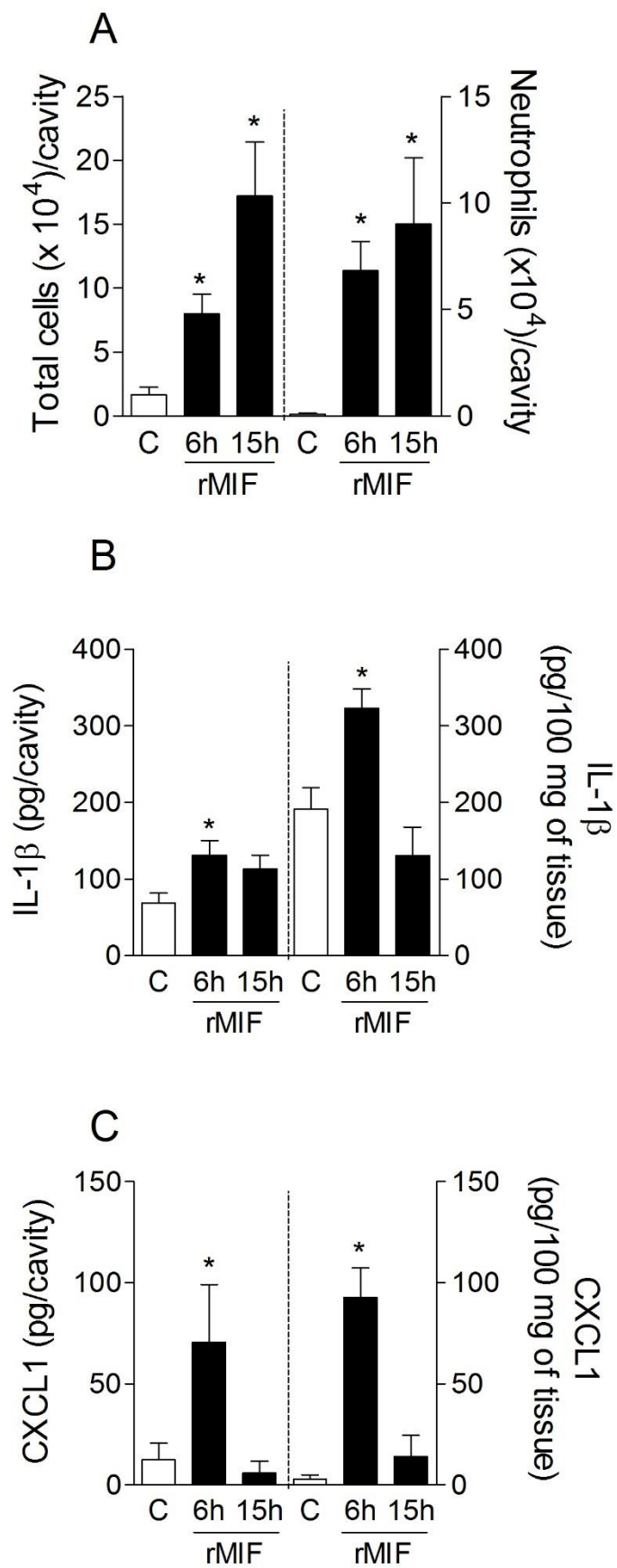


Figure 2

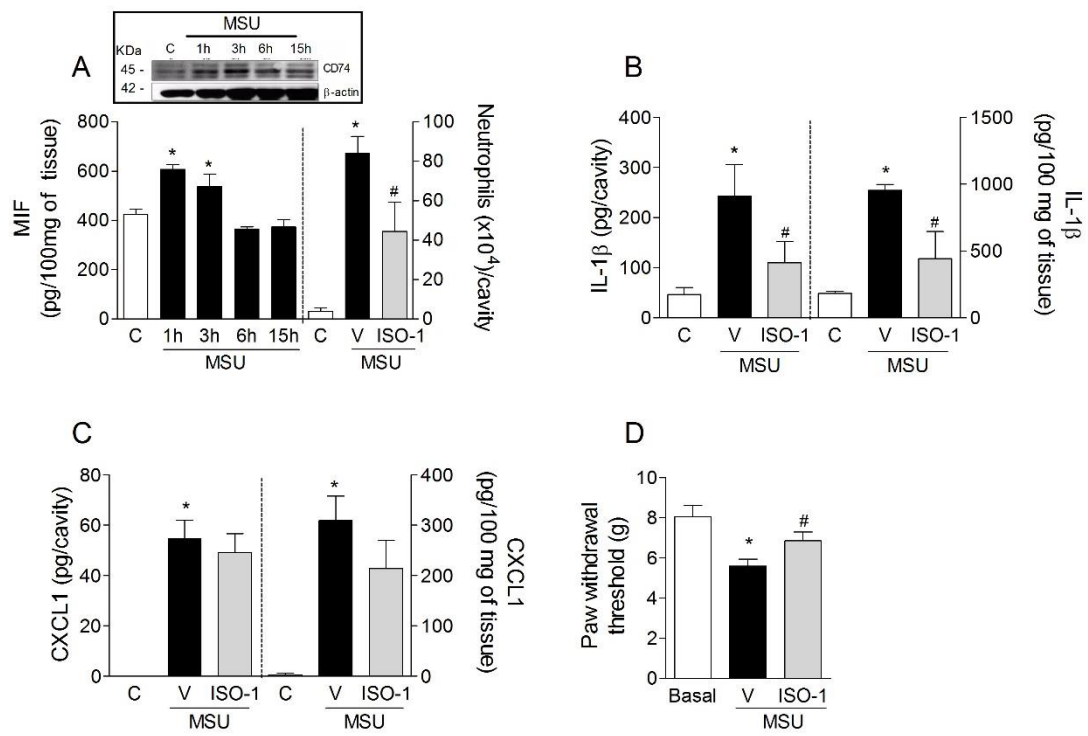


Figure 3

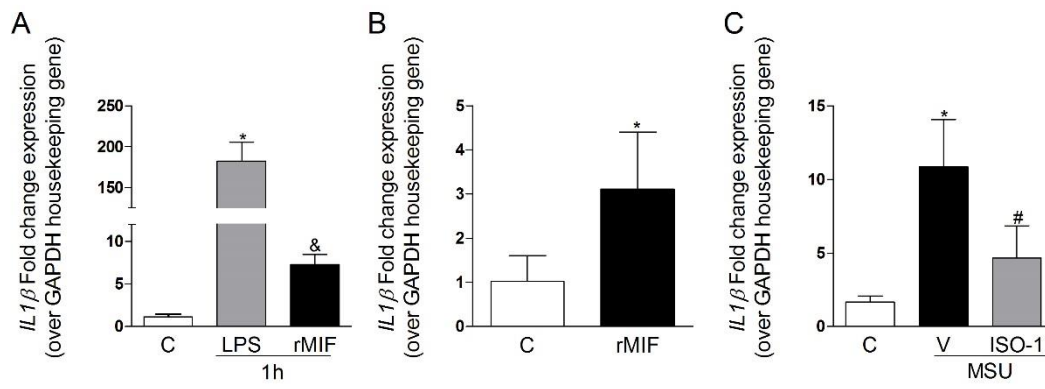
