

**AMANDA DIAS BRAGA**

Papel da Angiotensina-(1-7) na inflamação  
aguda induzida por cristais de ácido úrico

Instituto de Ciências Biológicas  
Universidade Federal de Minas Gerais  
Fevereiro/2020

**AMANDA DIAS BRAGA**

**Papel da Angiotensina-(1-7) na inflamação  
aguda induzida por cristais de ácido úrico**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular

Orientador(a): Dr. Flávio Almeida Amaral

Instituto de Ciências Biológicas  
Universidade Federal de Minas Gerais

Fevereiro/2020

Braga, Amanda Dias.

Papel da Angiotensina-(1-7) na inflamação aguda induzida por cristais de ácido úrico [manuscrito] / Amanda Dias Braga. - 2020.

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

Orientador(a): Dr. Flávio Almeida Amaral.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular.

1. Biologia Celular. 2. Gota. 3. Angiotensinas. I. Amaral, Flávio Almeida.  
II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas.  
III. Título.

CD



**ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE**  
**AMANDA DIAS BRAGA**

324/2020  
entrada  
2º/2018  
2018716977

Às nove horas e trinta minutos do dia 14 de fevereiro de 2020, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "**PAPEL DA ANGIOTENSINA (1-7) NA INFLAMAÇÃO AGUDA INDUZIDA POR CRISTAIS DE ÁCIDO ÚRICO**", requisito final para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, **Dr. Flávio Almeida Amaral**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dr. Flávio Almeida Amaral	UFMG	APROVADA
Dr. Luís Henrique Franco	UFMG	aprovada
Dra. Giselle Santos Magalhães	UFMG	aprovada

Pelas indicações, a candidata foi considerada: APROVADA  
O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 14 de fevereiro de 2020.**

Dr. Flávio Almeida Amaral (Orientador) Flávio Amaral  
Dr. Luís Henrique Franco Luís Henrique Franco  
Drª. Giselle Santos Magalhães Giselle Santos Magalhães

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

Vanessa Pinho da Silva

Prof. Vanessa Pinho da Silva  
Sub-Coordenadora do Programa de  
Pós Graduação em Biologia Celular ICB/UFMG

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador, Dr Flávio Almeida Amaral pela orientação, direcionamento e aprendizado durante o desenvolvimento desse projeto. Obrigado pela paciência e disponibilidade.

Ao Mauro e ao Flávio pela oportunidade de desenvolver esse projeto no Laboratório de Imunofarmacologia e por oferecerem todo o suporte necessário para a realização desse projeto.

Aos colegas e professores do grupo Imunofarmacologia pelo companheirismo, convivência e discussões. Agradeço em especial a Vívian, Daiane, Allyson, Izabela, Eliza, Bruno, Letícia e Juliana, pela ajuda nos experimentos e análises, conversas, risadas, discussões e almoços.

A Ilma, pela disponibilidade, pelo auxílio nos experimentos, pela paciência, pelas conversas e por fazer o laboratório funcionar.

A Luana por acreditar no meu potencial e ter me mostrado esse caminho.

Ao programa de pós-graduação em Biologia Celular, a CAPES, CNPq e Fapemig pelo suporte financeiro.

A minha família, minha mãe e meu pai por serem minha base, por terem me apoiado em cada decisão, pelo amor, pela relação de amizade que sempre existiu, pelas longas conversas ao celular, pelo incentivo e orgulho que sentem por mim. As minhas irmãs, Cibelly e Isabelly, pelo carinho, apoio e por me ensinarem a importância de dividir.

Ao Reinaldo, por ter vivido mais essa etapa ao meu lado, por todo amor, apoio, paciência, conversas, amizade, compreensão e por me ouvir sempre.

A Deus, por tudo que foi a mim concedido.

A todos que de alguma forma contribuíram nas conquistas que me trouxeram a esse momento.

Obrigada por torcerem por mim!

## RESUMO

A gota é uma doença inflamatória causada pela deposição de cristais de urato monossódico (MSU) nas articulações. O ataque agudo da gota começa pelo reconhecimento dos cristais de MSU por células residentes articulares induzindo uma resposta inflamatória local, desencadeada pela ativação do inflamassoma NLRP3 e liberação de IL-1 $\beta$ . A sinalização provocada pela ligação da IL-1 $\beta$  ao seu receptor promove a produção de agentes quimioatraentes, resultando no recrutamento de neutrófilos que intensificam o processo inflamatório nas fases iniciais da resposta. Ang-(1-7) é um peptídeo do sistema renina-angiotensina que atualmente vem se destacando por suas funções no controle da resposta inflamatória. Dentre suas ações estão a redução do nível de várias citocinas e quimiocinas, o que leva a uma redução do acúmulo de células na cavidade articular, além da indução apoptose de neutrófilos e sua eferocitose em modelos de artrite. O objetivo deste trabalho foi avaliar o papel da Ang-(1-7) na inflamação aguda da gota. Os resultados apresentados mostram que a Ang-(1-7) reduz a produção de mediadores inflamatórios e o acúmulo de neutrófilos na articulação submetida a injeção intra-articular de cristais de MSU em camundongos, enquanto o tratamento com o A-779, inibidor do receptor seletivo da Ang-(1-7), demonstrou o papel da Ang-(1-7) endógena no controle do recrutamento de neutrófilos. A Ang-(1-7) também reduziu a produção de IL-1 $\beta$  e TNF em macrófagos peritoneais *in vitro*. Ainda, foi demonstrado que a Ang-(1-7) age diretamente nos neutrófilos reduzindo a adesão celular *in vivo* e migração desses leucócitos sob diferentes estímulos quimiotáticos, tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Assim, a Ang-(1-7) apresentou um papel anti-inflamatório na artrite gotosa, sugerindo uma possível estratégica terapêutica para o tratamento da inflamação articular aguda induzida pela deposição de cristais MSU.

## ABSTRACT

Gout is an inflammatory disease caused by the deposition of monosodium urate crystals (MSU) in the joints. The acute attack of gout begins with the recognition of MSU crystals by resident joint cells inducing a local inflammatory response triggered by the activation of the NLRP3 inflammasome and release of IL-1 $\beta$ . The binding of IL-1 $\beta$  to its receptor promotes the production of chemoattracting agents, resulting in the recruitment of neutrophils that intensify the inflammatory process in the initial phases of the response. Ang-(1-7) is a peptide from the renin-angiotensin system that is currently highlighted for its functions in controlling the inflammatory response. Among its actions are reducing the level of various cytokines and chemokines that leads to a reduction or increase of cells in the joint cavity, in addition to the induction of neutrophil apoptosis and its efferocytosis in arthritis models. The aim of this work was to evaluate the role of Ang-(1-7) in an acute inflammation of gout. To do that, mice were submitted to intra-articular injection of MSU crystals and treated or not with A-779, a selective inhibitor of Ang-(1-7) receptor. The results show that Ang-(1-7) reduces the production of inflammatory mediators and the accumulation of neutrophils in the joint in mice, while treatment with A-779 demonstrated the role of endogenous Ang-(1-7) in controlling the recruitment of neutrophils. Ang-(1-7) also reduced the production of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in peritoneal macrophages *in vitro*. Results also show that Ang-(1-7) acts directly on neutrophils, reducing cell adhesion *in vivo* and migration of these leukocytes under different chemotactic stimuli, both *in vivo* and *in vitro*. Thus, Ang-(1-7) has an anti-inflammatory role in gouty arthritis, suggesting a possible therapeutic strategy for the treatment of acute joint inflammation induced by the deposition of MSU crystals.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Via bioquímica do ácido úrico e sua homeostase .....	19
<i>Figura 2: Ativação do inflamassoma NLRP3 pelos cristais de urato monossódico ....</i>	<i>24</i>
Figura 3: A sinalização da IL-1 liga a ativação do inflamassoma com as cascatas inflamatórias .....	26
Figura 4: O processo de recrutamento de Neutrófilos .....	28
Figura 5: O sistema renina-angiotensina .....	36
Figura 6: Perfil inflamatório da gota aguda.....	48
Figura 7: Ang-(1-7) diminui a secreção de IL-1 $\beta$ , cxcl1 e o infiltrado de neutrófilos <i>in vivo</i> . .....	49
Figura 8: Ang-(1-7) diminui o infiltrado de neutrófilos de forma dependente do receptor MAS.....	51
Figura 9: Ang-(1-7) parece não participar da resolução da inflamação aguda da gota	53
Figura 10: Ang-(1-7) não induz parâmetros resolutivos na aguda da gota.....	54
Figura 11: Ang-(1-7) reduz a secreção de IL-1 $\beta$ <i>in vitro</i> .....	55
Figura 12: Ang-(1-7) reduz a secreção de TNF- $\alpha$ <i>in vitro</i> .....	56
Figura 13: Ang-(1-7) reduz a adesão de neutrófilos .....	57
Figura 14: Ang-(1-7) inibe o recrutamento de neutrófilos <i>in vivo</i> .....	58
Figura 15: Ang-(1-7) reduz a migração de neutrófilos murinos .....	59



## **TABELAS**

<b>Tabela 1: Moléculas que atuam no controle da inflamação aguda gotosa .....</b>	<b>33</b>
<b>Tabela 2: Estratégias experimentais .....</b>	<b>52</b>

## LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

- A-779: antagonista seletivo para o receptor Mas
- ACE: *Angiotensin-converting enzyme* – enzima de conversão da Angiotensina
- ACE2: *Angiotensin-converting enzyme 2* – enzima de conversão da Angiotensina 2
- ACK: tampão de lise de hemácias
- AMP: adenosina monofosfato
- Ang-(1-7): Angiotensina-(1-7)
- Ang II : Angiotensina II
- ANOVA: análise de variância.
- ASC: *apoptosis-associated Speck-like protein containing CARD* – proteína semelhante a Speck associada à apoptose contendo CARD
- AT1R: receptor da angiotensina tipo 1
- AT2R: Angiotensina receptor tipo 2
- ATP: adenosina trifosfatada
- AVE 0991: agonista não-peptídico do receptor Mas
- BSA: *Bovine Serum Albumin* – Soro Albumina Bovina
- C57/BL6: linhagem de camundongos
- CARD: *Caspase-Associated Recruitment domain* – Domínio de recrutamento associado à Caspase
- CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais
- Cp A: Catepsina A
- Cx A: Carboxypeptidase A
- CXCL( ): *Chemokine (CXC motif) Ligand ( )* – quimiocina ligante ( ) com motivo CXC
- CXCR2: C-X-C Motif Chemokine Receptor 2 – Receptor 2 de quimiocina com motivo CXC
- DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* – Meio de Earle modificado por Dulbecco
- DNA: Ácido desoxirribonucleico
- ELISA: *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* – Imunoensaio enzimático
- GMP: guanosina monofosfato
- ICAM ( ): *Intercellular adhesion molecule-* moléculas de adesão intracelulares
- IL-( ): interleucina-( )
- IL-1R: Receptor de IL-1 tipo 1

IL-1RAcP: proteína acessória do receptor de interleucina-1

LFA-1: *leukocyte function-associated antigen-1* – antígeno-1 associado à função leucocitária

LPS: lipopolissacarídeo

LTB4: leucotrieno B4

LYSM: lisozima m específica de células mielomonóicas

MRGPR: família de receptores acoplados a proteína G relacionados ao Mas

mRNA: RNA mensageiro

MSU: *Monosodium urate* – Urato de monossódio

MyD88: “*Myeloid Differentiation primary response protein 88*” – fator de diferenciação mielóide 88

NEP: neutral endopeptidase – endopeptidase neutra

NETs: Neutrophil extracellular traps – armadilhas extracelulares de neutrófilos

NFκB: *Nuclear Factor kappa B* – Fator nuclear kappa B

NLRP( ): *Nucleotide-binding domain and Leucine-rich-Repeat-containing protein( )* – Domínio de ligação a nucleotídeos e proteína contendo Repetição rica em leucina(receptores do tipo NOD contendo o domínio PYD)

OD: densidade óptica

OPD: o-Phenylenediamine dihydrochloride

P2X7: membro da família de receptores ionotrópicos dependentes de ATP

PBS: “*Phosphate-Buffered Saline*” - tampão salina fosfato

PEP: Prolil endopeptidase

pH: potencial hidrogeniônico

PMSF: fluoreto de fenilmetilsulfonil

PNP: purina nucleosídeo fosfotilase

PRRs: Receptores de Reconhecimento de Padrões

PYD – *pyrin domain-containing protein* – proteína contendo domínio pirin

RAS: *renin–angiotensin system* – Sistema renina-angiotensina

RNA: *Ribonucleic acid* – ácido ribonucleico

ROS: *Reactive Oxygen Species* – espécies reativas de oxigênio

rpm: rotações por minuto

TGF-β: *transforming growth factor beta* – fator de crescimento transformante β

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

TNF-( ): *Tumor Necrosis Factor* – Fator de necrose tumoral

TOP: Thimet oligopeptidase

XO: xantina oxidase

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b> .....	15
1.1. Gota (Aspectos gerais).....	15
<b>1.1.2. Epidemiologia da Gota</b> .....	16
<b>1.1.3. Diagnóstico da Gota</b> .....	17
<b>1.1.4. Metabolismo de Purinas e a formação de ácido úrico</b> .....	18
1.2. Patogênese da gota .....	20
<b>1.2.2. Ativação do inflamassoma por cristais de MSU</b> .....	20
<b>1.2.3. IL-1<math>\beta</math></b> .....	24
<b>1.2.4. Neutrófilos</b> .....	26
1.3 – Controle da Resposta Inflamatória .....	30
<b>1.3.1 – Mecanismos anti-inflamatórios e pró-resolutivos</b> .....	30
<b>1.3.2 – Controle da inflamação na gota</b> .....	31
<b>1.3.3 – Ang-(1-7)</b> .....	33
<b>2. Justificativa</b> .....	38
<b>3. Objetivos gerais</b> .....	39
3.1. Objetivos específicos.....	39
<b>4. Métodos</b> .....	40
<b>4.1. Animais</b> .....	40
<b>4.2. Modelo de Gota</b> .....	40
<b>4.2.1. Preparo dos cristais de ácido úrico (cristais de MSU)</b> .....	40
<b>4.2.2. Indução da gota por injeção intra-articular de cristais de MSU</b> .....	41
<b>4.2.3. Tratamento com Ang-(1-7)</b> .....	41
<b>4.2.4. Tratamento com A-779</b> .....	41
<b>4.3. Avaliação da migração de neutrófilos para a cavidade articular</b> .....	41
<b>4.3.1. Contagem total dos leucócitos</b> .....	42
<b>4.3.2. Contagem diferencial dos leucócitos</b> .....	42
<b>4.4. Processamento do tecido periarticular para dosagem de citocinas</b> .....	43

4.4.1. Dosagem de Citocinas e Quimiocinas: Ensaio Imunoenzimático (ELISA).....	43
4.5. Isolamento de neutrófilos de medula óssea.....	44
4.6. Obtenção de macrófagos peritoneais.....	44
4.7. Microscopia intravital.....	45
4.8. Ensaio de quimiotaxia (câmara de Boyden).....	46
4.9. Análises estatísticas.....	46
5. Resultados.....	47
5.1. Perfil inflamatório da gota aguda em camundongos.....	47
5.2. Ang-(1-7) diminui a secreção de IL-1 $\beta$ , CXCL1 e o infiltrado de neutrófilos <i>in vivo</i> .....	48
5.3. Ang-(1-7) diminui o infiltrado de neutrófilos de forma dependente do receptor MAS.....	50
5.4. Ang-(1-7) parece não participar da resolução da inflamação por cristais de MSU.....	51
5.5. Ang-(1-7) reduz a ativação dos macrófagos.....	54
5.6. Ang-(1-7) reduz a migração de neutrófilos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> . ....	56
6. Discussão.....	60
7. Considerações finais.....	65
8. Referência Bibliográficas.....	66

## 1. Introdução

### 1.1. Gota (Aspectos gerais)

A Artrite Gotosa foi uma das primeiras doenças a ser clinicamente reconhecida, sendo considerada até os dias atuais como um dos quadros agudos mais dolorosos vivenciados pelos seres humanos (Martinon and Glimcher, 2006). Identificada em uma múmia pelos egípcios em 2640 antes de Cristo, a podagra (doença aguda que atingia a primeira articulação metatarso falangeana) foi descrita no século V antes de Cristo por Hipócrates, que a considerou como “a doença não transmissível”. Os tofos são nódulos duros de cristais de urato monossódico (MSU), geralmente depositados sob a pele ao redor das articulações. Galeno, no século III, descreveu os tofos, além de reconhecer a relação entre a artrite gotosa e o estilo de vida, considerando também os fatores hereditários. Randolphus de Bocking foi o primeiro a se referir a doença como ‘gota’, no século XIII, o termo derivou do latim *gutta*, que fazia referência a uma crença medieval que considerava a saúde um equilíbrio entre os quatro ‘humores’, sendo que o excesso de um deles iria “gotejar” sobre uma articulação resultando em inflamação e dor. Posteriormente, Thomas Sydenham, portador da doença, descreveu a crise aguda gotosa. Devido a relação entre a artrite gotosa e o estilo de vida dos acometidos, com acesso a uma alimentação farta e bebidas alcoólicas, a gota foi também referida como “artrite dos ricos”, sendo até mesmo desejada por sua prevalência entre os políticos e aqueles socialmente poderosos (Nuki and Simkin, 2006).

A gota é a forma mais comum de artrite inflamatória, causada por deposição de cristais de MSU no espaço articular, estruturas peri-articulares e tecidos moles (Carvalho *et al.*, 2019)(Yang, Shin and Jo, 2012). A progressão da gota é frequentemente definida por quatro fases fisiopatológicas. A hiperurcemia assintomática é a primeira fase, onde não há manifestações clínicas da doença, embora os níveis do ácido úrico nos fluidos biológicos estejam acima dos níveis de saturação. A segunda fase é a gota aguda, caracterizada por uma crise súbita de dor articular que aumenta em um período de 6 a 12 horas, associada a calor, rubor, e edema locais, causando sensibilidade ao toque (Martinon, 2010). A articulação frequentemente acometida é a primeira metatarsofalângica, mas pode acometer

outras articulações. A duração da crise aguda da gota varia de horas a poucos dias. Após o término, o paciente passa para a terceira fase, chamada fase intercrítica, assintomática e de duração variável que tende a diminuir com a progressão da doença. Dor contínua de intensidade moderada em várias articulações e a formação de tofos são as características patológicas da gota tofácea crônica, a quarta fase. Geralmente, os tofos são indolores, mas podem resultar em limitações na mobilidade da articular ou ainda causar ulcerações (Dalbeth, Merriman and Stamp, 2016).

### **1.1.2. Epidemiologia da Gota**

Atualmente, a prevalência geral da gota é de 1 a 4% da população mundial, sendo os países desenvolvidos os mais afetados e sua incidência anual é de 2,68 casos/1000 pessoas (Kuo, Grainge, Zhang, *et al.*, 2015). De acordo com estudo realizado no Reino Unido, a prevalência de gota foi de 2,49% e a incidência de 1,77 por 1.000 pessoas/ano em 2012, com ambos os números sendo maiores do que em 1997 (Kuo, Grainge, Mallen, *et al.*, 2015). Nos Estados Unidos, a prevalência de gota aumentou significativamente de 2,9%, entre 1988 e 1994, para 3,9% entre 2007 e 2008. Contudo, a prevalência geral permaneceu inalterada quando comparada ao período de 2015–2016, segundo a National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES), mesmo com o aumento do número de pessoas diagnosticadas com gota de 8,3 milhões para 9,2 milhões. No Brasil ainda existe uma carência de estudos epidemiológicos de gota (Singh, Lingala and Mithal, 2019)(Zhu, Pandya and Choi, 2011).

A epidemiologia da gota passou por mudanças significativas ao longo dos anos, deixando de ser uma doença “de ricos” e passando a afetar todos os aspectos socioeconômicos (Kedar and Simkin, 2012). Esse aumento gradual na incidência e prevalência da gota está diretamente relacionado ao aumento da hiperuricemia, embora uma pequena parte da população com índices elevados de ácido úrico sérico venha a desenvolver a artrite gotosa, sugerindo a importância de outros fatores para a produção dos cristais (Doherty, 2009). Além disso, evidências atribuem a mudanças no estilo de vida o aumento nos riscos de desenvolvimento da gota: fatores dietéticos, incluindo maior ingestão de carne, frutos do mar, bebidas alcoólicas, refrigerantes açucarados e alimentos ricos em frutose; comorbidades como hipertensão, insuficiência renal, hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia, hiperuricemia, diabetes e



obesidade também foram relacionadas ao maior risco de gota de incidente; ainda, medicamentos diuréticos estão ligados ao aumento nos níveis de ácido úrico(Choi *et al.*, 2004)(Choi and Curhan, 2008). Em contrapartida, estudos demonstram que ingestão de leite e consumo de café foram associados com menor risco de gota incidente e, em alguns casos, menor taxa de crises de gota (Choi *et al.*, 2004)(Kiyohara *et al.*, 1999).

### **1.1.3. Diagnóstico da Gota**

Embora o diagnóstico clínico da gota seja amplamente utilizado em todo o mundo, a análise do líquido sinovial, para identificação de cristais de MSU usando microscopia de luz polarizada (padrão-ouro), ainda é aconselhada pela Liga Europeia Contra o Reumatismo (EULAR) para excluir outras doenças, principalmente a artrite séptica e confirmar o diagnóstico. Os cristais de MSU são encontrados no líquido sinovial em todos os estágios da doença; durante ataques, no período intercrítico ou na gota crônica tofácea (Richette and Bardin, 2010).

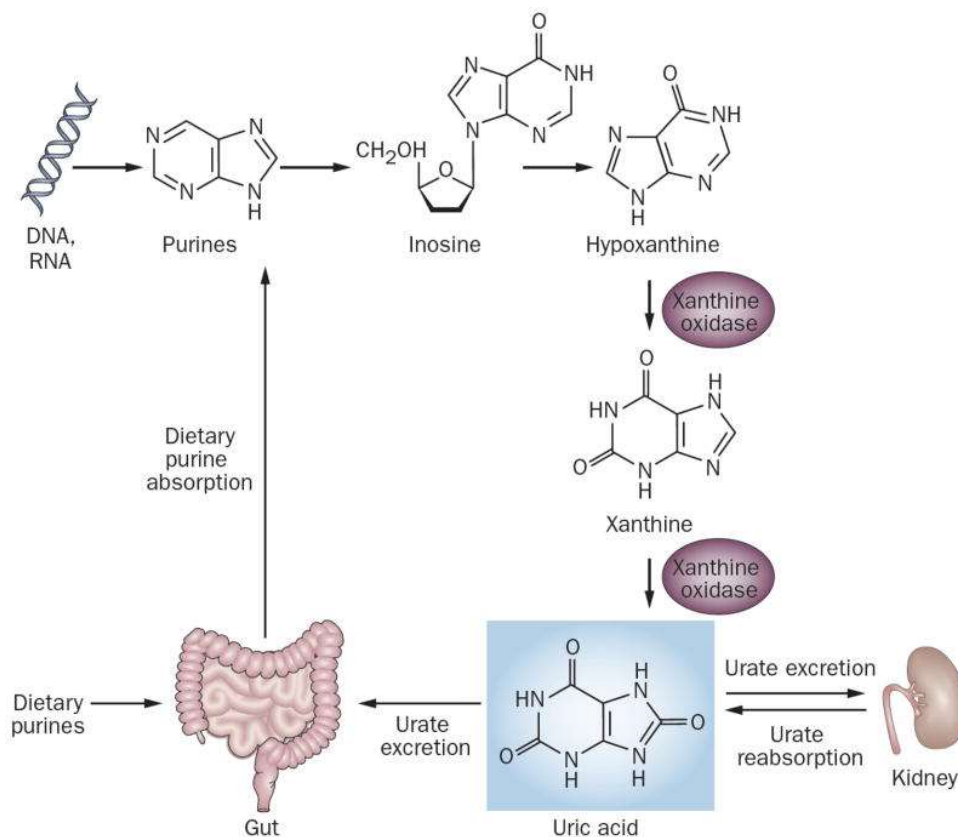
Dentre as recomendações da EULAR, na ausência da possibilidade de análise do líquido sinovial, o diagnóstico clínico de gota é suportado por características sugestivas: envolvimento monoarticular de um pé (especialmente o primeiro metatarso) ou articulação do tornozelo, episódios recorrentes de artrite aguda semelhantes, início rápido de dor e inchaço intensos (<24 horas); eritema, sexo masculino, doenças cardiovasculares associadas e hiperuricemia. Embora esses recursos sejam altamente sugestivos, não são específicos para a gota, fazendo necessária a análise do aspirado sinovial, não sendo aceitável o diagnóstico baseado apenas na presença de hiperuricemia (Richette *et al.*, 2019).

Quando o diagnóstico clínico de gota é incerto e a identificação de cristais não é possível, é necessária a investigação por exames de imagem para procurar a deposição de cristais da MSU e características de qualquer diagnóstico alternativo. A ultrassonografia pode ser mais útil no estabelecimento de um diagnóstico com suspeita de surto de gota ou artrite gotosa crônica pela detecção de tofos não evidentes no exame clínico ou um sinal de contorno duplo nas superfícies da cartilagem, que é altamente específico para depósitos de urato nas articulações (Richette *et al.*, 2019).

Fatores de risco para hiperuricemia crônica devem ser pesquisados em todas as pessoas com gota. Além da avaliação sistemática da presença de comorbidades associadas em pessoas com gota, incluindo obesidade, insuficiência renal, hipertensão, cardiopatia isquêmica, insuficiência cardíaca, diabetes e dislipidemia (Richette *et al.*, 2019).

#### **1.1.4. Metabolismo de Purinas e a formação de ácido úrico**

O ácido úrico é o produto final da via metabólica das purinas. Como a renovação fisiológica dos ácidos nucleicos ocorre constantemente, o ácido úrico está presente como um constituinte normal intracelular e em fluidos biológicos. Além disso, o ácido úrico exógeno pode ser obtido através da dieta (So, 2008). Os nucleotídeos purínicos, como adenina e guanina oriundos do DNA e RNA, perdem um grupo fosfato a partir da ação da enzima 5'-nucleotidase, formando o monofosfato de adenosina no caso da adenina (AMP) e o monofosfato de guanina no caso da guanina (GMP). Os nucleosídeos inosina e guanosina são posteriormente hidrolisados em hipoxantina e guanina à base de purina, respectivamente, pela purina nucleosídeo fosforilase (PNP). A hipoxantina é então oxidada para formar xantina pela xantina-oxidase (XO), e a guanina é desaminada para formar xantina pela guanina desaminase. A xantina é novamente oxidada pela xantina oxidase para formar o produto final, o ácido úrico (Figura 1) (Maiuolo *et al.*, 2016).



**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 (retirado de Rock, Kataoka and Lai, 2013).

A maioria dos mamíferos expressa a uricase hepática, uma enzima peroxisomal que oxida o ácido úrico em alantoína, que é altamente solúvel, e água. Essa uricase endógena reduz um pouco os níveis de ácido úrico e, conseqüentemente, essas espécies não desenvolvem gota em condições naturais. A espécie humana não produz uricase e isso explica por que os níveis de urato são muito mais altos que os de outros mamíferos (Rock, Kataoka and Lai, 2013)(So, 2008). Em indivíduos saudáveis, o ácido úrico está presente no sangue em concentrações de ~ 6,0 mg/dl, o que é um nível notavelmente alto dado que o limiar para a saturação desta molécula em fluidos biológicos é de ~7,0 mg/dl. Quando os indivíduos desenvolvem hiperuricemia como consequência da ingestão excessiva de purinas ou predisposição genética, o ácido úrico satura os fluidos corporais, ocorrendo o risco de nucleação e formação dos cristais de MSU nas suas articulações (Rock, Kataoka and Lai, 2013).

A hiperuricemia é o principal fator que facilita a formação dos cristais de MSU, embora outros fatores (como a temperatura local, pH e o trauma) também possam desempenhar um papel relevante. Uma vez formados, os cristais de MSU são capazes de provocar uma resposta inflamatória pela ativação de leucócitos e células parenquimais do tecido sinovial (So, 2008).

## 1.2. Patogênese da gota

### **1.2.1. Ativação do inflamassoma por cristais de MSU**

Os cristais de MSU depositados no interior e ao redor das articulações são fagocitados por células fagocíticas sinoviais, como fibroblastos e macrófagos (Martin, Walton and Harper, 2009). A interiorização dos cristais de MSU por essas células inicia uma cascata inflamatória caracterizada pela ativação da enzima intracelular caspase-1, secreção de citocinas e quimiocinas inflamatórias, como interleucina (IL)-1 $\beta$ , fator de necrose tumoral (TNF), IL-6 e CXCL8. Esses mediadores inflamatórios são responsáveis pelo recrutamento de células inflamatórias, neutrófilos e monócitos, para o tecido sinovial, também conhecido como sinóvia (Martin, Walton and Harper, 2009) (Pétrilli and Martinon, 2007) (Richette and Bardin, 2010).

Em 2006, Martinon e colaboradores sugeriram o envolvimento do inflamassoma NLRP3 na indução de inflamação aguda gotosa. Foi demonstrado que macrófagos de camundongos deficientes em componentes do Inflamassoma NLRP3 e sua via de sinalização, como caspase-1 e ASC, têm uma menor capacidade de ativação de IL-1 $\beta$  quando estimulados por cristais de MSU (Martinon *et al.*, 2006a). Além disso, camundongos deficientes em NLRP3, ASC ou receptor de IL-1 $\beta$  (IL-1R) também mostraram comprometimento do recrutamento de neutrófilos após injeção intraperitoneal ou intra-articular de cristais de MSU, apoiando o papel crítico do inflamassoma NLRP3 na detecção da deposição de MSU e subsequente ativação da resposta imune inata (Martinon *et al.*, 2006)(Amaral *et al.*, 2012).

Embora já seja bem esclarecido o papel central do inflamassoma, especificamente o inflamassoma NLRP3, na inflamação aguda gotosa, ainda não está claro o mecanismo que liga os cristais de MSU a ativação desse complexo. Estudos apontam a família de receptores toll-like (TLRs) principalmente TLR2 e TLR4 como os responsáveis por reconhecer os cristais de MSU e desencadear uma cascata de sinalização *in vitro*, primordial para o início do processo inflamatório (Liu-Bryan *et al.*,

2005). Em trabalho recente do nosso grupo, Batista e colaboradores demonstraram que a pentraxina 3 pode se ligar aos cristais de MSU, promovendo a fagocitose desses cristais através da ativação de receptores FcγRIII, culminado no aumento da ativação de caspase-1 e consequente ativação de IL-1 $\beta$  (Batista *et al.*, 2019). Além disso, os cristais de MSU podem interagir com o colesterol presente na membrana celular, sem a necessidade de um receptor específico, e desencadear uma cascata intracelular de sinalização dependente de Syk (Ng *et al.*, 2008).

O papel central de células fagocíticas mononucleares na resposta inicial dos cristais de ácido úrico já é bem descrito. Monócitos estimulados por cristais de MSU secretam citocinas inflamatórias, principalmente IL-1 $\beta$  (Yagnik *et al.*, 2000). Os cristais de MSU depositados nas articulações interagem com macrófagos residentes, levando a transcrição dos componentes do NLRP3. Esses macrófagos também fagocitam os cristais de MSU, desencadeando sinais que resultam na oligomerização do inflamassoma NLRP3, ativação da caspase-1 e subsequente clivagem da pró-IL-1 $\beta$  (forma inativa) para produzir IL-1 $\beta$  ativa. Após a clivagem, a IL-1 $\beta$  ativa é liberada para o fluido sinovial e se liga aos receptores da IL-1 expressos pelas células endoteliais e células residentes sinoviais (Yagnik *et al.*, 2000).

A sinalização pró-inflamatória desencadeada pela interação dos cristais de MSU com células residentes é dependente da pré-ativação celular (priming), considerada o primeiro sinal de ativação do inflamassoma NLRP3 nas crises gotosas agudas (So and Martinon, 2017). Os níveis elevados de ácido úrico solúvel, glicose, estresse por cisalhamento são alguns dos estímulos que podem primar as células *in vivo* (Braga *et al.*, 2017)(Zhou *et al.*, 2010). *In vitro* o priming é feito pelos ligantes de outros PRRs (como os ligantes de TLR) ou citocinas, como TNF (Amaral *et al.*, 2016) e MIF (Galvão *et al.*, 2016). Nessa etapa, ocorre o controle da expressão dos componentes do inflamassoma além da expressão de proteínas que serão ativadas através da modificação por caspases inflamatórias (So and Martinon, 2017).

Ainda que seja necessário um primeiro sinal para a ativação do inflamassoma, esse sinal não é suficiente para ativar a cascata de acontecimentos necessário para a montagem do complexo. Desse modo, um segundo sinal, mais específico que o primeiro, é necessário para a ativação do inflamassoma (So and Martinon, 2017). Esse sinal direciona de forma direta a agregação e polimerização pós-transcricional dos componentes do inflamassoma, processo promovido por microtúbulos (Misawa *et al.*, 2013). Alguns mecanismos têm sido identificados como responsáveis por

desencadear o segundo sinal para promover a ativação do NLRP3, dentre eles efluxo de potássio; a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), derivadas de mitocôndrias e a desestabilização fagolisossômica após a digestão de agonistas de partículas grandes como os cristais de MSU. (Rathinam, Vanaja and Fitzgerald, 2012).

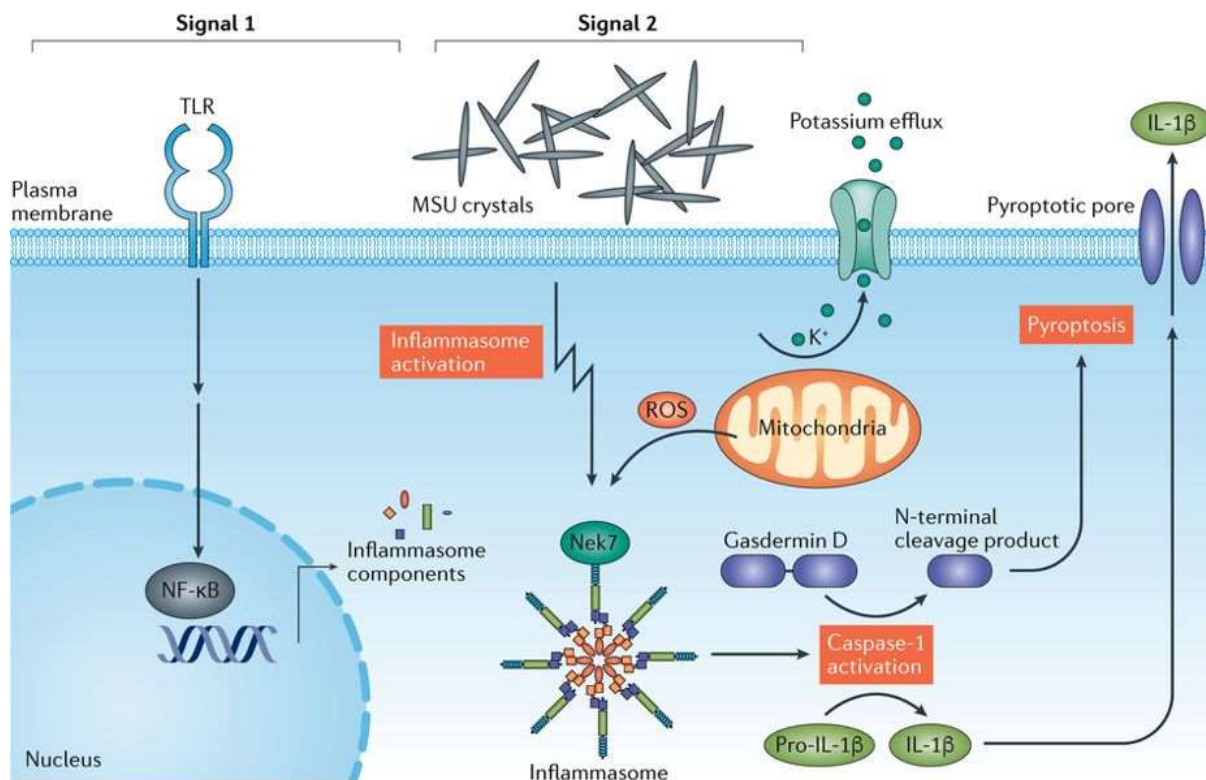
O sinal de montagem do complexo protéico do inflamassoma pode envolver um mecanismo geral compartilhado por vários ativadores do inflamassoma. A via fagocítica, onde a internalização dos cristais pode romper a membrana do fagolisossomo liberando a cathepsina B - uma protease lisossômica – é um desses ativadores, atuando como segundo sinal para a montagem do inflamassoma (Hornung *et al.*, 2008). Além disso, o ácido úrico solúvel também já foi demonstrado capaz de ativar a oligomerização do inflamassoma (Braga *et al.*, 2017). É sugerido também um papel de destaque a perturbações iônicas, principalmente o efluxo de potássio mediado por receptor P2X7 - receptor do ATP - na ativação do NLRP3, sendo que o bloqueio do efluxo de potássio inibe essa ativação (Perregaux and Gabel, 1994)(Muñoz-Planillo *et al.*, 2013)(Kahlenberg and Dubyak, 2004)(Pétrilli and Martinon, 2007). A perturbação iônica é necessária para a geração de ROS, determinante para a montagem do inflamassoma NLRP3, sendo aumentada pelo leucotrieno B4 induzido em respostas ao próprio cristal de MSU, de forma que a inibição de ROS bloqueia a liberação de IL-1 $\beta$  em resposta à MSU (Kingsbury, Conaghan and McDermott, 2011) (Amaral *et al.*, 2012)(Tavares *et al.*, 2019).

O inflamassoma NLRP3 é composto de três componentes; um receptor de reconhecimento de padrões (PRRs), membro da família dos receptores do tipo NOD (NLR), capaz de detectar patógenos e moléculas endógenas derivadas de lesão celular com domínios de repetição ricos em leucina (Kanneganti, Lamkanfi and Núñez, 2007). O NLR é uma proteína de oligomerização que contém domínios de interação proteica que permitem a associação com o segundo componente, a proteína adaptadora ASC (contendo um domínio de recrutamento de caspase)(He, Hara and Núñez, 2016). A proteína ASC é sintetizada na forma de monômeros e, quando estimulados, podem formar oligômeros, amplificando os sinais detectados pelo NLR e envolvendo praticamente todas as moléculas de ASC em um complexo celular ativo. As moléculas de ASC são responsáveis pelo recrutamento do terceiro elemento do inflamassoma, responsável pelo recrutamento da caspase efetora que

ativa citocinas pró-inflamatórias, como a caspase-1 (Bortoluci and Medzhitov, 2010) (Rathinam, Vanaja and Fitzgerald, 2012).

A caspase-1 recrutada pela proteína adaptadora ASC permanece inativa (pro-caspase-1) sendo que sua ativação ocorre através da auto clivagem depende de sinal (Martinon, Burns and Tschopp, 2002). A forma ativa da caspase-1 atua clivando as moléculas de pró-IL-1 $\beta$  e pró-IL-18 em citocinas pró-inflamatórias ativas IL-1 $\beta$  e IL-18 (Thornberry *et al.*, 1992). Além disso, a caspase-1 atua na clivagem de outra molécula relacionada ao inflamassoma, a gasdermina D. A caspase-1 libera a porção N-terminal da Gasdermina D, que polimeriza na membrana plasmática, formando poros. A perda da integridade da membrana leva então a morte celular por piroptose resultando na amplificação da resposta inflamatória e facilitando a liberação de citocinas, incluindo a IL-1 $\beta$  (Figura 2) (So and Martinon, 2017). Existem ainda outras formas de secreção de IL-1 $\beta$ , como a liberação através microvesículas, liberação de lisossomas ou autofagossomo, brotamento de exossomos ou mesmo os poros D de gasdermina D, sem a ocorrência de morte celular (MacKenzie *et al.*, 2001)(Dupont *et al.*, 2011)(Qu *et al.*, 2007)(Evavold *et al.*, 2018).

Na inflamação aguda da gota, a secreção de IL-1 $\beta$  por inflamassomas resulta a uma resposta inflamatória articular, com vasodilatação e rápido recrutamento de neutrófilos para a articulação (Kingsbury, Conaghan and McDermott, 2011).



**Figura 2: Ativação do inflamassoma NLRP3 pelos cristais de urato monossódico**

O inflamassoma NLRP3 deve ser preparado antes da ativação. O priming (sinal 1) induz a expressão de componentes funcionais do inflamassoma, como o NLRP3. Os cristais de MSU fornecem o sinal 2, desencadeando a montagem do inflamassoma. A interação de cristais de MSU com a membrana plasmática promove uma resposta celular que ainda é pouco compreendida, mas inclui marcas da ativação de NLRP3, incluindo efluxo de potássio através de canais iônicos e perturbações mitocondriais que levam à produção e liberação de ROS para o citosol. A proteína adaptadora ASC é recrutada para o inflamassoma se organizando em filamentos. A caspase-1 é recrutada por ASC e oligomeriza ao longo dos filamentos de ASC, levando à ativação autoproteolítica da caspase-1 responsável pela clivagem proteolítica e a maturação de pró-IL-1 $\beta$  em IL-1 $\beta$  biologicamente ativa. A caspase-1 também promove a clivagem da gasdermina D liberando sua porção N-terminal que oligomeriza na membrana plasmática, causando a formação de poros pirotóticos. Esses poros interrompem a integridade da membrana plasmática celular e podem contribuir para a liberação de mediadores inflamatórios, incluindo IL-1 $\beta$ . Adaptado de (So and Martinon, 2017).

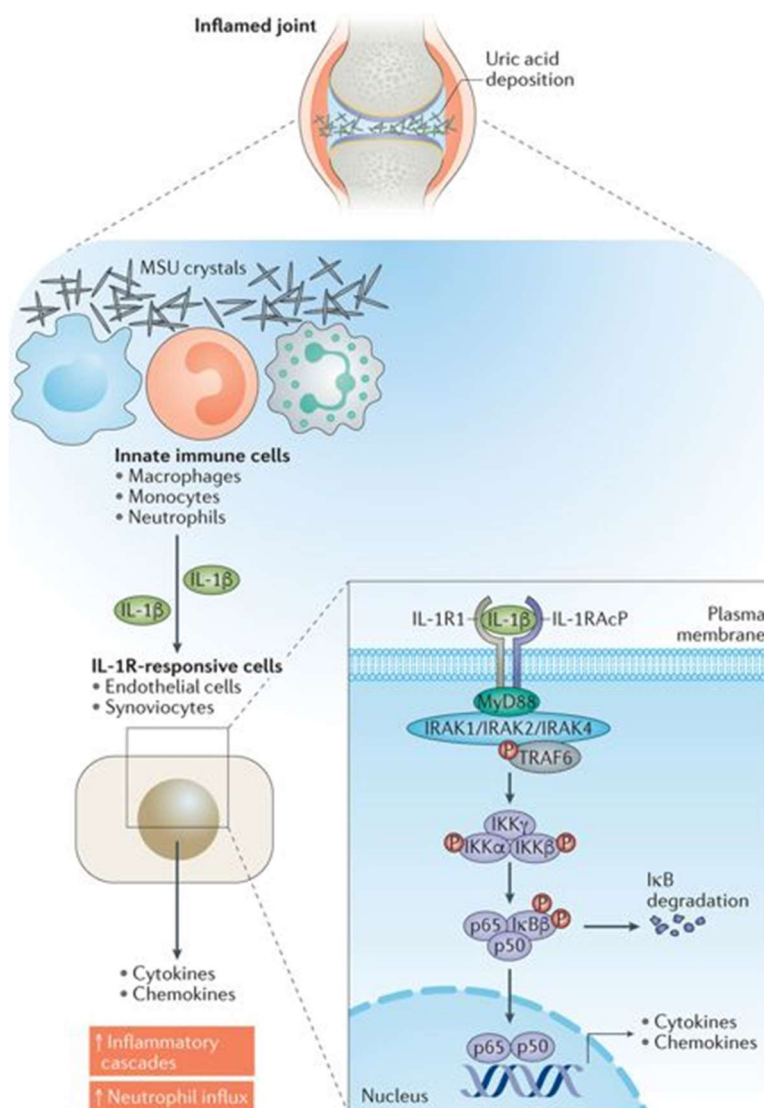
### 1.2.2. IL-1 $\beta$

A IL-1 $\beta$  é a principal citocina inflamatória envolvida na inflamação gotosa aguda. Essa citocina é produzida na forma de pró-IL-1 $\beta$  (com peso molecular de 35 Kda) e sua atividade biológica é dependente de clivagem pela caspase 1, embora as caspase 11 (homólogos caspase 4 e 5 em humanos) e caspase 8 também possam desempenhar essa função. A IL-1 $\beta$  ativa é então secretada para fluido articular, onde se liga ao seu receptor expresso em células residentes sinoviais e em células epiteliais (Pétrilli and Martinon, 2007).