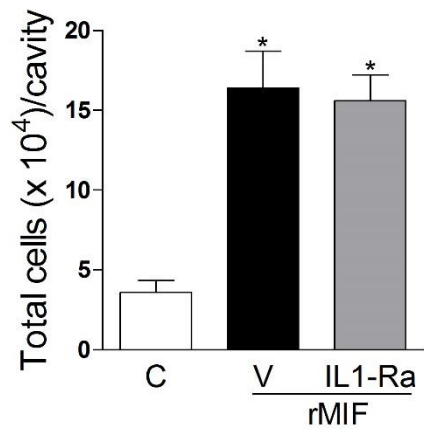


Figure 4

A



B

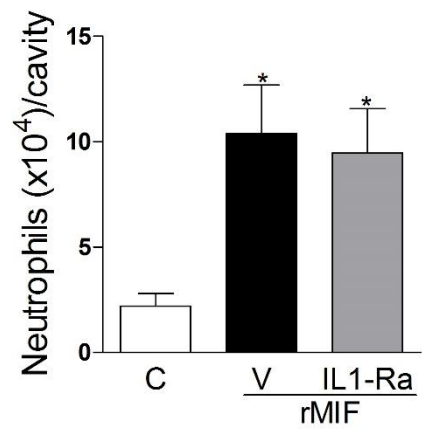


Figure 5