Os receptores de IL-1 $\beta$  são heterodímeros contendo o ligante, receptor e co-receptor. Quando a IL-1 $\beta$  se liga ao seu receptor específico (IL-1R1) ocorre uma mudança conformacional que permite a ligação do co-receptor (IL-1RAcP) (Greenfeder *et al.*, 1995). A interação entre os domínios extracelulares de IL-1R1 e IL-1RAcP leva a ligação dos domínios intracelulares de receptor Toll/receptor de IL-1 $\beta$ , ocasionando o recrutamento da proteína de diferenciação mielóide (MyD88) e ao início de uma via de sinalização de quinases (Dinarello, 2019). Essa sinalização polipeptídica que resulta na fosforilação e degradação do inibidor do fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), levando a transcrição e secreção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas ligantes ao receptor CXCR2, especialmente o CXCL1 e CXCL8 (nos humanos), promovendo o recrutamento de neutrófilos para o tecido articular (Figura 3)(Russo *et al.*, 2014)(Chen *et al.*, 2006).

Além da produção de quimioatraentes a IL-1 $\beta$  também induz a expressão de moléculas de adesão celular, como selectinas e integrinas, aumento da permeabilidade vascular e vasodilatação, eventos fundamentais para a migração de leucócitos do sangue pra a articulação (Chapman *et al.*, 1997)



**Figura 3: A sinalização da IL-1 liga a ativação do inflamassoma com as cascatas inflamatórias**

Os sinais de IL-1 $\beta$  através do complexo receptor de IL-1, composto pelo receptor de IL-1 tipo 1 (IL-1R1) e sua proteína acessória do receptor de cofator IL-1 (IL-1RAcP), leva ao recrutamento da proteína adaptadora MyD88. A expressão de IL-1R1 é generalizada, tanto em leucócitos quanto em células endoteliais e sinoviais. A expressão de IL-1R1 resulta no recrutamento de proteínas efetoras, desencadeando a fosforilação e degradação do inibidor de NF- $\kappa$ B. Adaptado de (So and Martinon, 2017).

### 1.2.3. Neutrófilos

Os neutrófilos raramente são encontrados em articulações saudáveis, sendo recrutados rapidamente por fatores quimiotáticos produzidos por células residentes sinoviais. Da mesma forma, a ativação das células endoteliais aumenta ainda mais a resposta inflamatória e a migração de neutrófilos. Isso leva a um influxo local de neutrófilos, muitas vezes considerado como um “exame de neutrófilos” (Ragab,

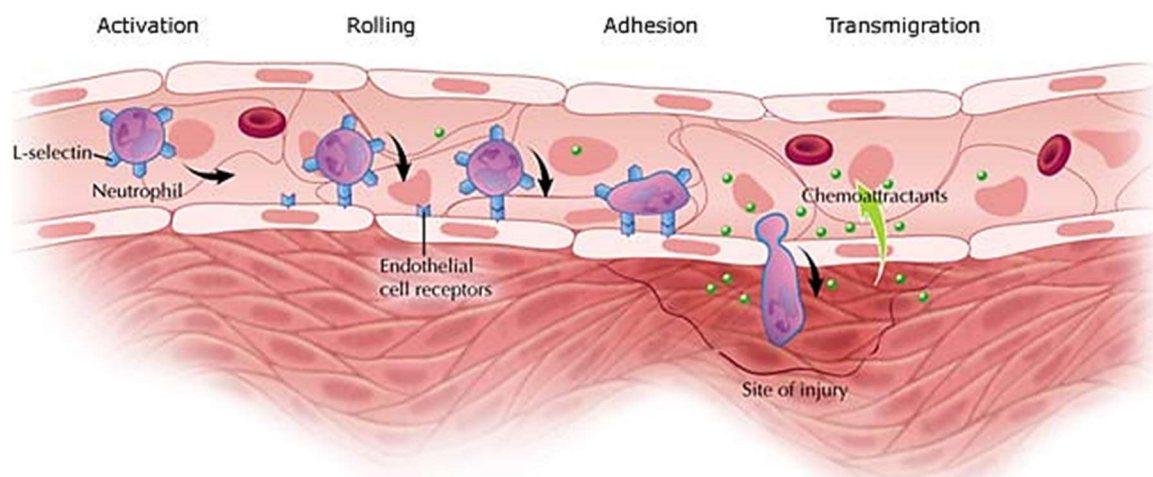
Elshahaly, and Bardin 2017)(Lämmermann *et al.*, 2013). Os sinais para o recrutamento de neutrófilos do sangue até a chegada destes na articulação compreendem várias etapas que envolvem a interação com o endotélio. A ativação endotelial na gota é estimulada por citocinas secretadas pelas células residentes sinoviais, principalmente IL-1 $\beta$  e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), que ativam a expressão de moléculas de adesão (Chapman *et al.*, 1997). Inicialmente, os neutrófilos livres no fluxo sanguíneo entram em contato com as células endoteliais ativadas, fazendo com que ocorra o rolamento celular ao longo da parede do vaso. Esse processo é mediado pelas P- e E-selectinas expressas nas células endoteliais (Chapman *et al.*, 1994)(Kanwar *et al.*, 1997). O rolamento dos neutrófilos propicia a interação com quimiocinas presentes na camada superficial do endotélio através da ligação aos seus receptores nos neutrófilos, especialmente os ligantes do receptor CXCR2 (quimiocinas que compartilham um motivo ELR - ácido glutâmico-leucina-arginina), importantes no contexto da migração desses leucócitos (Russo *et al.*, 2014) A sinalização desencadeada por essa ligação aos receptores acoplados à proteína G resulta na a ativação de integrinas (Williams *et al.*, 2011).

As integrinas ativadas entram em contato com seus ligantes expressos no endotélio, o que ocasiona a redução da velocidade de rolagem desses leucócitos, propiciando uma interação de alta afinidade entre neutrófilo e endotélio resultando na adesão firme e estável entre esses dois tipos celulares (Ley *et al.*, 2007). Entretanto, já foi demonstrado que alterações no fenótipo endotelial podem induzir a expressão de integrinas de forma suficiente para ocasionar o recrutamento de leucócitos independente das seletinas (Figura 4) (Hickey, Granger and Kubes, 1999). A partir desse ponto, os neutrófilos extravasam para os tecidos pelo processo de transmigração através da barreira celular endotelial (Ley *et al.*, 2007).

A ativação de vias do complemento também está relacionada a chegada de neutrófilos na articulação acometida, representadas pela produção de C3a e C5a. Além disso, C5a age como sinal endógeno que é requerido para produção de pró-IL-1 $\beta$  e IL-1 $\beta$  madura induzida por cristais de MSU (An *et al.*, 2014). Tanto a via clássica quanto a alternativa do complemento estão envolvidas na inflamação aguda gotosa. Foi demonstrado que vários componentes do complemento, incluindo C1, C3 e C5, se ligam a superfície do cristal (Shi, Mucsi and Ng, 2010). O complexo de ataque a membrana, resultante da cascata do complemento, está relacionado a secreção de

IL-8/CXCL8 após estímulo com cristais de MSU, estando assim envolvido no recrutamento de neutrófilos para a articulação inflamada (Tramontini *et al.*, 2004).

A ligação dos quimioatraentes aos receptores expressos em leucócitos leva a ativação de enzimas pertencentes a família de fosfatidilinositol-3-cinases (PI3K), responsáveis por fosforilar fosfolipídeos de inositol, levando a montagem de uma cascata que culmina na fosforilação da serina-treonina-quinase Akt (Cantley, 2002)(Franke *et al.*, 1995). A atividade catalítica de Akt fosforilado (pAkt), resulta na fosforilação de uma série de outras proteínas que ordenam o crescimento, movimentação, ativação e a sobrevivência celular (Cantley, 2002). Um estudo mostrou que a PI3K $\gamma$ , uma isoforma de PI3K, participa do recrutamento de neutrófilos por diferentes estímulos (CXCL1, C5a e FMLP) e da migração desses leucócitos (Pinho *et al.*, 2007). A PI3K $\gamma$  tem um papel crítico na inflamação gotosa experimental aguda, atuando desde o controle da ativação da caspase-1, no recrutamento e ativação de neutrófilos de maneira dependente da produção de ROS (Tavares *et al.*, 2019).



**Figura 4: O processo de recrutamento de Neutrófilos**

Neutrófilos circulantes na corrente sanguínea interagem com quimiocinas produzidas por células endoteliais ativadas. Esses leucócitos então rolam e aderem aos vasos sanguíneos, iniciando o processo de transmigração entre as células epiteliais direção ao local inflamado (retirado de Massachusetts General Hospital, 2004-2007).

Na gota, a partir do processo de transmigração, os neutrófilos infiltrados chegam as articulações inflamadas onde entram em contato com os cristais de MSU. A fagocitose desses cristais promove a ativação e consequente liberação de mediadores responsáveis pela vasodilatação, eritema e dor associados ao ataque

agudo da gota, amplificando a resposta inflamatória. Dentre esses mediadores incluem-se as espécies reativas de oxigênio, leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>), prostaglandina E<sub>2</sub>, IL-1, quimiocinas e proteínas tais como S100A8, S100A9 que atuam amplificando a resposta inflamatória aguda da gota (Amulic *et al.*, 2012) (Mitroulis, Kambas and Ritis, 2013). Além desses mediadores, a fagocitose dos cristais de MSU pelos neutrófilos também induz a liberação das serina-proteases elastase, proteinase 3 e catepsina G, componentes dos grânulos azurófilos. A serino-proteases são então direcionadas para os fagossomos e a membrana plasmática, onde atuam regulando proteoliticamente as atividades de uma variedade de citocinas e quimiocinas (Korkmaz *et al.*, 2010). Os neutrófilos portanto, são capazes de secretar IL-1 $\beta$  ativa através da clivagem enzimática da pró-IL-1 $\beta$  por essas proteases, embora de forma menos eficiente do que a atividade da caspase-1 (So and Martinon, 2017). Além disso, essas enzimas, associadas com a liberação de ROS, também geram danos teciduais (Korkmaz *et al.*, 2010).

Ainda, a fagocitose dos cristais de MSU por neutrófilos, associados a espécies reativas de oxigênio (ROS), induzem a liberação do DNA pelas células (Schauer *et al.*, 2014). Os neutrófilos que passam por esse processo formam armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs), descritas em 2004. As NETs são estruturas compostas por proteínas de grânulos azurofílicos (elastase de neutrófilos, catepsina G e mieloperoxidase), grânulos específicos e grânulos terciários de neutrófilos, além de DNA (Brinkmann *et al.*, 2004). Essas estruturas neutrófilicas liberadas no meio extracelular atuam como padrão molecular associadas a danos (DAMPs), promovendo respostas inflamatórias (Li *et al.*, 2018). Na gota aguda, a IL-1 $\beta$  secretada por macrófagos impulsiona a liberação de NETs, contribuindo assim para a inflamação gotosa (Sil *et al.*, 2017). Entretanto, estudos mostraram um novo papel para as NETs na inflamação aguda gotosa, onde as NETs induzidas por MSU formariam agregados densos que degradam citocinas e quimiocinas inflamatórias reduzindo o recrutamento de neutrófilos e a inflamação (Schauer *et al.*, 2014). Portanto, os neutrófilos parecem exercer função dual na inflamação gotosa, atuando na fase inicial como aplicador da inflamação, mas reduzindo essa inflamação em tempos tardios, contribuindo para a resolução da inflamação (Schett *et al.*, 2015).

### 1.3 – Controle da Resposta Inflamatória

Embora intensas, as crises agudas de gota são autolimitadas. Diversos mecanismos têm sido propostos para explicar a resolução espontânea da gota aguda, como a alteração do revestimento proteico dos cristais por lipoproteínas que contêm apoproteína E, tornando os cristais incapazes de desencadear uma resposta inflamatória em neutrófilos, e até mesmo a degradação de moléculas pró-inflamatórias por ação das NETs, como citado acima (Terkeltaub *et al.*, 1991)(Schauer *et al.*, 2014).

Além disso, apoptose de neutrófilos e a fagocitose destes por macrófagos, fenômeno conhecido como eferocitose, é importante na fase de resolução espontânea da inflamação gotosa. Nesse processo, ocorre uma alteração no perfil de atividade dos macrófagos, os quais passam a apresentar propriedades anti-inflamatórias e pró-resolutivas, como a secreção de TFG- $\beta$ , uma potente citocina com função anti-inflamatória na gota, reduzindo a ativação endotelial com consequente limitação do recrutamento celular, mas também reduzindo a expressão de citocinas pró-inflamatórias (Fadok *et al.*, 1998a) (Yagnik *et al.*, 2004). Após a completa diferenciação, os macrófagos também atingem a capacidade de fagocitar cristais de MSU sem estimular eventos inflamatórios (Yagnik *et al.*, 2004). Assim, as diferentes respostas celulares e moleculares interagem na resolução da inflamação aguda da gota.

#### **1.3.1 – Mecanismos anti-inflamatórios e pró-resolutivos**

Diferentes perturbações podem estimular uma resposta inflamatória aguda do organismo caracterizada pela produção de mediadores inflamatórios e acúmulo de leucócitos, principalmente neutrófilos, no tecido afetado (Medzhitov, 2008). A eliminação do agente nocivo pelos leucócitos leva a um estado de estabelecimento da homeostase tecidual, a resolução da inflamação (Medzhitov, 2010).

Desde o início até o estabelecimento da homeostase tecidual, a resposta inflamatória é controlada por diferentes mediadores, sejam eles inflamatórios, anti-inflamatórios ou pró-resolutivos. Os mediadores inflamatórios compreendem as moléculas que estimulam a reação inflamatória, levando aos principais sinais da inflamação tecidual – calor (febre), rubor (vermelhidão), tumor (inchaço e edema), dor

e perda de função - visando a eliminação do agente perturbador (Fullerton and Gilroy, 2016)(Basil and Levy, 2016).

No controle da ação exacerbada dos mediadores inflamatórios estão os mediadores anti-inflamatórios, que atuam principalmente inibindo a produção de citocinas e quimiocinas inflamatórias visando controlar o influxo neutrofílico e diminuir os sinais inflamatórios (Soehnlein and Lindbom, 2010). Após a eliminação do agente nocivo é estabelecida uma nova homeostase tecidual, nesse processo, moléculas pró-resolutivas ativam estímulos responsáveis pelo bloqueio na produção de citocinas e quimiocinas inflamatórias, impedindo o influxo neutrofílico (Sugimoto *et al.*, 2016). Além disso, os mediadores pró-resolutivos promovem a apoptose dos neutrófilos presentes no tecido inflamado e a eferocitose desses por macrófagos, processo capaz de alterar o fenótipo inflamatório das células mononucleares para um perfil pro-resolutivo (Ortega-Gómez, Perretti and Soehnlein, 2013). Assim, os mediadores pro-resolutivos são moléculas que atuam promovendo os “pilares da resolução” - remoção de microrganismos, células mortas e detritos, restauração da integridade e perfusão vascular, regeneração tecidual, remissão da febre e alívio da dor inflamatória (Basil and Levy, 2016).

### **1.3.2 – Controle da inflamação na gota**

Reduzir os níveis de ácido úrico sérico para abaixo dos índices de saturação é o objetivo principal para o controle da gota, evitando novos ataques (Ragab, Elshahaly, and Bardin 2017). Os dois grupos de medicamentos usados atualmente para reduzir o urato sérico são os inibidores da xantina oxidase (alopurinol e febuxostate) e os medicamentos uricosúricos (sulfipirazona, probenecida e benzbromarona), que aumentam a excreção do ácido úrico (Punzi *et al.*, 2012). Porém, as flutuações nos níveis séricos de ácido úrico podem desencadear novos ataques, exacerbando o processo inflamatório, de forma que o tratamento deve ser iniciado após o fim da crise aguda da doença, simultâneo algum medicamento com atividade anti-inflamatória para evitar novos ataques (Eggebeen, 2007).

O tratamento de primeira linha para os ataques agudos de gota, os quais causam uma rápida e intensa inflamação articular, é feito por anti-inflamatórios, como a colchicina e os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) (Richette and Bardin, 2010). A colchicina atua reduzindo a atividade e migração dos neutrófilos por meio do bloqueio na montagem dos microtúbulos, a liberação de quimioatraentes após a

fagocitose de cristais MSU, redução de moléculas de adesão em células endoteliais em resposta a IL-1 $\beta$  ou TNF- $\alpha$  e redução da ativação de inflamassoma (Ravelli *et al.*, 2004)(Phelps, 2008)(Asako *et al.*, 1992)(Cronstein *et al.*, 1995)(Martinon *et al.*, 2006b). Além disso, o bloqueio dos microtúbulos leva a inibição da ativação da caspase-1, por impedir a movimentação dos fagossomos contendo cristais de MSU no interior das células (Punzi *et al.*, 2012). O uso de esteroides é uma alternativa a pacientes que apresentam resistência ou intolerância à colchicina e aos AINES (Ragab, Elshahaly and Bardin, 2017)(Wilson and Saseen, 2016). Ainda, pacientes que não respondem aos tratamentos tradicionais podem ser tratados com agentes biológicos anti-citocina, principalmente aqueles que reduzem a atividade da IL-1b (Punzi *et al.*, 2012)(Carvalho *et al.*, 2019).

Por seu papel central no inflamassoma NLRP3, a IL-1 $\beta$  é considerada um importante alvo terapêutico para tratamento das crises agudas gotosas. Dentre os inibidores da IL-1 $\beta$  disponíveis atualmente destacam-se o Anakinra, um antagonista do receptor da IL-1 recombinante; o anticorpo Canakinumab, neutralizante da IL-1 $\beta$ ; e o receptor IL-1 solúvel Riloncept (Dinarello, Simon and Van Der Meer, 2012). Além desses, outros tratamentos inibem de forma indireta a IL-1 $\beta$ , como o MCC950, que inibe a oligomerização de NLRP3, bloqueando assim a montagem do inflamassoma (Coll *et al.*, 2015).

Ainda, moléculas pró-resolutivas também apresentam características potenciais para o tratamento da crise aguda gotosa. Em um modelo murinho de gota aguda a Anexina A1 reduziu o recrutamento e acúmulo de neutrófilos, além de induzir a resolução da inflamação estimulando a apoptose de neutrófilos e reduzindo os níveis de IL-1 $\beta$  (Galvão *et al.*, 2017). Algumas moléculas envolvidas no controle da resposta inflamatória da gota estão resumidas na tabela 1.



**Tabela 1: Moléculas que atuam no controle da inflamação aguda gotosa**

<b>Molécula</b>	<b>Principal função no controle da inflamação gotosa</b>	<b>Referência</b>
Agonistas dos receptores de melanocortina	Inibem o infiltrado neutrofílico e a liberação de IL-1 $\beta$	(Getting <i>et al.</i> , 2002) – murino.
Anakinra	Antagonista do receptor de IL-1 $\beta$	(So <i>et al.</i> , 2007) – murino e humano, (Ottaviani <i>et al.</i> , 2013) – humano.
Anexina A1	Estimula a resolução da inflamação gotosa experimental aguda	(Galvão <i>et al.</i> , 2017) – murino.
Canakinumab	Bloqueia a IL-1 $\beta$	(So <i>et al.</i> , 2010) - humano
IL-37	Inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias	(Zeng <i>et al.</i> , 2016) – humano.
Rilonacepte	Bloqueia a IL-1 $\beta$	(Torres <i>et al.</i> , 2009) – murino.
TGF- $\beta$	Inibe a expressão de moléculas de adesão e citocinas	(Yagnik <i>et al.</i> , 2004) – humano, (Lioté <i>et al.</i> , 1996) – murino, (Scanu <i>et al.</i> , 2012) – humano.

#### 1.4 – Sistema Renina-Angiotensina

O Sistema Renina-Angiotensina é um sistema endócrino que atua no controle da função cardiovascular e renal (Dzau, 1988). Esse sistema é uma cascata enzimática que resulta na produção de peptídeos ativos (Nasjletti and Masson, 1971). Dentre eles a Angiotensina II (Ang II), principal efector desse sistema através da ligação ao receptor de angiotensina tipo I (AT1R) vasoconstrição, proliferação celular, fibrose, formação de radicais de superóxido, ativação do sistema nervoso simpático. Em contraste com o AT1R, a Ang II também pode se ligar ao receptor de angiotensina tipo 2 (AT2R), contrabalanceando algumas ações do AT1R inibindo o crescimento e a proliferação, reduzindo a remodelação do tecido e aumentando a vasodilatação e produção de radicais (Mckinney *et al.*, no date).

Recentemente, um novo peptídeo do Sistema Renina-Angiotensina foi descoberto e vem ganhando destaque por seu papel contraregulador aos efeitos da Ang II, principalmente por inibir o crescimento celular, a migração e a inflamação (Passos-Silva, Verano-Braga and Santos, 2013).

### 1.4.1 – Ang-(1-7)

A Ang-(1-7) é um heptapeptídeo bioativo pertencente ao sistema renina-angiotensina. A Ang-(1-7) foi primeiramente caracterizada pela síntese através de outra molécula da via de degradação do Angiotensinogênio, a Angiotensina I (Santos *et al.*, 1988).

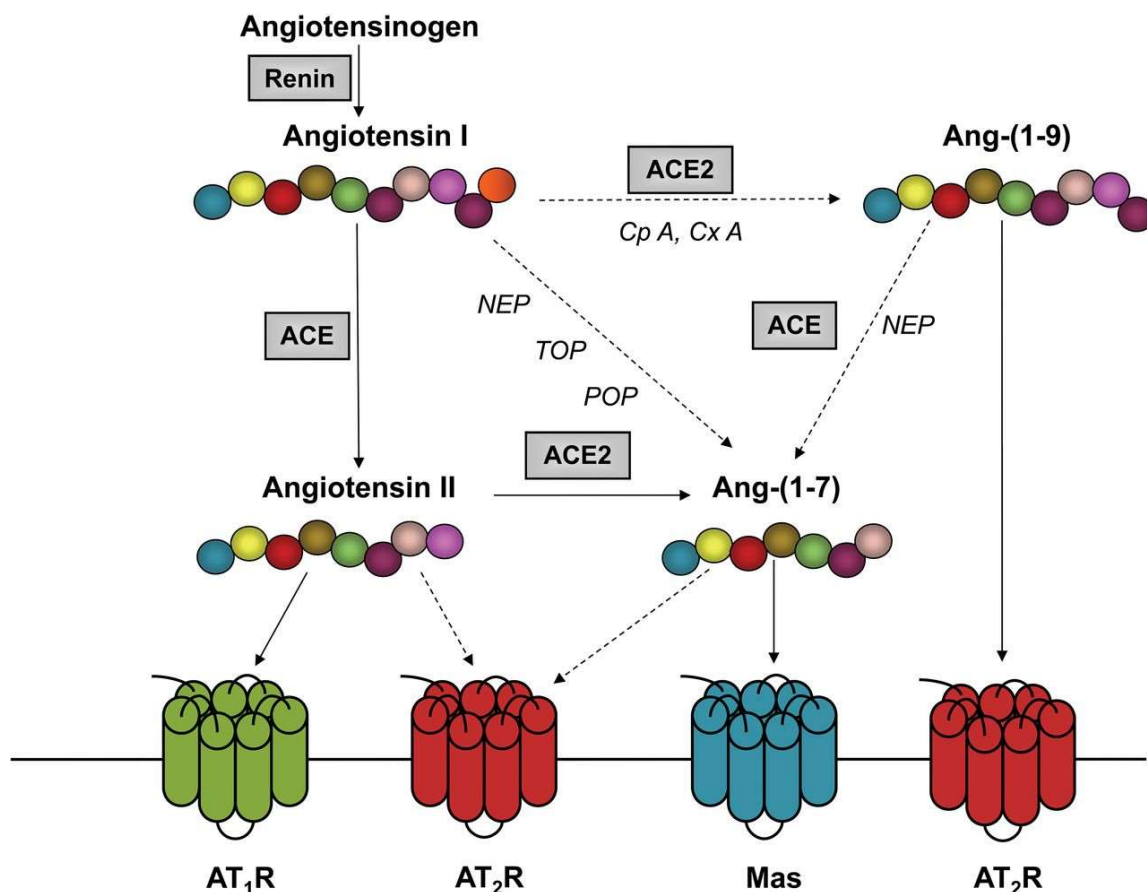
Atualmente são conhecidas diferentes vias e enzimas envolvidas na produção da Ang-(1-7). A síntese da Ang-(1-7) começa com o Angiotensinogênio, uma glicoproteína sintetizada principalmente pelo fígado e secretada na circulação (Nasjletti and Masson, 1971). No plasma, o Angiotensinogênio passa pela ação enzimática da renina, produzida pelas células justaglomerulares renais, gerando a Angiotensina I (1-10). Em seguida, a Angiotensina I é convertida pela enzima conversora de angiotensina (ACE), uma exopeptidase ligada à membrana, liberando o octapeptídeo vasoativo ang II (1-8) (SKEGGS, KAHN And SHUMWAY, 1956). Dentre as enzimas envolvidas na síntese da Ang-(1-7), a enzima conversora de Ang II (ACE2) é a mais bem caracterizada e potente. Descrita simultaneamente em 2000 por Donoghue *et al* e Tipnis *et al*, a enzima homóloga a ACE apresenta grande afinidade com seu substrato 2004-2007 (Donoghue *et al.*, 2000) (Tipnis *et al.*, 2000). A Ang II é clivada pela ACE2 diretamente em Ang-(1-7). Embora essa seja a via mais eficiente, outras enzimas também geram Ang-(1-7) através de diferentes precursores. A geração de Ang-(1-7) a partir de Angiotensina I pode acontecer por ação de muitas outras peptidases, especialmente prolil-endopeptidase (PEP) e endopeptidase neutra (NEP) (Welches *et al.*, 1991)(Gafford *et al.*, 1983) A própria ACE2 ou a NEP podem hidrolisar a Angiotensina I em Angiotensina 1-9 e esta ser clivada pela ACE ou pela (NEP) em Ang-(1-7) (Rice *et al.*, 2004). Embora os níveis de ACE2 e a razão ACE/ACE2 sejam geralmente considerados uma referência para a produção de Angiotensina (1–7), a participação de enzimas alternativas deve ser considerada (Nehme *et al.*, 2019).

A descrição em 1994 de uma molécula que reduzia seletivamente a atividade da Ang-(1-7) , o A-779, abriu espaço para uma questão: a existência de um receptor específico que mediaría a ações da Ang-(1-7) (Santos *et al.*, 1994). A identificação do receptor MAS, um receptor acoplado a proteína G e antagonizado pelo A-779, confirmou a relevância da Ang-(1-7) como peptídeo ativo do sistema renina-angiotensina. Foi demonstrado que a exclusão desse receptor inibia a ligação da Ang-

(1-7), abolindo suas ações em rins de camundongos (Santos *et al.*, 2003). Portanto, as funções biológicas da Ang-(1-7) são principalmente exercidas através da ligação ao receptor MAS.

A ativação dos receptores acoplados a proteína G é finamente regulada. A partir da exposição por tempo prolongado ou a grandes concentrações de Ang-(1-7), o receptor MAS pode ser dessensibilizado pelo desacoplamento da proteína G seguido pela internalização por endocitose. Após a internalização, o receptor pode ser ressensibilizado e reciclado ou degradado (Cerniello *et al.*, 2017) (Gironacci *et al.*, 2011). Foi demonstrado também que esse receptor pode antagonizar o AT1R, um dos receptores da Ang II, através da formação de heterodímeros, inibindo as ações da Ang II (Kostenis *et al.*, 2005). Em relação ao receptor AT2R, receptor com funções protetoras da Ang II, o receptor MAS apresenta efeitos semelhantes, evidenciando uma interação funcional entre esses receptores (Villela *et al.*, 2015). Além disso, a descrição de uma nova família de receptores acoplados a proteína G relacionados ao MAS (MRGPR) levantou questões sobre possíveis ligantes, dentre eles, a Ang-(1-7) (Figura 5) (Solinski, Gudermann and Breit, 2014). Essas descobertas abriram os recentes questionamentos sobre a especificidade da Ang-(1-7) ao receptor MAS.

Dentre as funções exercidas através da ligação da Ang-(1-7) ao receptor MAS, destacam-se o controle das funções cardiovasculares, renais e vasculares. Além disso, as ações mais bem descritas da Ang-(1-7) apontam esse peptídeo como um contrarregulador das funções da Ang II, exercendo proteção contra doenças cardiovasculares através da melhora da função endotelial, inibição da proliferação e migração de células musculares lisas vasculares, vasodilatação e modulação da remodelação ventricular (Ferreira and Santos, 2005) (Santos *et al.*, 2013).



**Figura 5: O sistema renina-angiotensina**

O sistema renina-angiotensina é uma cascata de peptídeos interconvertidos que são gerados principalmente pelas ações de ACE e ACE2. O eixo tradicional do RAS é através da geração de Ang II mediada pela ACE, que sinaliza principalmente via AT<sub>1</sub>R e também o AT<sub>2</sub>R. O eixo contra-regulatório do RAS está centrado nas ações de ACE2 e produção de Ang-(1-7) e Ang-(1-9) de Ang II e Ang I, respectivamente, e neutraliza os efeitos patológicos da Ang II no AT<sub>1</sub>R. Ang-(1-7) exerce efeitos protetores via Mas enquanto Ang-(1-9) foi relatado recentemente para atuar através do AT<sub>2</sub>R. ACE: Eziima de conversão da Angiotensina; Ang: angiotensina; AT<sub>1</sub>R: receptor da angiotensina tipo 1; AT<sub>2</sub>R: Angiotensina receptor tipo 2; Cp A: Catapsina A; Cx A: carboxypeptidase A; NEP: endopeptidase neutra; POP: Proil endopeptidase; TOP: Thimet oligopeptidase (Mckinney et al. 2014).

Entretanto, estudos recentes têm elucidado outras ações da Ang-(1-7) além das funções cardiovasculares. Evidências sinalizam um papel no controle de respostas inflamatórias, particularmente com funções anti-inflamatórias, anti-proliferativas, anti-fibróticas e pró-resolutivas, demonstrado em vários modelos animais de doenças inflamatórias agudas e crônicas, como diabetes (Bossi *et al.*, 2016), asma (Magalhaes *et al.*, 2018), lesão renal (Lu *et al.*, 2017), infarto do miocárdio (Zhao *et al.*, 2015) e artrite (da Silveira *et al.*, 2010).

Estudos anteriores avaliaram efeitos anti-inflamatórios da Ang-(1-7) e seu análogo, AVE 0991, agonistas do receptor MAS, na artrite induzida por antígeno, em camundongos, e na artrite induzida por adjuvante, em ratos. Os agonistas do receptor MAS reduziram a infiltração celular, sinais locais de inflamação (dor e edema), alterações histológicas e a liberação de citocinas pró-inflamatórias, além de diminuir diretamente o rolamento e a adesão dos leucócitos ao endotélio nas articulações inflamadas. Ainda, a deleção genética do receptor foi associada com leve agravamento de alguns aspectos da artrite em camundongos, observado pelo maior acúmulo de neutrófilos e liberação de citocinas. Desse modo, a ativação do receptor MAS causa melhora significativa da artrite em modelos experimentais de artrite em camundongos (da Silveira *et al.*, 2010). Além disso, um inibidor do receptor de angiotensina tipo 1 (AT1R), receptor da Ang II, reduziu o recrutamento de neutrófilos, a produção de citocinas e quimiocinas e inibiu diretamente o rolamento e a adesão de leucócitos (Silveira *et al.*, 2013).

Em outro estudo experimental de artrite induzida por antígeno, a Ang-(1-7) também foi eficaz na redução do acúmulo de neutrófilos em locais inflamatórios, na indução de apoptose de neutrófilos dependente de caspase com consequente aumento de eferocitose por macrófagos, demonstrando suas atividades pró-resolutivas de maneira dependente do receptor MAS. Seus efeitos anti-inflamatórios diminuíram as respostas inflamatórias através da inibição de NF- $\kappa$ B e da migração de leucócitos (Barroso *et al.* 2017). Em conjunto, esses estudos indicam que a Ang-(1-7) tem atividades anti-inflamatórias e pró-resolutivas.

## 2. Justificativa

A gota é a forma mais comum de artrite, tendo uma prevalência geral de 1 a 4% na população mundial, sendo os países desenvolvidos os mais afetados. O aumento gradual na incidência mundial de gota está relacionado a alterações no estilo que incluem os maus hábitos alimentares e a falta de exercícios físicos. Além disso, pacientes com gota frequentemente possuem outras comorbidades incluindo doença renal, síndrome metabólica, diabetes mellitus e hipertensão (Ragab, Elshahaly, and Bardin 2017). As crises de dor intensa afetando uma ou mais articulações são as manifestações mais comuns da inflamação gotosa aguda. A ausência de controle da hiperurcemia pode levar a evolução da doença resultando na formação de tofos, comprometendo a mobilidade da articular podendo ainda causar ulcerações. O tratamento dos ataques agudos da gota por anti-inflamatórios empregados atualmente pode causar reações adversas e, muitas vezes são contraindicados. (Dalbeth, Merriman and Stamp, 2016). Dessa forma, é importante investigar possíveis novos tratamentos.

Evidências apontam que a Ang-(1-7) participa no controle de respostas inflamatórias, particularmente com funções anti-inflamatórias e pró-resolutivas. Como mecanismo de ação, a Ang-(1-7) participa na redução do nível de várias citocinas e quimiocinas bem como da atividade de moléculas de sinalização (Ruiz et al., 2017). De maneira interessante, animais tratados com Ang-(1-7) tiveram uma redução da inflamação das articulações em diferentes modelos de artrite, principalmente controlando o acúmulo de células e produção de citocinas nas articulações, mas também estimulando a apoptose de neutrófilos de maneira dependente do receptor Mas (da Silveira *et al.*, 2010) (Barroso et al. 2017).

Dessa forma, a identificação de moléculas com possíveis atividades anti-inflamatórias abriria novas perspectivas terapêuticas na gota, uma vez que as estratégias terapêuticas imunológicas atualmente são baseadas apenas na inibição de IL-1 $\beta$ . Nesse contexto, a Ang-(1-7) é um potencial candidato para o controle da inflamação da gota. Além disso, entender melhor o papel da Ang-(1-7) na inflamação gotosa poderia contribuir para uma compreender melhor os mecanismos de ação dessa molécula em respostas inflamatórias.

### **3. Objetivos gerais**

Investigar o papel anti-inflamatório da Ang-(1-7) na resposta inflamatória induzida por cristais de MSU.

#### **3.1. Objetivos específicos**

**3.1.1.** Avaliar a cinética da resposta inflamatória articular após a injeção de cristais de MSU em camundongos.

**3.1.2.** Avaliar as propriedades anti-inflamatórias da Ang-(1-7) após estímulo com cristais de MSU.

**3.1.3.** Avaliar a propriedade pró-resolutiva da Ang-(1-7) induzida por cristais de MSU.

**3.1.4.** Avaliar o papel da Ang-(1-7) na ativação de macrófagos.

**3.1.5.** Avaliar o papel da Ang-(1-7) na ativação e migração de neutrófilos.

## **4. Métodos**

### **4.1. Animais**

Foram utilizados camundongos C57Bl/6, tipo selvagem, fêmeas, com peso aproximado de 22 gramas, entre 8-10 semanas, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais. Foram utilizados ainda camundongos LysM-eGFP C57Bl/6 (portadores de uma mutação no locus da lisozima M que permite a emissão de fluorescência verde) machos ou fêmeas, obtidos no biotério de criação, Biotério do laboratório Imunofarmacologia (ICB-UFMG).

Todos os animais foram mantidos no ciclo claro-escuro de 12 horas, com livre acesso a água e ração no biotério do Laboratório de Imunofarmacologia - UFMG. O presente estudo foi aprovado pelo Comissão de ética no uso de animais (CEUA) sob o protocolo de pesquisa número 295/2018 (Anexos 1).

### **4.2. Modelo de Gota**

#### **4.2.1. Preparo dos cristais de ácido úrico (cristais de MSU)**

Para preparação dos cristais, 1,68 g de ácido úrico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) foram adicionados em 500 mL de uma solução de hidróxido de sódio (NaOH 0,01 M). A solução foi colocada 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 0,22 µm em capela de fluxo laminar, para manter a solução estéril. A solução foi deixada em temperatura ambiente para a precipitação dos cristais de ácido úrico. Após 7 dias a solução com os cristais foi coletada e centrifugada (7.000 RPM, 10 minutos) e o sobrenadante descartado. Posteriormente, duas lavagens do precipitado com álcool absoluto foram realizadas. Além disso, a solução foi submetida ao processo de sonicação para diminuir o tamanho dos cristais e posteriormente foi deixada secando em temperatura ambiente em condições estéreis. Após secar, os cristais foram autoclavados e, então, ressuspensos em solução salina na concentração desejada e mantidos a - 20°C até posterior utilização.



#### **4.2.2. Indução da gota por injeção intra-articular de cristais de MSU**

Inicialmente os camundongos foram anestesiados via intraperitoneal com uma mistura de cetamina 80 mg/kg e xilazina 15 mg/kg diluídos em tampão salina fosfato (PBS), via intraperitoneal. Em seguida, a região tíbio-femural desejada foi depilada e os cristais de MSU obtidos foram diluídos em solução salina para a injeção intra-articular tíbio-femural de 10 µL de solução contendo 100 µg do cristal. A articulação contralateral foi utilizada como controle (injeção de veículo – solução salina). Os animais foram eutanasiados por sobredose de anestésico (240 mg/kg de Cetamina e 45 mg/kg de xilazina) após 3, 6, 12, 15 e 18 horas a depender dos experimentos. O mesmo protocolo foi utilizado para o desafio por injeção intra-articular tíbio-femural de 10 µL de CXCL1 (100 ng/cavidade), os animais foram eutanasiados 3 horas após o desafio.

#### **4.2.3. Tratamento com Ang-(1-7)**

Após o desafio intra-articular com 10 µL de cristais de MSU (100 µg/cavidade) ou CXCL1 (100 ng/cavidade), os animais foram anestesiados e submetidos à injeção intra-articular tíbio-femural de 10 µL de Ang-(1-7) (100 ng/cavidade) 3, 10 e 12 horas e logo após o desafio respectivamente. Os camundongos do grupo controle receberam apenas veículo (solução salina) (Barroso et al. 2017), nos tempos descritos nos resultados.

#### **4.2.4. Tratamento com A-779**

O tratamento com A-779 foi realizado por injeção intra-articular tíbio-femural de 10 µL (200 ng/cavidade) nos animais anestesiados, após 12 horas do desafio intra-articular com 10 µL de cristais de MSU (100 µg/cavidade). Os camundongos controle receberam apenas veículo (solução salina) (Barroso et al. 2017).

### **4.3. Avaliação da migração de neutrófilos para a cavidade articular**

Após o desafio com cristais de MSU, os animais foram eutanasiados por sobredose de anestésico (240 mg/kg de Cetamina e 45 mg/kg de xilazina) nos tempos descritos nos resultados. Para avaliar a migração de leucócitos (neutrófilos) para a cavidade articular, foi realizado um lavado intra-articular. Este procedimento consistiu em lavar por três vezes com 3,3 µL a cavidade articular utilizando uma solução de

albumina bovina (BSA) 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  $\mu$ L de albumina bovina 3 % para a posterior contagem total e diferencial dos leucócitos.

#### **4.3.1. Contagem total dos leucócitos**

Alíquotas de 10  $\mu$ L do lavado articular foram diluídas em 10  $\mu$ L de solução Turk (Renylab), 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.

#### **4.3.2. Contagem diferencial dos leucócitos**

As lâminas para contagem diferencial foram preparadas por citocentrifugação de uma alíquota de 90  $\mu$ L do lavado articular (citospin; Shandon Lipshaw Inc., Pittsburgh, Pennsylvania, USA). As lâminas foram coradas utilizando o Kit panótico rápido (Laborclin, Paraná) 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 células polimorfonucleares e mononucleares de cada amostra e os resultados foram expressos como número de leucócitos  $\times 10^4$ /cavidade articular, baseando-se na contagem total de leucócitos.

#### **4.3.3. Análise da apoptose e eferocitose de leucócitos**

As lâminas contendo os leucócitos recuperados no lavado articular foram preparadas como descrito no item anterior. A apoptose e eferocitose dos leucócitos presentes no lavado articular dos animais desafiados com MSU, com ou sem os tratamentos, foi avaliada morfológicamente (Pinho *et al.*, 2007, Vago *et al.*, 2012). As células foram contadas (300 células por lâmina) utilizando microscópio óptico para determinar a porcentagem de células com morfologia apoptótica ou de eferocitose.

As células apoptóticas foram identificadas por alterações morfológicas características como, condensação da cromatina, fragmentação nuclear e formação de corpos apoptóticos. A eferocitose foi identificada pela presença de corpos apoptóticos envoltos por membrana no citoplasma de células mononucleares.

#### **4.4. Processamento do tecido periarticular para dosagem de citocinas**

O tecido periarticular removido foi pesado e processado com o homogeneizador de tecidos (Power Gen 125 - Fisher Scientific Pennsylvania, EUA) com solução de extração de citocinas (NaCl 0,4M, NaPO<sub>4</sub> 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 15 minutos a 4 °C), o sobrenadante foi coletado e estocado a -20°C para quantificação de citocinas.

##### **4.4.1. Dosagem de Citocinas e Quimiocinas: Ensaio Imunoenzimático (ELISA)**

A dosagem de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e CXCL1 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  $\mu$ L/mL) com o tampão de lavagem (PBS/Tween 0,5 %) utilizando um lavador de placas (Bio-Tek Instruments, INC). Foi adicionado 100  $\mu$ L/poço de tampão de bloqueio (PBS/BSA 1 %) e a placa foi incubada por 2 horas à temperatura ambiente. O conteúdo foi retirado e os poços lavados 4 vezes (300  $\mu$ L/mL) com o tampão de lavagem (PBS/Tween 0,5 %) utilizando um lavador de placas. Foi adicionado 50  $\mu$ 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  $\mu$ L/mL) com o tampão de lavagem (PBS/Tween 0,5 %) utilizando um lavador de placas. Foram adicionados 50  $\mu$ 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  $\mu$ L/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 (ophenylenediamine dihidrochloride - 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<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M. A leitura foi realizada em leitor de ELISA em densidade ótica de 490 nm com o espectrofotômetro SpectraMax Plus Microplate Reader (Molecular Devices), e os resultados expressos com base na concentração da curva padrão.

#### **4.5. Isolamento de neutrófilos de medula óssea**

O lavado do canal medular (tíbia e fêmur) foi feito com 5 mL de PBS. A solução de PBS contendo células da medula foi centrifugada a 1200 RPM, 7 minutos a 4°C e resuspendidas em 1 mL de PBS. As células foram cuidadosamente adicionadas em tubos de 15 mL contendo gradiente duplo de separação formado pela adição sequencial de 3 mL de Histopaque 1119 e 3 mL de Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Os tubos foram centrifugados à 1800 RPM com aceleração e desaceleração mínima por 30 minutos e em temperatura ambiente. A camada inferior de células polimorfonucleares foi coletada com o auxílio de pipeta Pasteur e as células foram lavadas e resuspendidas em PBS. As células após isolamento foram diluídas em Turk para contagem total dos leucócitos realizada em câmara de Neubauer, com o auxílio de microscópio óptico. A pureza foi determinada através de visualização de lâminas preparadas por citocentrifugação (Citospin, Shandon Lipshaw Inc, Pittsburg, Pennsylvania, USA) sob microscópio óptico e posteriormente coradas de acordo com o kit panótico rápido (Laborclin, Paraná) e examinadas sob microscópio óptico (objetiva de 100X em óleo de imersão) usando os critérios morfológicos padrões para diferenciar os tipos celulares. Apenas amostras com pureza e viabilidade acima de 90 % foram consideradas nos ensaios. As células foram estimuladas de acordo com o experimento.

#### **4.6. Obtenção e cultura de macrófagos peritoneais**

Tioglicolato a 3 % foi injetado via intraperitoneal nos camundongos e após 4 dias esses foram sacrificados. Foi feita a coleta das células através da lavagem peritoneal utilizando 5 mL de PBS gelado. Logo após as células foram contadas e  $1 \times 10^6$  células por poço foram plaqueadas em placa de 24 poços. Essas células foram colocadas em

meio DMEM (Meio de Earle modificado por Dulbecco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) a 37 °C em atmosfera contendo 5 % CO<sub>2</sub> e deixadas *overnight*. Após este período foi feita a lavagem das placas com solução salina para remoção das células não aderidas e foram utilizados dois estímulos diferentes:

1. LPS: Foram acrescentados 300 µl de meio DMEM 0%, acrescidos 300 nM de Ang-(1-7) ou salina. Após 1 hora de incubação foram adicionados 1 µg/poço de LPS ou salina. Os macrófagos foram incubados por 3 horas a 37 °C em atmosfera contendo 5 % CO<sub>2</sub>. Após o tempo de incubação, o sobrenadante foi recolhido para ser utilizado no ensaio de ELISA.

2. Cristais de MSU: Foram acrescentados 300 µl de meio DMEM 0%, acrescidos de 1 µg/poço de LPS ou salina. Os macrófagos foram incubados por 1 hora, em seguida, as placas foram lavadas e foram acrescentados 300 µl de meio DMEM 0% acrescido de 30, 100 ou 300 nM de Ang-(1-7) ou salina. Após 1 hora de incubação foram adicionados 300 µg/ml de Cristais de MSU ou salina. Os macrófagos foram incubados por 6 horas a 37 °C em atmosfera contendo 5 % CO<sub>2</sub>. Após o tempo de incubação, o sobrenadante foi recolhido para ser utilizado no ensaio de ELISA.

#### **4.7. Microscopia intravital**

Camundongos C57Bl/6 após o desafio intra-articular com cristais de MSU e tratados com Ang-(1-7) foram anestesiados e colocados em uma placa térmica mantida a 37 °C, para manutenção da temperatura corpórea do animal. A pele do tornozelo dos animais foi removida até a base dos quadris, tornando possível a visualização do tendão patelar que foi então cortado, o que permitiu a visualização do “corpo adiposo de Hoffa”, um tecido adiposo intra-articular contendo células sinoviais na superfície interior da articulação.

Um microscópio intravital (Nikon C-SRS H550L; Japan) com uma lente objetiva de 20X foi utilizado para observar a microcirculação deste tecido sinovial intra-articular. Uma câmera digital (Nikon DSQIMC, Japan) acoplada ao microscópio foi usada para projetar imagens a um monitor de computador. Essas imagens foram gravadas para posterior análise usando o programa Imaging software (NIS ELEMENTS-NIKON) O número de leucócitos rolando e aderentes foi determinado após análise das imagens gravadas. O número de células rolando foi determinado pela contagem de células passando por um determinado ponto marcado no vaso por

minuto. Um leucócito foi considerado aderente quando permanecia parado por pelo menos 30 segundos, e o número de leucócitos aderentes foi quantificado contando o número de células aderentes dentro de um comprimento de 100  $\mu\text{m}$  de vaso.

#### **4.8. Ensaio de quimiotaxia (câmara de Boyden)**

O ensaio de quimiotaxia foi realizado na Câmara de Boyden de 48 poços (Neuro Probe, Cabin John, USA), utilizando uma membrana de policarbonato (Neuro Probe, Cabin John, USA) com poros de 5  $\mu\text{m}$  de diâmetro (Pinho *et al.*, 2007). Na parte inferior da câmara foram adicionados 28,5  $\mu\text{L}$  de meio de cultura DMEM 0% contendo os estímulos quimiotáticos CXCL1 (30 ng/mL) e LTB<sub>4</sub> ( $10^{-8}$  M). Como controle negativo, foi utilizado apenas o meio DMEM 0 %, em seguida, os poços foram cobertos com a membrana de policarbonato. Na parte superior da câmara foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  de DMEM, contendo  $5 \times 10^4$  neutrófilos, isolados como descrito anteriormente e pré-tratados por 1 hora com 300 nM de Ang-(1-7). A câmara foi incubada por 60 minutos a 37 °C e 5 % de CO<sub>2</sub>. Após incubação, a membrana de policarbonato foi removida cuidadosamente, lavada em PBS e fixada e corada em kit panótico rápido (Laborclin, Paraná).

O número de células migradas para a parte inferior da membrana foi contado em 5 campos aleatórios em microscópio óptico (objetiva de 100X em óleo de imersão). Os resultados foram expressos como a média do número de células por campo. As células que migraram em direção aos estímulos quimiotáticos foram consideradas como migração direcionada e as células que migraram em direção ao DMEM como migração randômica ou aleatória (controle).

#### **4.9. Análises estatísticas**

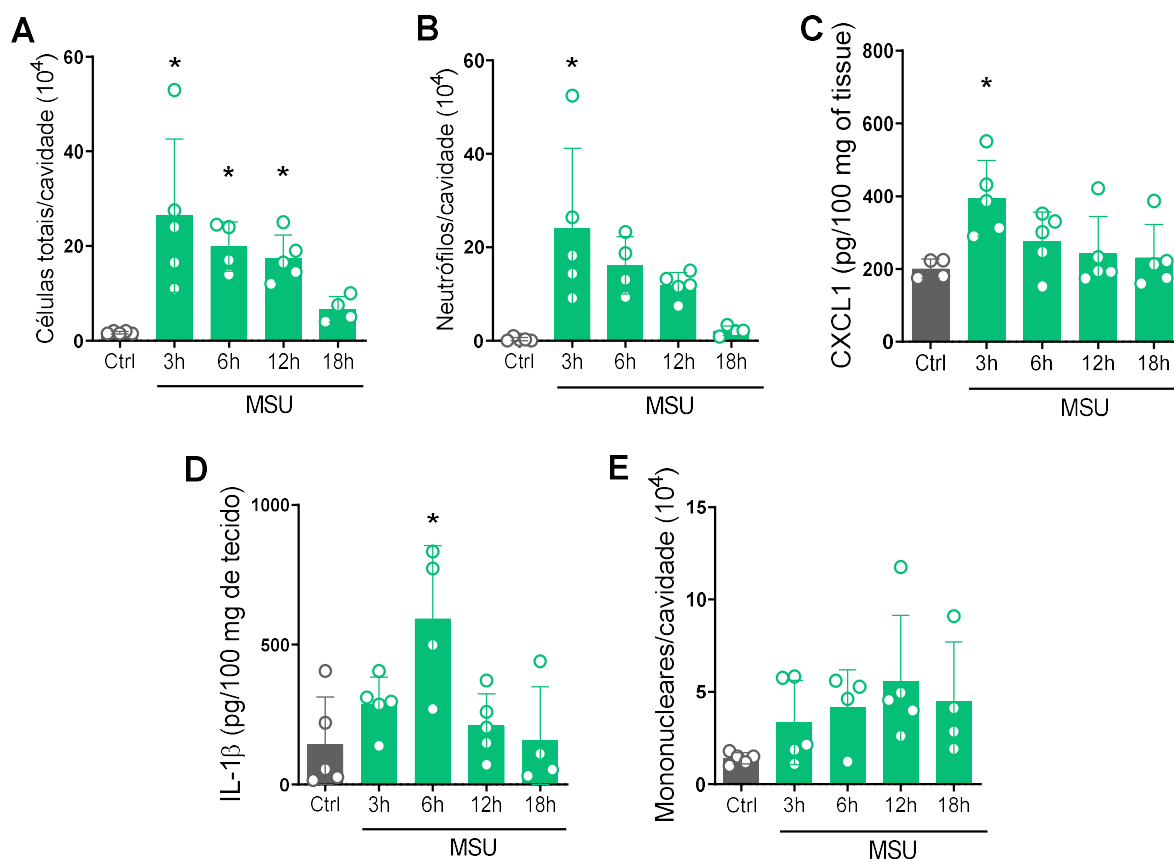
A análise estatística foi realizada com o software Prisma. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. A análise da diferença entre dois grupos foi realizada pelo teste t-student. A análise da diferença entre dois ou mais grupos quando as amostras obedeciam a distribuição normal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

## 5. Resultados

### 5.1. Perfil inflamatório da gota aguda em camundongos

Estudos anteriores mostraram que a injeção intra-articular de cristais de MSU em camundongos induz uma inflamação aguda local, com aumento do influxo de neutrófilos, produção da citocina IL-1 $\beta$  e das quimiocinas CXCL1 e CXCL2 de maneira dependente da dose e do tempo (Amaral *et al.*, 2012)(Galvão *et al.*, 2017). Entretanto, lotes diferentes de cristais de MSU podem induzir alterações na cinética da resposta inflamatória, uma vez que o preparo dos cristais é feito no nosso laboratório. Assim, o primeiro teste foi avaliar a cinética da resposta inflamatória articular após a injeção de cristais de MSU através da análise do acúmulo de leucócitos na cavidade articular e produção de moléculas pró-inflamatórias no tecido periarticular. Como pode ser visto na Figura 6, o acúmulo de células na cavidade articular ocorre nas primeiras horas após a injeção de MSU, chegando ao pico às 3 horas (Figura 6A). O pico leucocitário foi também o pico de neutrófilos (Figura 6B) e a quimiocina CXCL1 (Figura 6C). A citocina IL-1 $\beta$  teve a maior produção após 6 horas do desafio (Figura 6D). A partir desse ponto, houve uma diminuição tanto no número de neutrófilos, quanto na produção de CXCL1 e IL-1 $\beta$ , sendo que após 18 horas eles já tinham atingido níveis basais.

A quantidade de células mononucleares teve um aumento não significativo ao longo do tempo, atingindo o pico 12 horas após o desafio (Figura 6E). Essas diferenças entre os números de neutrófilos e células mononucleares e a redução de CXCL1 e IL-1 $\beta$  sugerem que a inflamação já possa apresentar características da resolução da inflamação, conforme demonstrado em outros contextos de inflamação aguda (Vago *et al.*, 2012b)(Boff *et al.*, 2018).



**Figura 6: Perfil inflamatório da gota aguda.**

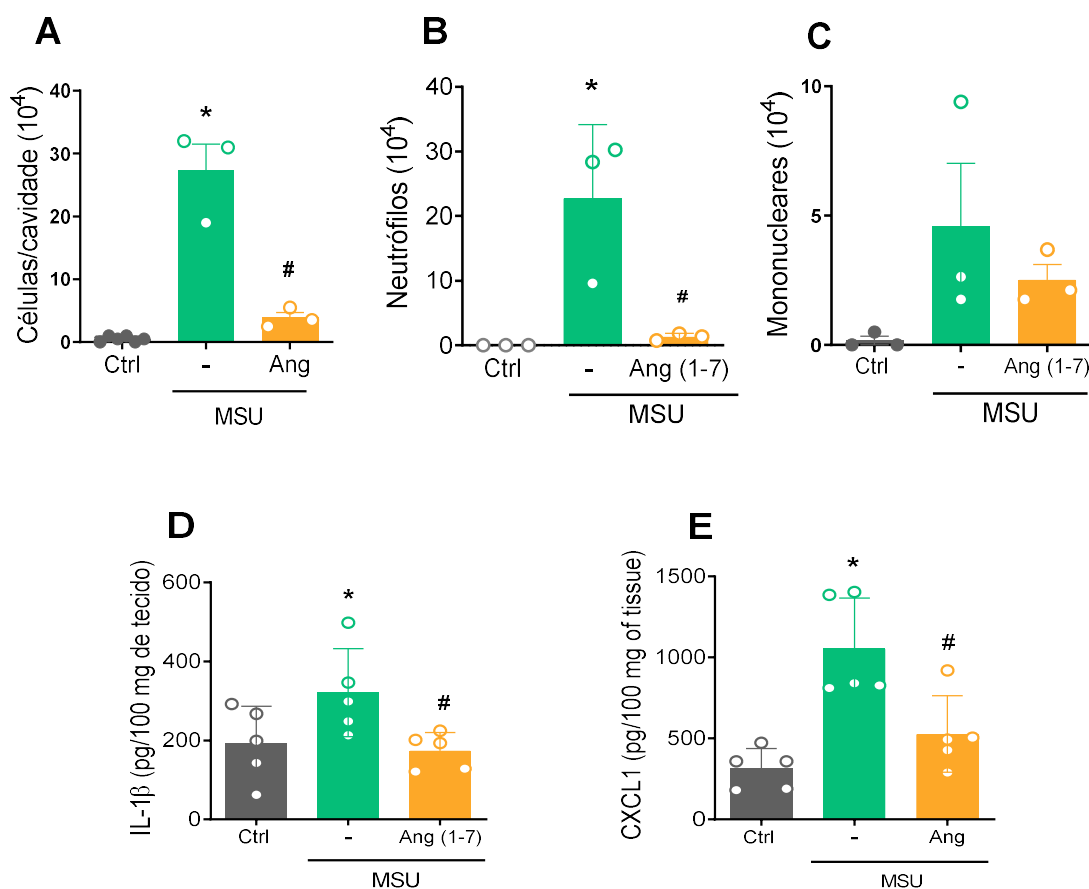
Os animais foram desafiados com injeção intra-articular de cristais de MSU (100  $\mu$ g) e as análises foram realizadas nos tempos de 3, 6, 12 e 18 horas após o desafio. Foi realizado o lavado articular para a recuperação e contagem de células totais, neutrófilos e células mononucleares (A, B e E respectivamente). Além disso, a quantificação de IL-1 $\beta$  (D) e CXCL1 (C) foi realizada no tecido periarticular por ELISA. As barras representam a média  $\pm$  desvio padrão de 5 camundongos por grupo. (\*) para  $p < 0,05$  quando comparado a média do grupo controle (Ctrl – injeção de salina) (ANOVA seguida pelo pós-teste Student-Newman-Keuls).

## 5.2. Ang-(1-7) diminui a secreção de IL-1 $\beta$ , CXCL1 e o infiltrado de neutrófilos *in vivo*

Em um estudo experimental de artrite induzida por antígeno, a Ang-(1-7) reduziu a resposta inflamatória através da inibição da migração de leucócitos, conferindo a esse peptídeo uma atividade anti-inflamatória (Barroso et al. 2017). Assim, as propriedades anti-inflamatórias da Ang-(1-7) na inflamação aguda da gota foram avaliadas através do tratamento por injeção intra-articular de 100 nM Ang-(1-7) 3 horas após a injeção intra-articular de 100  $\mu$ g/10  $\mu$ L de cristais de MSU. O grupo de animais não tratados recebeu uma injeção de solução salina. Três horas após o



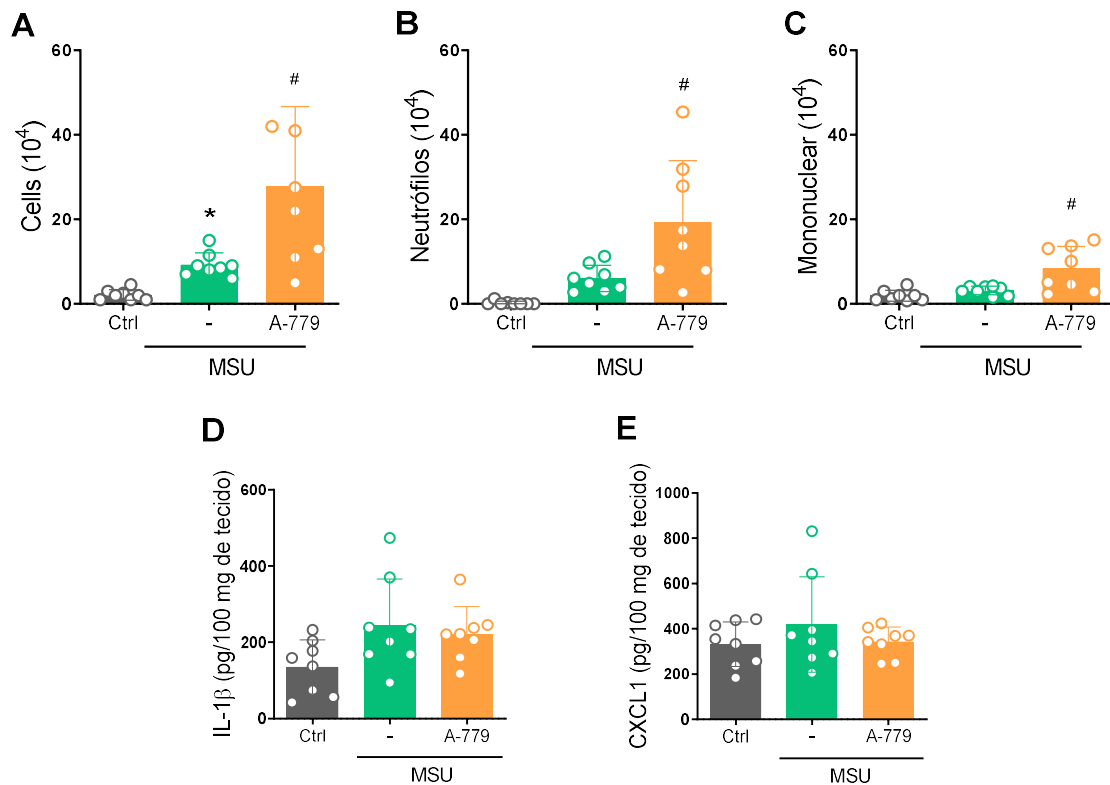
tratamento (6 horas após o desafio com cristais de MSU), foi verificada uma redução significativa do número de células totais e neutrófilos nos animais tratados com Ang-(1-7) quando comparados com os animais com gota, mas não tratados. Também foi observada uma diminuição significativa de IL-1 $\beta$  e CXCL1 no tecido periarticular dos animais tratados com Ang-(1-7) quando comparados com os animais que não receberam o tratamento. Assim, esses resultados indicam que a Ang-(1-7) exerce um papel anti-inflamatório no modelo de gota aguda em camundongos.



**Figura 7: Ang-(1-7) diminui a secreção de IL-1 $\beta$ , cxcl1 e o infiltrado de neutrófilos in vivo.** Os animais foram desafiados com injeção intra-articular de cristais de MSU (100  $\mu$ g/10  $\mu$ L) e 3 horas após o desafio eles foram tratados com injeção intra-articular de Ang-(1-7) (100 nM). Seis horas após injeção dos cristais, os animais foram eutanasiados para a realização do lavado articular e contagem do número de células totais (A), neutrófilos (B) e células mononucleares (C). O tecido periarticular foi utilizado para a quantificação de IL-1 $\beta$  (D) e CXCL1 (E) por ELISA. As barras representam a média  $\pm$  desvio padrão de 3 (A, B e C) ou 5 (D e E) camundongos por grupo (\*) para p < 0,05 quando comparado a média do grupo controle, (#) para p < 0,05 quando comparado com o grupo que não recebeu tratamento (ANOVA seguida pelo pós-teste Student-Newman-Keuls).

### **5.3. Ang-(1-7) diminui o infiltrado de neutrófilos de forma dependente do receptor MAS**

Visto que a Ang-(1-7) exógena reduziu os principais parâmetros inflamatórios da gota aguda, o próximo passo foi investigar o papel anti-inflamatório endógeno dessa molécula, através do tratamento com um antagonista seletivo para o receptor MAS, o A-779. A crise aguda gotosa foi induzida por injeção intra-articular de cristais de MSU (100 ug/10uL). Após 12 horas, os animais foram tratados com uma injeção intra-articular de 10 uL contendo 200 ng de A-779 (o grupo de animais não tratados recebeu uma injeção de solução salina). Passadas 6 horas do tratamento (18 horas após o desafio com os cristais de MSU) houve um aumento de células totais, neutrófilos e mononucleares nos animais tratados com A-779 quando comparados com os animais não tratados. Porém, não houve diferença na quantificação de IL-1 $\beta$  e CXCL1 no tecido periarticular dos animais que receberam o tratamento por A-779 quando comparados com os animais que não receberam o tratamento, conforme mostrado na Figura 8. Portanto, o bloqueio do receptor MAS levou a um retardo na resolução da inflamação, sugerindo uma produção endógena de Ang-(1-7) no controle da resposta inflamatória causada por cristais de MSU, pelo menos na redução do infiltrado celular.



**Figura 8: Ang-(1-7) diminui o infiltrado de neutrófilos de forma dependente do receptor MAS**

Os animais foram desafiados com injeção intra-articular de cristais de MSU (100  $\mu$ g/10  $\mu$ L) e 12 horas após o desafio eles foram tratados com injeção intra-articular de Ang-(1-7) (100 nM). Dezoito horas após injeção dos cristais, os animais foram eutanasiados para a realização do lavado articular e contagem do número de células totais (A), neutrófilos (B) e células mononucleares (C). O tecido periarticular foi utilizado para a quantificação de IL-1 $\beta$  (D) e CXCL1 (E) por ELISA. As barras representam a média  $\pm$  desvio padrão de 8 camundongos por grupo (\*) para  $p < 0,05$  quando comparado a média do grupo controle, (#) para  $p < 0,05$  quando comparado com o grupo que não recebeu tratamento (ANOVA seguida pelo pós-teste Student-Newman-Keuls). (Gráfico representativo do somatório dos dois experimentos).

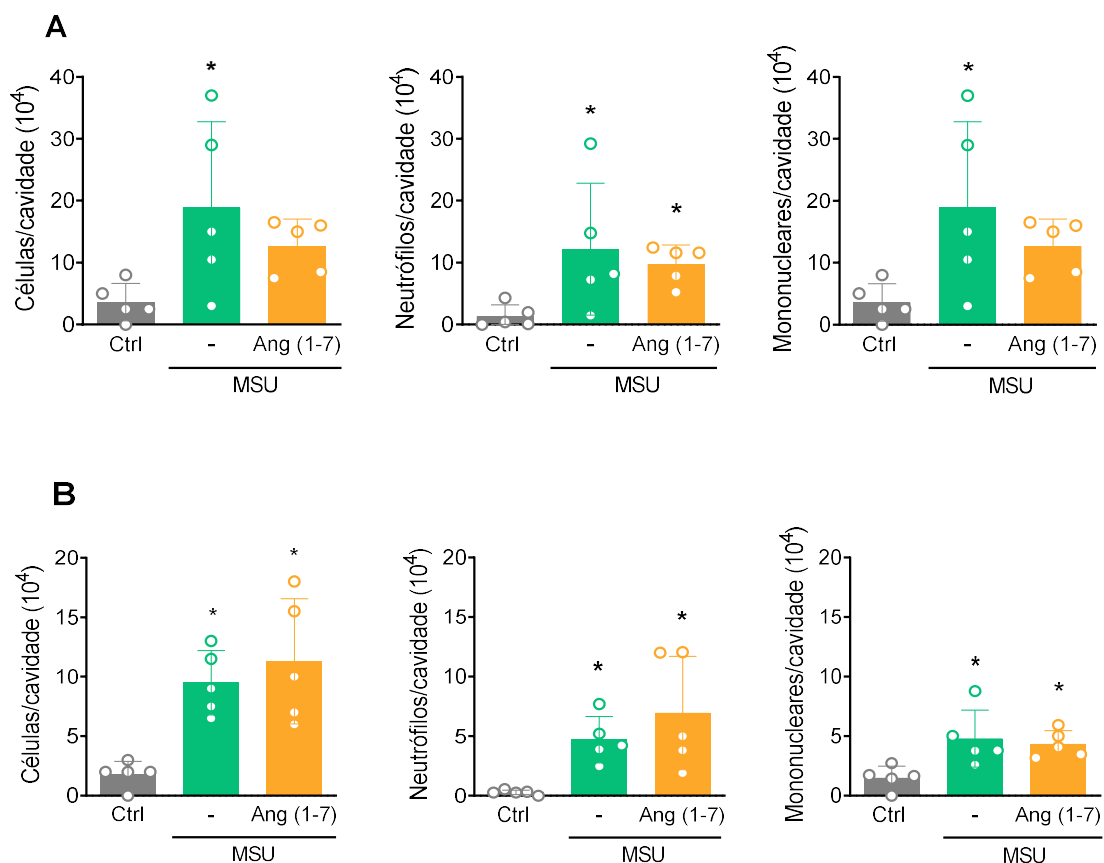
#### 5.4. Ang-(1-7) parece não participar da resolução da inflamação por cristais de MSU

Os resultados apresentados até agora demonstram um papel anti-inflamatório da Ang-(1-7) na inflamação aguda articular induzida por cristais de MSU. Entretanto, trabalhos anteriores também sugerem uma função pró-resolutiva dessa molécula. Assim, o próximo passo foi investigar se a Ang-(1-7) também mediará a resolução da inflamação aguda na gota. A inflamação gotosa aguda foi induzida nos animais, seguida do tratamento com 100 nM Ang-(1-7) em tempos tardios. As estratégias utilizadas foram as seguintes:

**Tabela 2: Estratégias experimentais**

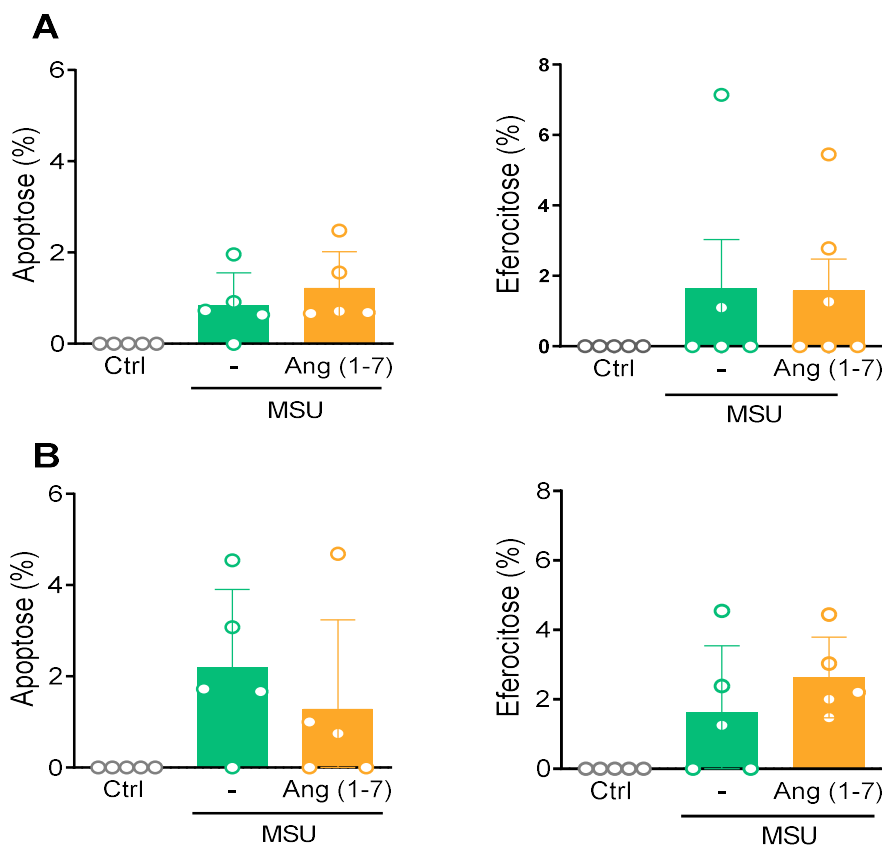
<b>Tempo após a injeção dos cristais de MSU</b>		Identificação
Tratamento com Ang (1-7)	Análise do infiltrado celular	
10 horas	15 horas	10/15
12 horas	18 horas	12/18

Nas estratégias 10/15 e 12/18, a Ang-(1-7) não reduziu o número de leucócitos totais e neutrófilos em comparação aos que não receberam o tratamento (Figura 9). Além disso, o tratamento com Ang-(1-7) não alterou os parâmetros relativos à resolução da inflamação aguda, como aumento de apoptose de neutrófilos ou da eferocitose por macrófagos nos tempos avaliados (Figura 10). Assim, esses dados sugerem que a Ang-(1-7) parece não ter um papel pró-resolutivo na inflamação aguda da gota quando administrada na mesma concentração em que apresenta características anti-inflamatórias. Sendo assim, os próximos experimentos foram conduzidos com o intuito de identificar os mecanismos anti-inflamatórios da Ang-(1-7) após estimulação com cristais de MSU.



**Figura 9: Ang-(1-7) parece não participar da resolução da inflamação aguda da gota**

Os animais foram desafiados com injeção intra-articular de cristais de MSU (100  $\mu\text{g}/10 \mu\text{L}$ ), horas após o desafio eles foram tratados com injeção intra-articular de Ang-(1-7) (100 nM). Horas após injeção dos cristais, 10/15 (A) e 12/18 (B), os animais foram eutanasiados para a realização do lavado articular e contagem do número de células totais, neutrófilos e células mononucleares. 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 com o grupo que não recebeu tratamento (ANOVA seguida pelo pós-teste Student-Newman-Keuls). Cada experimento foi repetido 2 vezes. (Gráfico representativo de um experimento).

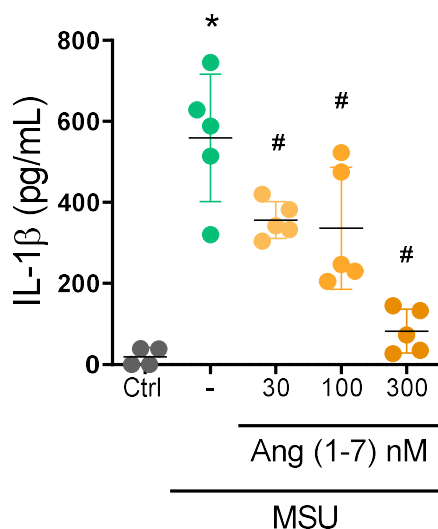


**Figura 10: Ang-(1-7) não induz parâmetros resolutivos na aguda da gota**

Os animais foram desafiados com injeção intra-articular de cristais de MSU (100  $\mu$ g/10  $\mu$ L), horas após o desafio eles foram tratados com injeção intra-articular de Ang-(1-7) (100 nM). Horas após injeção dos cristais, 10/15 (A) e 12/18 (B), os animais foram eutanasiados para a realização do lavado articular e contagem do número de neutrófilos apoptóticos e eferocitose por células mononucleares. 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 com o grupo que não recebeu tratamento (ANOVA seguida pelo pós-teste Student-Newman-Keuls). Cada experimento foi repetido 2 vezes. (Gráfico representativo de um experimento).

### 5.5. Ang-(1-7) reduz a ativação dos macrófagos

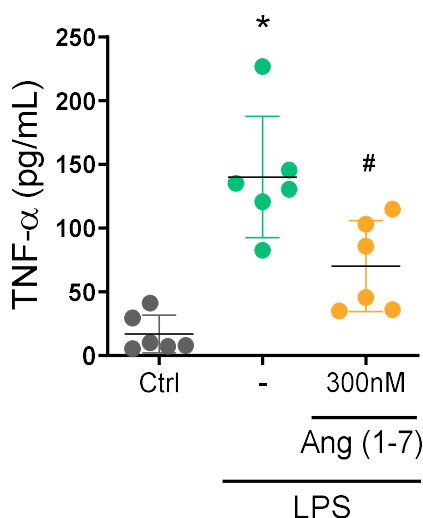
Os macrófagos residentes são responsáveis pela produção primária de citocinas pró-inflamatórias, especialmente IL-1 $\beta$ , em resposta a exposição a cristais da MSU (Martin, Walton and Harper, 2009). Assim, macrófagos peritoneais foram estimulados por 6 horas com 300  $\mu$ g/ml de cristais de MSU. O pré-tratamento com diferentes concentrações de Ang-(1-7) (30 - 300 nM) por 1 hora causou uma redução significativa da secreção de IL-1 $\beta$  no sobrenadante, sugerindo que a Ang-(1-7) pode controlar a secreção de IL-1 $\beta$  também no modelo *in vitro* (Figura 11).



**Figura 3: Ang-(1-7) reduz a secreção de IL-1 $\beta$  in vitro.** Macrófagos peritoneais foram primados por LPS (1 ug/poço) por 1 hora, seguido de tratamento ou não com Ang-(1-7) (30, 100 e 300 nM) por 1 hora. Em seguida, as células foram estimuladas por MSU (300 ug/ml) por 6 horas. As barras (T) representam a média  $\pm$  desvio padrão de 5 poços por grupo. (\*) para  $p < 0,05$  quando comparado a média do grupo controle, (#) para  $p < 0,05$  quando comparado com o grupo que não recebeu tratamento (ANOVA seguida pelo pós-teste Student-Newman-Keuls).

Em estudos *in vitro*, a primagem celular é fundamental para a investigação de da ativação de Inflamassoma, pois é necessária a estimulação para induzir a transcrição de componentes da via de sinalização, principalmente utilizando células murinas (Kahlenberg *et al.*, 2005). Um dos agentes capazes de estimular as células é a citocina TNF (Franchi, Eigenbrod and Núñez, 2009). Particularmente, foi demonstrado que o TNF tem um papel crucial na inflamação gotosa, estimulando a expressão do mRNA da pro-IL-1 $\beta$  na gota experimental humana e que sua forma transmembranar é suficiente para desencadear inflamação induzida por MSU em camundongos (Yokose *et al.*, 2018) (Amaral *et al.*, 2016). Nesse contexto, macrófagos estimulados com LPS, um dos principais agentes utilizados para esse tipo de primagem, liberam quantidades significativas de TNF (Riches, Chan and Winston, 1996). A partir disso, foi realizado um ensaio *in vitro*, apresentando na Figura 12, onde macrófagos peritoneais foram estimulados por 3 horas com 1 ug/poço de LPS na presença ou não de 300 nM de Ang-(1-7). A quantificação do TNF por ELISA mostrou que a Ang-(1-7) reduz significativamente a secreção dessa citocina. Esse

dado sugere que a Ang-(1-7) pode diminuir a transcrição de componentes da via de sinalização do inflamassoma NLRP3.



**Figura 4: Ang-(1-7) reduz a secreção de TNF-α in vitro**

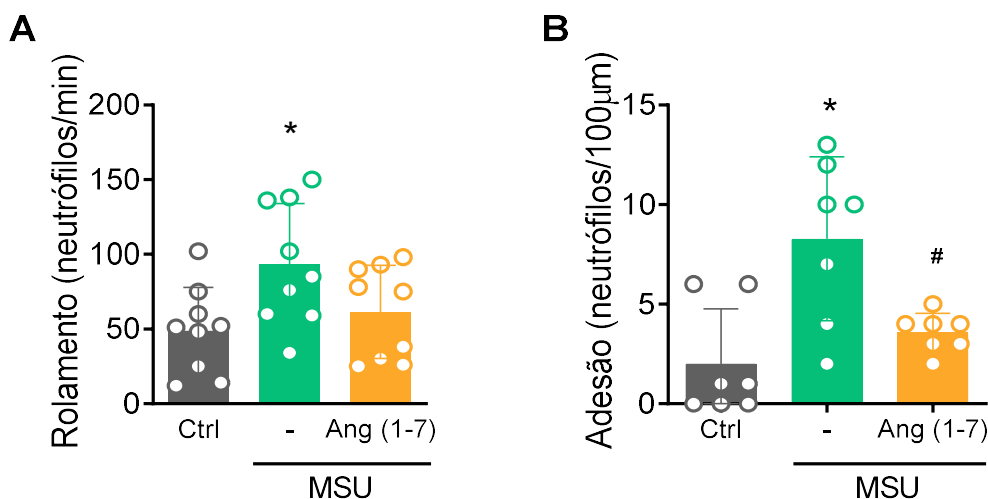
Macrófagos peritoneais pré-tratados com Ang-(1-7) (300 nM) foram estimulados por LPS (1 ug/poço) por 3 horas. As barras (T) representam a média ± desvio padrão de 6 poços por grupo. (\*) para  $p < 0,05$  quando comparado a média do grupo controle, (#) para  $p < 0,05$  quando comparado com o grupo que não recebeu tratamento (ANOVA seguida pelo pós-teste Student-Newman-Keuls). (O experimento foi repetido 2 vezes. Gráfico representativo de um experimento).

### 5.6. Ang-(1-7) reduz a migração de neutrófilos *in vivo* e *in vitro*.

Conforme demonstrado na Figura 6, a Ang-(1-7) reduziu o acúmulo de neutrófilos na cavidade articular após a injeção de cristais de MSU. Assim, investigamos se a Ang-(1-7) teria um papel direto nas funções dos neutrófilos. Inicialmente, foi avaliado se esse efeito seria diretamente sobre o rolamento e adesão de neutrófilos. Dessa forma, animais C57/LysM foram desafiados com injeção intra-articular de cristais de MSU. Três horas após esse desafio, um grupo de animais foram tratados com injeção intra-articular de 100 ng (10 uL) de Ang-(1-7) (o grupo não tratado recebeu uma injeção intra-articular de solução salina). Três horas depois, ou seja, 6 horas após o desafio com os cristais de MSU, foi realizada a análise de rolamento e adesão de leucócitos circulantes nos vasos do corpo adiposo de Hoffa através da microscopia intravital. Os animais tratados com Ang-(1-7) não apresentaram diferença significativa no rolamento de leucócitos em comparação aos



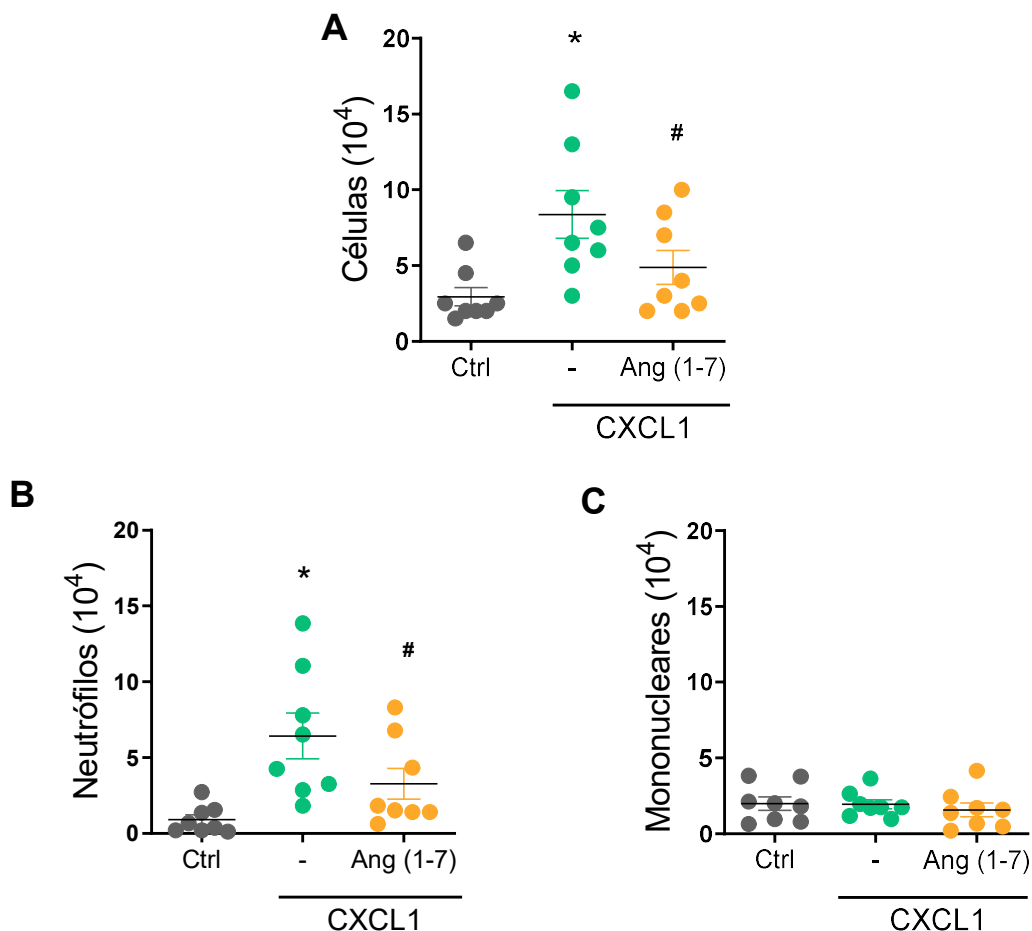
animais não tratados (Figura 13A). Em relação a adesão celular, houve uma redução significativa nos animais tratados com Ang-(1-7) em comparação com os animais que não receberam tratamento (Figura 13B). Esses dados demonstram que a Ang-(1-7) pode diminuir a inflamação aguda através da diminuição da adesão de neutrófilos às células epiteliais dos vasos sanguíneos, evitando assim a transmigração.



**Figura 5: Ang-(1-7) reduz a adesão de neutrófilos.**

Os animais LysM foram desafiados com injeção intra-articular de cristais de MSU (100 µg), 3 horas após o desafio eles foram tratados com injeção intra-articular de Ang-(1-7) (100 nM). Seis horas após a injeção dos cristais, os animais foram anestesiados e o tecido adiposo articular foi exposto, foram então analisados o rolamento (A) e a adesão (B) das células de linhagem mielóide. As barras representam a média ± desvio padrão de 9 camundongos por grupo (\*) para  $p < 0,05$  quando comparado a média do grupo controle, (#) para  $p < 0,05$  quando comparado com o grupo que não recebeu tratamento (ANOVA seguida pelo pós-teste Student-Newman-Keuls). (O experimento foi repetido 2 vezes. Gráfico representativo do somatório dos 2 experimentos).

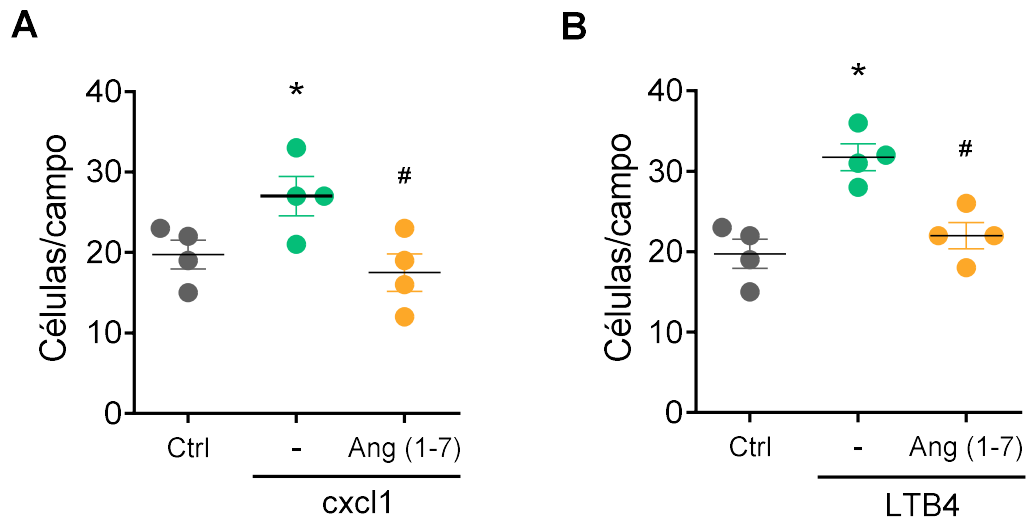
Posteriormente, foram realizados outros experimentos para avaliar se a Ang-(1-7) diminuiria o influxo de neutrófilos quando estimulados por quimioatraentes *in vivo*. Para esse fim, os animais anestesiados receberam uma injeção intra-articular com 100 ng/10 µL de CXCL1 e, logo em seguida tratados com 100 nM (10 µL) de Ang-(1-7) por injeção intra-articular. Após 3 horas, houve uma diminuição significativa das células totais e dos neutrófilos nos animais tratados com Ang-(1-7). Não houve diferença no número de células mononucleares com o tratamento (Figura 14). Assim, esse resultado sugere que a Ang-(1-7) inibe o influxo de neutrófilos através da inibição da sinalização por quimiocinas.



**Figura 64: Ang-(1-7) inibe o recrutamento de neutrófilos in vivo.**

Os animais foram desafiados com injeção intra-articular de cxcl1 (100 ng/10uL), e em seguida foram tratados com injeção intra-articular de Ang-(1-7) (100 nM). Três horas após a injeção de CXCL1, os animais foram eutanasiados para a realização do lavado articular e contagem do número de células totais (A), neutrófilos (B) e células mononucleares (C). As barras (T) representam a média  $\pm$  desvio padrão de 8 camundongos por grupo. (\*) para  $p < 0,05$  quando comparado a média do grupo controle, (#) para  $p < 0,05$  quando comparado com o grupo que não recebeu tratamento (ANOVA seguida pelo pós-teste Student-Newman-Keuls). (O experimento foi repetido 2 vezes. Gráfico representativo do somatório dos 2 experimentos).

Ainda explorando a atuação da Ang-(1-7) na atividade neutrófilos, foi realizado o ensaio de quimiotaxia (utilizando câmara de Boyden) onde neutrófilos murinos previamente tratados por 1 hora 300 nM de Ang-(1-7) foram estimulados com 30 ng/mL de CXCL1 ou  $10^{-8}$  M de LTB4 por 1 hora. Os neutrófilos tratados exibiram uma redução significativa na migração em comparação com os que não receberam o tratamento (Figura 15). Esses dados indicam que a Ang-(1-7) tem um papel direto na movimentação de neutrófilos, contribuindo assim para o menor influxo desses leucócitos para o local da inflamação.



**Figura 75: Ang-(1-7) reduz a migração de neutrófilos murinos**

Neutrófilos murinos foram tratados por 1 hora com Ang-(1-7) (300 nM) e, em seguida estimulados com CXCL1 (30 ng/mL) (A) e LTB4 ( $10^{-8}$ M) (B) por 1 hora na Câmara de Boyden. As barras (T) representam a média  $\pm$  desvio padrão de 4 poços por grupo. (\*) para  $p < 0,05$  quando comparado a média do grupo controle, (#) para  $p < 0,05$  quando comparado com o grupo que não recebeu tratamento (ANOVA seguida pelo pós-teste Student-Newman-Keuls). (O experimento foi repetido 2 vezes. Gráfico representativo de um experimento).

## 6. Discussão

A gota é uma doença inflamatória iniciada pela deposição de cristais de MSU nas articulações e nos tecidos periarticulares (Yang, Shin and Jo, 2012). A resposta inflamatória articular na gota ocorre após a internalização dos cristais de MSU por células fagocíticas sinoviais, ativando a cascata de sinalização via inflamassoma NLRP3, produzindo moléculas pró-inflamatórias e recrutamento de neutrófilos (Martin, Walton and Harper, 2009)(Martinon *et al.*, 2006). No presente estudo foi identificado o papel da Ang-(1-7) como molécula regulatória na inflamação induzida por cristais de MSU.

O influxo de neutrófilos para a cavidade articular é um marcador do ataque agudo de gota e contribui para a lesão articular (Phelps and McCarty, 1966). A injeção intra-articular de cristais de MSU causa um rápido e intenso influxo de neutrófilos, com produção de CXCL1 e IL-1 $\beta$  de maneira dependente de tempo (Amaral *et al.*, 2012). Aqui, também foi demonstrado que a inflamação induzida por cristais de MSU é dependente do recrutamento de neutrófilos, com pico em 3 horas, esse também foi o pico de CXCL1. Além disso, 6 horas após o desafio articular a IL-1 $\beta$  atingiu o pico de secreção no tecido periarticular. A partir desse ponto, houve uma diminuição desses marcadores inflamatórios, conferindo características de resolução da inflamação sustentada pelo aumento das células mononucleares. Diferenças na cinética da inflamação aguda induzida por cristais de MSU são aceitáveis, uma vez que os cristais de MSU são produzidos em nosso laboratório e podem ocorrer diferenças de tamanho e estabilidade entre os lotes, o que reflete diretamente na intensidade e duração da resposta inflamatória. Portanto, é importante que a execução de um projeto seja realizada com um mesmo lote de cristais de MSU.

As citocinas, especialmente a IL-1 $\beta$ , são responsáveis pelo início e manutenção da resposta inflamatória na gota, facilitando o influxo de neutrófilos para a articulação acometida, o que por sua vez pode aumentar a produção local da própria IL-1 $\beta$  (Pétrilli and Martinon, 2007). Da mesma forma, a IL-1 $\beta$  também impulsiona a liberação de quimiocinas, como CXCL1, importante para o recrutamento de neutrófilos, ampliando a resposta inflamatória articular (Chen *et al.*, 2006). Diferentes estudos já demonstraram que a Ang-(1-7) reduz a produção de citocinas, quimiocinas e, conseqüentemente, o recrutamento de leucócitos em diferentes condições inflamatórias (Barroso *et al.*, 2017)(da Silveira *et al.*, 2010)(Magalhães *et al.*, 2015)(El-

Hashim *et al.*, 2012). Corroborando com esses estudos, o tratamento com a Ang-(1-7), reduziu a produção de IL-1 $\beta$ , da quimiocina CXCL1 e o número de neutrófilos recrutados para a cavidade articular. Portanto, a Ang-(1-7) tem um papel anti-inflamatório na inflamação aguda induzida por cristais de MSU.

A Ang-(1-7) se liga seletivamente ao receptor MAS para exercer suas ações biológicas (Santos *et al.*, 2003). Essas ações podem ser bloqueadas através da inibição do receptor por um antagonista seletivo, o A-779 (Santos *et al.*, 1994). Observamos que o tratamento com A-779 previne a evolução natural da resolução da inflamação, observada pelo aumento de neutrófilos na cavidade articular 18 horas após o desafio. Esse achado está de acordo com dados anteriores onde a ativação do receptor MAS resultou em efeitos anti-inflamatórios, e seu silenciamento promoveu o prolongamento da resposta inflamatória (da Silveira *et al.*, 2010). Esses resultados sugerem a participação da Ang-(1-7) endógena no controle do recrutamento de neutrófilos após estímulo inflamatório com MSU, sugerindo que a Ang-(1-7) modula a resposta inflamatória através do receptor MAS. Entretanto, em nossos dados não observamos diferença na produção da citocina IL-1 $\beta$  e da quimiocina CXCL1 após o bloqueio do receptor MAS, fato esse que poderia estar relacionado de acordo com o tempo de tratamento utilizada e dose do antagonista utilizado. Ainda, acreditamos que a quantificação da Ang-(1-7) endógena no sítio inflamatório durante o curso da artrite gotosa contribuiria para avaliar se o bloqueio do receptor MAS teria algum impacto na produção de mediadores inflamatórios.

Como descrito anteriormente, durante a resolução da gota os neutrófilos recrutados entram em apoptose e são fagocitados por células mononucleares visando a restauração da homeostase tecidual (Fadok *et al.*, 1998b). Além disso, é descrito que a Ang-(1-7) induz a polarização dos macrófagos para um perfil fenotípico regulador da inflamação (Hammer *et al.*, 2016). De forma interessante, nossos resultados mostram que, apesar da Ang-(1-7) reduzir os parâmetros inflamatórios induzidos por cristais de MSU, o tratamento em tempos tardios parece não ter efeitos pró-resolutivos dentre os parâmetros avaliados, apoptose e eferocitose, na inflamação induzida por cristais de MSU. Em oposição, em um modelo de artrite induzida por antígeno, Barroso e colaboradores (2017) demonstraram que o tratamento com Ang-(1-7) no pico inflamatório diminui o número de neutrófilos, atuando tanto na apoptose de neutrófilos quanto na remoção destes por eferocitose

(Barroso *et al.*, 2017). Assim, a Ang-(1-7) parece não apresentar funções pró-resolutivas no modelo utilizado de inflamação aguda induzida por cristais de MSU.

Os macrófagos residentes são responsáveis pela produção primária de citocinas pró-inflamatórias, especialmente IL-1 $\beta$ , em resposta a exposição a cristais da MSU (Martin, Walton and Harper, 2009). A IL-1 $\beta$  é produzida inicialmente em sua forma imatura, a qual é então clivada e liberada em sua forma ativa através da ativação do inflamassoma NLRP3 (Martinon *et al.*, 2006). Na inflamação induzida por MSU, a IL-1 $\beta$  atua estimulando a produção de moléculas de adesão e quimiocinas, responsáveis pelo influxo neutrofilico (Amaral *et al.*, 2012). O pré-tratamento com Ang-(1-7) reduziu os níveis de IL-1 $\beta$  no sobrenadante de macrófagos estimulados por cristais de MSU de forma dependente de concentração. Esses dados estão de acordo com estudos que descreveram que a Ang-(1-7) inibe a ativação do inflamassoma NLRP3 induzido pela Ang II em hepatócitos, e ainda atua diminuindo a produção de IL-1 $\beta$  e a fibrose hepática em miofibroblastos induzidas por arecolina através do controle da produção de ROS (L. L. Zhang *et al.*, 2016)(You *et al.*, 2019). Diante disso, acreditamos que a Ang-(1-7) controla a produção de IL-1 $\beta$  por macrófagos peritoneais, provavelmente atuando no controle da ativação do inflamassoma NLRP3.

Souza e Costa-Neto (2011) demonstraram que a Ang-(1-7) reduz a expressão do fator de necrose tumoral, induzida por LPS, em macrófagos peritoneais de camundongos de forma dependente do receptor MAS (Souza and Costa-Neto, 2012). O TNF estimula a transcrição de componentes do inflamassoma *in vitro*, como os protótipos de Inflamassoma (por exemplo, o próprio NLRP3), a proteína acessória ASC, a enzima caspase-1 e a forma intacta e inativa da IL-1 $\beta$  (pró-IL-1 $\beta$ ) (Kahlenberg and Dubyak, 2004). Aqui, o pré-tratamento com Ang-(1-7) reduziu a secreção de TNF em células estimuladas por LPS, sugerindo que a Ang-(1-7) tenha uma ação bloqueadora no *priming* celular e a redução da IL-1 $\beta$  no tecido periarticular pode ser consequência da diminuição da expressão de mRNA de IL-1 $\beta$ . Entretanto, outras vias ainda serão investigadas, principalmente se a clivagem da pró-IL-1 $\beta$  em sua forma ativa pode ser reduzida através da inibição da atividade da caspase-1 pela Ang-(1-7) tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Por hora, a Ang-(1-7) poderia inibir a montagem e ativação do inflamassoma NLRP3 bloqueando a transcrição dos componentes desse complexo proteico, embora uma análise mais detalhada da expressão e ativação dessas moléculas intracelulares seja fundamental para uma conclusão mais precisa.

Fisiologicamente a Ang-(1-7) exerce um papel contra regulatório aos efeitos da Ang II tanto no sistema cardiovascular quanto em outros sistemas do organismo (Santos *et al.*, 2013). No contexto inflamatório a Ang II, atuando no receptor AT1, induz a liberação de quimiocinas em tecidos inflamados e estimula as interações entre leucócito e endotélio, aumentando a migração de neutrófilos *in vivo* (Nabah *et al.*, 2004). Enquanto a Ang-(1-7) inibe a migração celular promovido pela Ang II através da regulação da inativação da sinalização PI3K/Akt (F. Zhang *et al.*, 2016).

Os neutrófilos são as células principais na patologia da gota aguda, sendo que o influxo neutrofilico para a sinóvia ocorre poucas horas após o desafio com cristais de MSU (Popa-Nita and Naccache, 2010). Como descrito anteriormente, a Ang-(1-7) reduziu o influxo de neutrófilos na cavidade articular após o desafio com cristais de MSU. Desse modo, analisamos se a Ang-(1-7) exerce essa função diretamente nos neutrófilos. A microscopia intravital em animais LysM-eGFP revelou que a Ang-(1-7) controla a adesão celular, provavelmente a adesão de neutrófilos, por ser o leucócito mais abundante na inflamação aguda gotosa e pela a expressão de LysM por esses leucócitos. Assim, esses resultados sugerem uma ação direta na interação entre neutrófilo e endotélio pela Ang-(1-7), bloqueando a adesão desses leucócitos para a articulação inflamada.

No contexto da inflamação gotosa, diferentes agentes quimiotáticos têm papel direto no recrutamento de neutrófilos para o sítio inflamatório, como quimiocinas (Hachicha, Naccache and McColl, 1995) e LTB4 (Rae, Davidson and Smith, 1982). Além disso, o LTB4 foi fundamental na produção de IL-1 $\beta$  e consequente liberação de quimiocinas, atuando de forma indireta no recrutamento celular (Amaral *et al.*, 2012). As quimiocinas são as moléculas chave no processo de migração dos neutrófilos, induzindo modificações no endotélio e se ligando a receptores expressos nos leucócitos (Russo *et al.*, 2014)(Williams *et al.*, 2011). Nossos resultados mostram que *in vitro*, a migração de neutrófilos murinos estimulados por LTB4 é reduzida pelo pré-tratamento com Ang-(1-7). Demonstramos *in vivo* que a Ang-(1-7) reduz o influxo de neutrófilos para a cavidade sinovial após o estímulo com CXCL1. Esse dado é sustentado pelo resultado *in vitro*, onde o pré-tratamento com a Ang-(1-7) inibiu a migração de neutrófilos murinos, propondo que a Ang-(1-7) inibe o influxo de neutrófilos através da inibição da sinalização de quimiocinas. Quimiocinas e LTB4 exercem suas funções quimiotáticas através da ligação em receptores acoplados a proteína G, levando a ativação da enzima PI3K (Pinho *et al.*, 2007). Um trabalho

recente do nosso grupo demonstrou o papel essencial de PI3K $\gamma$  na inflamação aguda da gota, onde essa molécula participa da migração e ativação de neutrófilos, além de regular positivamente a ativação da caspase-1 (Tavares *et al.*, 2019). Dessa forma, acreditamos que a Ang-(1-7) possa controlar a ativação de macrófagos e neutrófilos através de uma ação sobre a via da PI3K.



## 7. Considerações finais

O presente trabalho demonstrou que a Ang-(1-7) contribui de forma significativa no controle da inflamação aguda da gota, seja pela inibição de mediadores pró-inflamatórios ou pela redução do influxo de neutrófilos. A Ang-(1-7) diminui a produção de IL-1 $\beta$  e CXCL1, provavelmente controlando a montagem e ativação do inflamassoma NLRP3. Além disso, a Ang-(1-7) atua diretamente em neutrófilos, reduzindo a adesão celular e quimiotaxia. Entretanto, o tratamento com a Ang-(1-7) em tempos tardios, nas mesmas condições em que foi realizado no início da inflamação, não induziu parâmetros relacionados a resolução da inflamação. Assim, esses dados sugerem que a Ang-(1-7) tenha um papel anti-inflamatório na inflamação aguda da gota. Embora seja necessário maiores esclarecimentos sobre os mecanismos de ação da Ang-(1-7) neste contexto, acreditamos em seu potencial terapêutico para o tratamento da gota e outras doenças inflamatórias dependentes de neutrófilos e do inflamassoma NLRP3.

## 8. Referência Bibliográficas

Amaral, F. A. *et al.* (2012) 'NLRP3 inflammasome-mediated neutrophil recruitment and hypernociception depend on leukotriene B4 in a murine model of gout', *Arthritis & Rheumatism*, 64(2), pp. 474–484. doi: 10.1002/art.33355.

Amaral, F. A. *et al.* (2016) 'Transmembrane TNF- $\alpha$  is sufficient for articular inflammation and hypernociception in a mouse model of gout', *European Journal of Immunology*, pp. 204–211. doi: 10.1002/eji.201545798.

Amulic, B. *et al.* (2012) 'Neutrophil Function: From Mechanisms to Disease', *Annual Review of Immunology*. Annual Reviews, 30(1), pp. 459–489. doi: 10.1146/annurev-immunol-020711-074942.

An, L.-L. *et al.* (2014) 'Complement C5a potentiates uric acid crystal-induced IL-1 $\beta$  production', *European Journal of Immunology*, 44(12), pp. 3669–3679. doi: 10.1002/eji.201444560.

Asako, H. *et al.* (1992) 'Colchicine and methotrexate reduce leukocyte adherence and emigration in rat mesenteric venules', *Inflammation*. Kluwer Academic Publishers-Plenum Publishers, 16(1), pp. 45–56. doi: 10.1007/BF00917514.

Barroso, L. C. *et al.* (2017a) 'Angiotensin-(1-7) promotes resolution of neutrophilic inflammation in a model of antigen-induced arthritis in mice', *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A., 8(NOV). doi: 10.3389/fimmu.2017.01596.

Barroso, L. C. *et al.* (2017b) 'Angiotensin-(1-7) promotes resolution of neutrophilic inflammation in a model of antigen-induced arthritis in mice', *Frontiers in Immunology*, 8(NOV). doi: 10.3389/fimmu.2017.01596.

Basil, M. C. and Levy, B. D. (2016) 'Specialized pro-resolving mediators: Endogenous regulators of infection and inflammation', *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group, pp. 51–67. doi: 10.1038/nri.2015.4.

Batista, N. V. *et al.* (2019) 'The Long Pentraxin 3 Contributes to Joint Inflammation in Gout by Facilitating the Phagocytosis of Monosodium Urate Crystals', *The Journal of Immunology*. The American Association of Immunologists, 202(6), pp. 1807–1814. doi: 10.4049/jimmunol.1701531.

Boff, D. *et al.* (2018) 'CXCR2 is critical for bacterial control and development of joint damage and pain in *Staphylococcus aureus* -induced septic arthritis in mouse', *European Journal of Immunology*, 48(3), pp. 454–463. doi: 10.1002/eji.201747198.

Bortoluci, K. R. and Medzhitov, R. (2010) 'Control of infection by pyroptosis and autophagy: Role of TLR and NLR', *Cellular and Molecular Life Sciences*. Birkhauser Verlag AG, pp. 1643–1651. doi: 10.1007/s00018-010-0335-5.

Bossi, F. *et al.* (2016) 'Angiotensin 1-7 significantly reduces diabetes-induced leukocyte recruitment both in vivo and in vitro', *Atherosclerosis*. Elsevier Ireland Ltd, 244, pp. 121–130. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2015.11.017.

Braga, T. T. *et al.* (2017) 'Soluble Uric Acid Activates the NLRP3 Inflammasome', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 7. doi: 10.1038/srep39884.

Brinkmann, V. *et al.* (2004) 'Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria', *Science*, 303(5663), pp. 1532–1535. doi: 10.1126/science.1092385.

Cantley, L. C. (2002) 'The phosphoinositide 3-kinase pathway', *Science*, pp. 1655–1657. doi: 10.1126/science.296.5573.1655.

Carvalho, M. A. P. *et al.* (2019) *Reumatologia: Diagnóstico e Tratamento*. 5°. Edited by Editora Guanabara Koogan. Rio de Janeiro.

Cerniello, F. M. *et al.* (2017) 'MAS1 Receptor Trafficking Involves ERK1/2 Activation Through a  $\beta$ -Arrestin2-Dependent Pathway', *Hypertension*. Lippincott Williams and Wilkins, 70(5), pp. 982–989. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.09789.

Chapman, P. T. *et al.* (1994) 'Noninvasive imaging of e-selectin expression by activated endothelium in urate crystal-induced arthritis', *Arthritis & Rheumatism*, 37(12), pp. 1752–1756. doi: 10.1002/art.1780371207.

Chapman, P. T. *et al.* (1997) 'Endothelial activation in monosodium urate monohydrate crystal-induced inflammation. In vitro and in vivo studies on the roles of tumor necrosis factor  $\alpha$  and interleukin-1', *Arthritis & Rheumatism*, 40(5), pp. 955–965. doi: 10.1002/art.1780400525.

Chen, C. J. *et al.* (2006) 'MyD88-dependent IL-1 receptor signaling is essential for gouty inflammation stimulated by monosodium urate crystals', *Journal of Clinical Investigation*, 116(8), pp. 2262–2271. doi: 10.1172/JCI28075.

Choi, H. K. *et al.* (2004) 'Purine-Rich Foods, Daily and Protein Intake, and the Risk of Gout in Men', *New England Journal of Medicine*, 350(11), pp. 1093–1103. doi: 10.1056/NEJMoa035700.

Choi, H. K. and Curhan, G. (2008) 'Soft drinks, fructose consumption, and the risk of gout in men: Prospective cohort study', *BMJ*, 336(7639), pp. 309–312. doi: 10.1136/bmj.39449.819271.BE.

Coll, R. C. *et al.* (2015) 'A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases', *Nature Medicine*. Nature Publishing Group, 21(3), pp. 248–257. doi: 10.1038/nm.3806.

Cronstein, B. N. *et al.* (1995) 'Colchicine alters the quantitative and qualitative display of selectins on endothelial cells and neutrophils', *Journal of Clinical Investigation*. American Society for Clinical Investigation, 96(2), pp. 994–1002. doi: 10.1172/JCI118147.

Dalbeth, N., Merriman, T. R. and Stamp, L. K. (2016) 'Gout', *The Lancet*. Lancet Publishing Group, pp. 2039–2052. doi: 10.1016/S0140-6736(16)00346-9.

Dinarello, C. A. (2019) 'The IL-1 family of cytokines and receptors in rheumatic diseases', *Nature Reviews Rheumatology*. Nature Publishing Group, pp. 612–632. doi: 10.1038/s41584-019-0277-8.

Dinarello, C. A., Simon, A. and Van Der Meer, J. W. M. (2012) 'Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases', *Nature Reviews Drug Discovery*, pp. 633–652. doi: 10.1038/nrd3800.

Doherty, M. (2009) 'New insights into the epidemiology of gout', *Rheumatology*, 48(suppl 2), pp. ii2–ii8. doi: 10.1093/rheumatology/kep086.

Donoghue, M. *et al.* (2000) 'A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9.', *Circulation research*, 87(5). doi: 10.1161/01.res.87.5.e1.

Dupont, N. *et al.* (2011) 'Autophagy-based unconventional secretory pathway for extracellular delivery of IL-1 $\beta$ ', *The EMBO Journal*, 30(23), pp. 4701–4711. doi: 10.1038/emboj.2011.398.

Dzau, V. J. (1988) 'Evolving concepts of the renin-angiotensin system focus on renal and vascular mechanisms', *American Journal of Hypertension*. Oxford Academic, 1(4), pp. 334S-337S. doi: 10.1093/ajh/1.4.334S.

Eggebeen, A. T. (2007) *Gout: An Update*. Available at: [www.aafp.org/afp](http://www.aafp.org/afp). (Accessed: 3 December 2019).

El-Hashim, A. Z. *et al.* (2012) 'Angiotensin-(1-7) inhibits allergic inflammation, via the MAS1 receptor, through suppression of ERK1/2- and NF- $\kappa$ B-dependent pathways', *British Journal of Pharmacology*, 166(6), pp. 1964–1976. doi: 10.1111/j.1476-5381.2012.01905.x.

Evavold, C. L. *et al.* (2018) 'The Pore-Forming Protein Gasdermin D Regulates Interleukin-1 Secretion from Living Macrophages', *Immunity*. Cell Press, 48(1), pp. 35-44.e6. doi: 10.1016/j.immuni.2017.11.013.

Fadok, V. A. *et al.* (1998a) 'Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF- $\beta$ , PGE2, and PAF', *Journal of Clinical Investigation*, 101(4), pp. 890–898. doi: 10.1172/JCI11112.

Fadok, V. A. *et al.* (1998b) 'Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF- $\beta$ , PGE2, and PAF', *Journal of Clinical Investigation*. American Society for Clinical Investigation, 101(4), pp. 890–898. doi: 10.1172/JCI11112.

Ferreira, A. J. and Santos, R. A. S. (2005) 'Cardiovascular actions of angiotensin-(1-7)', *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 38(4), pp. 499–507. doi: 10.1590/S0100-879X2005000400003.

Franchi, L., Eigenbrod, T. and Núñez, G. (2009) 'Cutting Edge: TNF- $\alpha$  Mediates Sensitization to ATP and Silica via the NLRP3 Inflammasome in the Absence of Microbial Stimulation', *The Journal of Immunology*. The American Association of Immunologists, 183(2), pp. 792–796. doi: 10.4049/jimmunol.0900173.

Franke, T. F. *et al.* (1995) *The Protein Kinase Encoded by the Akt Proto-Oncogene Is a Target of the PDGF-Activated Phosphatidylinositol 3-Kinase*, *Cell*.

Fullerton, J. N. and Gilroy, D. W. (2016) 'Resolution of inflammation: A new therapeutic frontier', *Nature Reviews Drug Discovery*. Nature Publishing Group, pp. 551–567. doi: 10.1038/nrd.2016.39.

Gafford, J. T. *et al.* (1983) 'Human Kidney "Enkephalinase", a Neutral Metalloendopeptidase That Cleaves Active Peptides', *Biochemistry*, 22(13), pp. 3265–3271. doi: 10.1021/bi00282a035.

Galvão, I. *et al.* (2016) 'Macrophage migration inhibitory factor drives neutrophil accumulation by facilitating IL-1 $\beta$  production in a murine model of acute gout', *Journal of*

*Leukocyte Biology*. Wiley, 99(6), pp. 1035–1043. doi: 10.1189/jlb.3ma0915-418r.

Galvão, I. *et al.* (2017) 'Annexin A1 promotes timely resolution of inflammation in murine gout', *European Journal of Immunology*, 47(3), pp. 585–596. doi: 10.1002/eji.201646551.

Getting, S. J. *et al.* (2002) 'Activation of melanocortin type 3 receptor as a molecular mechanism for adrenocorticotrophic hormone efficacy in gouty arthritis', *Arthritis & Rheumatism*, 46(10), pp. 2765–2775. doi: 10.1002/art.10526.

Gironacci, M. M. *et al.* (2011) 'Angiotensin (1-7) induces mas receptor internalization', *Hypertension*, 58(2), pp. 176–181. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.173344.

Greenfeder, S. A. *et al.* (1995) 'Molecular cloning and characterization of a second subunit of the interleukin 1 receptor complex', *Journal of Biological Chemistry*, 270(23), pp. 13757–13765. doi: 10.1074/jbc.270.23.13757.

Hachicha, M., Naccache, P. H. and McColl, S. R. (1995) 'Inflammatory microcrystals differentially regulate the secretion of macrophage inflammatory protein 1 and interleukin 8 by human neutrophils: A possible mechanism of neutrophil recruitment to sites of inflammation in synovitis', *Journal of Experimental Medicine*, 182(6), pp. 2019–2025. doi: 10.1084/jem.182.6.2019.

Hammer, A. *et al.* (2016) 'Role of the receptor Mas in macrophage-mediated inflammation in vivo', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 113(49), pp. 14109–14114. doi: 10.1073/pnas.1612668113.

He, Y., Hara, H. and Núñez, G. (2016) 'Mechanism and Regulation of NLRP3 Inflammasome Activation', *Trends in Biochemical Sciences*. Elsevier Ltd, pp. 1012–1021. doi: 10.1016/j.tibs.2016.09.002.

Hickey, M. J., Granger, D. N. and Kubes, P. (1999) *Integrin 4  $\alpha$  Vivo: A Critical Role for the IL-4-Induced Leukocyte Recruitment In Molecular Mechanisms Underlying*, *J Immunol References*. Available at: <http://www.jimmunol.org/content/163/6/http://www.jimmunol.org/content/163/6/3441.full#ref-list-1> (Accessed: 8 January 2020).

Hornung, V. *et al.* (2008) 'Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization', *Nature Immunology*, 9(8), pp. 847–856. doi: 10.1038/ni.1631.

Kahlenberg, J. M. *et al.* (2005) 'Potentiation of Caspase-1 Activation by the P2X7 Receptor Is Dependent on TLR Signals and Requires NF- $\kappa$ B-Driven Protein Synthesis', *The Journal of Immunology*. The American Association of Immunologists, 175(11), pp. 7611–7622. doi: 10.4049/jimmunol.175.11.7611.

Kahlenberg, J. M. and Dubyak, G. R. (2004) 'Mechanisms of caspase-1 activation by P2X7 receptor-mediated K<sup>+</sup> release', *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 286(5 55-5). doi: 10.1152/ajpcell.00494.2003.

Kanneganti, T. D., Lamkanfi, M. and Núñez, G. (2007) 'Intracellular NOD-like Receptors in Host Defense and Disease', *Immunity*, pp. 549–559. doi: 10.1016/j.immuni.2007.10.002.

Kanwar, S. *et al.* (1997) 'The association between  $\alpha$ 4-integrin, P-selectin, and E-selectin in an allergic model of inflammation', *Journal of Experimental Medicine*, 185(6), pp. 1077–

1087. doi: 10.1084/jem.185.6.1077.

Kedar, E. and Simkin, P. A. (2012) 'A Perspective on Diet and Gout', *Advances in Chronic Kidney Disease*, pp. 392–397. doi: 10.1053/j.ackd.2012.07.011.

Kingsbury, S. R., Conaghan, P. G. and McDermott, M. F. (2011) 'The role of the NLRP3 inflammasome in gout', *Journal of Inflammation Research*, pp. 39–49. doi: 10.2147/JIR.S11330.

Kiyohara, C. *et al.* (1999) 'Inverse association between coffee drinking and serum uric acid concentrations in middle-aged Japanese males', *British Journal of Nutrition*. Cambridge University Press (CUP), 82(2), pp. 125–130. doi: 10.1017/s0007114599001270.

Korkmaz, B. *et al.* (2010) 'Neutrophil elastase, proteinase 3, and cathepsin G as therapeutic targets in human diseases', *Pharmacological Reviews*, pp. 726–759. doi: 10.1124/pr.110.002733.

Kostenis, E. *et al.* (2005) 'G-protein-coupled receptor Mas is a physiological antagonist of the angiotensin II type 1 receptor', *Circulation*, 111(14), pp. 1806–1813. doi: 10.1161/01.CIR.0000160867.23556.7D.

Kuo, C. F., Grainge, M. J., Zhang, W., *et al.* (2015) 'Global epidemiology of gout: Prevalence, incidence and risk factors', *Nature Reviews Rheumatology*. Nature Publishing Group, pp. 649–662. doi: 10.1038/nrrheum.2015.91.

Kuo, C. F., Grainge, M. J., Mallen, C., *et al.* (2015) 'Rising burden of gout in the UK but continuing suboptimal management: A nationwide population study', *Annals of the Rheumatic Diseases*. BMJ Publishing Group, 74(4), pp. 661–667. doi: 10.1136/annrheumdis-2013-204463.

Lämmermann, T. *et al.* (2013) 'Neutrophil swarms require LTB4 and integrins at sites of cell death in vivo', *Nature*, 498(7454), pp. 371–375. doi: 10.1038/nature12175.

Ley, K. *et al.* (2007) 'Getting to the site of inflammation: The leukocyte adhesion cascade updated', *Nature Reviews Immunology*, pp. 678–689. doi: 10.1038/nri2156.

Li, Y. *et al.* (2018) 'Neutrophil extracellular traps formation and aggregation orchestrate induction and resolution of sterile crystal-mediated inflammation', *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A. doi: 10.3389/fimmu.2018.01559.

Lioté, F. *et al.* (1996) 'Inhibition and prevention of monosodium urate monohydrate crystal-induced acute inflammation in vivo by transforming growth factor  $\beta$ 1', *Arthritis and Rheumatism*, 39(7), pp. 1192–1198. doi: 10.1002/art.1780390718.

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 and Rheumatism*, pp. 2936–2946. doi: 10.1002/art.21238.

Lu, W. *et al.* (2017) 'Angiotensin-(1-7) relieved renal injury induced by chronic intermittent hypoxia in rats by reducing inflammation, oxidative stress and fibrosis', *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. Associacao Brasileira de Divulgacao Cientifica, 50(1). doi: 10.1590/1414-431X20165594.

Mackenzie, A. *et al.* (2001) 'Rapid secretion of interleukin-1 $\beta$  by microvesicle shedding',

*Immunity*. Cell Press, 15(5), pp. 825–835. doi: 10.1016/S1074-7613(01)00229-1.

Magalhaes, G. S. *et al.* (2018) 'Angiotensin-(1–7) Promotes Resolution of Eosinophilic Inflammation in an Experimental Model of Asthma', *Frontiers in Immunology*, 9. doi: 10.3389/fimmu.2018.00058.

Magalhães, G. S. *et al.* (2015) 'Angiotensin-(1-7) attenuates airway remodelling and hyperresponsiveness in a model of chronic allergic lung inflammation', *British Journal of Pharmacology*. John Wiley and Sons Inc., 172(9), pp. 2330–2342. doi: 10.1111/bph.13057.

Maiuolo, J. *et al.* (2016) 'Regulation of uric acid metabolism and excretion', *International Journal of Cardiology*. Elsevier Ireland Ltd, 213, pp. 8–14. doi: 10.1016/j.ijcard.2015.08.109.

Martin, W. J., Walton, M. and Harper, J. (2009) 'Resident macrophages initiating and driving inflammation in a monosodium urate monohydrate crystal-induced murine peritoneal model of acute gout', *Arthritis & Rheumatism*, 60(1), pp. 281–289. doi: 10.1002/art.24185.

Martinon, F. *et al.* (2006a) 'Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome', *Nature*, 440(7081), pp. 237–241. doi: 10.1038/nature04516.

Martinon, F. *et al.* (2006b) 'Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome', *Nature*, 440(7081), pp. 237–241. doi: 10.1038/nature04516.

Martinon, F. (2010) 'Mechanisms of uric acid crystal-mediated autoinflammation', *Immunological Reviews*, 233(1), pp. 218–232. doi: 10.1111/j.0105-2896.2009.00860.x.

Martinon, F., Burns, K. and Tschopp, J. (2002) 'The Inflammasome: A molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL- $\beta$ ', *Molecular Cell*, 10(2), pp. 417–426. doi: 10.1016/S1097-2765(02)00599-3.

Martinon, F. and Glimcher, L. H. (2006) 'Gout: New insights into an old disease', *Journal of Clinical Investigation*, pp. 2073–2075. doi: 10.1172/JCI29404.

Massachusetts and General Hospital (no date) *Inflammation 101: Chemotaxis, 2004-2007*. Available at: <http://www.gluegrant.org/chemotaxis.htm> (Accessed: 8 December 2019).

Mckinney, C. A. *et al.* (no date) *Angiotensin-(1-7) and angiotensin-(1-9): function in cardiac and vascular remodeling*.

Medzhitov, R. (2008) 'Origin and physiological roles of inflammation', *Nature*. Nature Publishing Group, pp. 428–435. doi: 10.1038/nature07201.

Medzhitov, R. (2010) 'Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame', *Cell*, pp. 771–776. doi: 10.1016/j.cell.2010.03.006.

Misawa, T. *et al.* (2013) 'Microtubule-driven spatial arrangement of mitochondria promotes activation of the NLRP3 inflammasome', *Nature Immunology*, 14(5), pp. 454–460. doi: 10.1038/ni.2550.

Mitroulis, I., Kambas, K. and Ritis, K. (2013) 'Neutrophils, IL-1 $\beta$ , and gout: Is there a link?', *Seminars in Immunopathology*, pp. 501–512. doi: 10.1007/s00281-013-0361-0.

Muñoz-Planillo, R. *et al.* (2013) 'K<sup>+</sup> Efflux Is the Common Trigger of NLRP3 Inflammasome Activation by Bacterial Toxins and Particulate Matter', *Immunity*, 38(6), pp. 1142–1153. doi: 10.1016/j.immuni.2013.05.016.

Nabah, Y. N. A. *et al.* (2004) 'Angiotensin II induces neutrophil accumulation in vivo through generation and release of CXC chemokines.', *Circulation*, 110(23), pp. 3581–6. doi: 10.1161/01.CIR.0000148824.93600.F3.

Nasjletti, A. and Masson, G. M. C. (1971) 'Hepatic Origin of Renin Substrate', *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 49(10), pp. 931–932. doi: 10.1139/y71-129.

Nehme, A. *et al.* (2019) 'An Update on the Tissue Renin Angiotensin System and Its Role in Physiology and Pathology', *Journal of Cardiovascular Development and Disease*. MDPI AG, 6(2), p. 14. doi: 10.3390/jcdd6020014.

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), pp. 807–818. doi: 10.1016/j.immuni.2008.09.013.

Nuki, G. and Simkin, P. A. (2006) 'A concise history of gout and hyperuricemia and their treatment', *Arthritis Research and Therapy*. doi: 10.1186/ar1906.

Ortega-Gómez, A., Perretti, M. and Soehnlein, O. (2013) 'Resolution of inflammation: an integrated view', *EMBO Molecular Medicine*, 5(5), pp. 661–674. doi: 10.1002/emmm.201202382.

Ottaviani, S. *et al.* (2013) 'Efficacy of anakinra in gouty arthritis: A retrospective study of 40 cases', *Arthritis Research and Therapy*, 15(5). doi: 10.1186/ar4303.

Passos-Silva, D. G., Verano-Braga, T. and Santos, R. A. S. (2013) 'Angiotensin-(1-7): Beyond the cardio-renal actions', *Clinical Science*, pp. 443–456. doi: 10.1042/CS20120461.

Perregaux, D. and Gabel, C. A. (1994) 'Interleukin-1 $\beta$  maturation and release in response to ATP and nigericin. Evidence that potassium depletion mediated by these agents is a necessary and common feature of their activity', *Journal of Biological Chemistry*, 269(21), pp. 15195–15203.

Pétrilli, V. and Martinon, F. (2007) 'The inflammasome, autoinflammatory diseases, and gout', *Joint Bone Spine*, pp. 571–576. doi: 10.1016/j.jbspin.2007.04.004.

Phelps, P. (2008) 'Polymorphonuclear leukocyte motility in vitro: IV. Colchicine inhibition of chemotactic activity formation after phagocytosis of urate crystals', *Arthritis and Rheumatism*, 58(2 SUPPL.). doi: 10.1002/art.23357.

Phelps, P. and McCarty, D. J. (1966) 'Crystal-induced inflammation in canine joints. II. Importance of polymorphonuclear leukocytes.', *The Journal of experimental medicine*, 124(1), pp. 115–126. doi: 10.1084/jem.124.1.115.

Pinho, V. *et al.* (2007) 'Tissue- and Stimulus-Dependent Role of Phosphatidylinositol 3-Kinase Isoforms for Neutrophil Recruitment Induced by Chemoattractants In Vivo', *The Journal of Immunology*. The American Association of Immunologists, 179(11), pp. 7891–7898. doi: 10.4049/jimmunol.179.11.7891.

Popa-Nita, O. and Naccache, P. H. (2010) 'Crystal-induced neutrophil activation', *Immunology and Cell Biology*, 88(1), pp. 32–40. doi: 10.1038/icb.2009.98.

Punzi, L. *et al.* (2012) 'Gout as autoinflammatory disease: New mechanisms for more appropriated treatment targets', *Autoimmunity Reviews*, pp. 66–71. doi: 10.1016/j.autrev.2012.07.024.



Qu, Y. *et al.* (2007) 'Nonclassical IL-1 $\beta$  Secretion Stimulated by P2X7 Receptors Is Dependent on Inflammasome Activation and Correlated with Exosome Release in Murine Macrophages', *The Journal of Immunology*. The American Association of Immunologists, 179(3), pp. 1913–1925. doi: 10.4049/jimmunol.179.3.1913.

Rae, S. A., Davidson, E. M. and Smith, M. J. H. (1982) 'LEUKOTRIENE B<sub>4</sub>, AN INFLAMMATORY MEDIATOR IN GOUT', *The Lancet*, 320(8308), pp. 1122–1124. doi: 10.1016/S0140-6736(82)92785-4.

Ragab, G., Elshahaly, M. and Bardin, T. (2017a) 'Gout: An old disease in new perspective – A review', *Journal of Advanced Research*. Elsevier B.V., pp. 495–511. doi: 10.1016/j.jare.2017.04.008.

Ragab, G., Elshahaly, M. and Bardin, T. (2017b) 'Gout: An old disease in new perspective – A review', *Journal of Advanced Research*. Cairo University, 8(5), pp. 495–511. doi: 10.1016/j.jare.2017.04.008.

Rathinam, V. A. K., Vanaja, S. K. and Fitzgerald, K. A. (2012) 'Regulation of inflammasome signaling', *Nature Immunology*, pp. 333–342. doi: 10.1038/ni.2237.

Ravelli, R. B. G. *et al.* (2004) 'Insight into tubulin regulation from a complex with colchicine and a stathmin-like domain', *Nature*, 428(6979), pp. 198–202. doi: 10.1038/nature02393.

Rice, G. I. *et al.* (2004) 'Evaluation of angiotensin-converting enzyme (ACE), its homologue ACE2 and neprilysin in angiotensin peptide metabolism', *Biochemical Journal*, 383(1), pp. 45–51. doi: 10.1042/BJ20040634.

Riches, D. W. H., Chan, E. D. and Winston, B. W. (1996) 'TNF- $\alpha$ -induced regulation and signalling in macrophages', in *Immunobiology*. Elsevier GmbH, pp. 477–490. doi: 10.1016/S0171-2985(96)80017-9.

Richette, P. *et al.* (2019) '2018 updated European League Against Rheumatism evidence-based recommendations for the diagnosis of gout', *Annals of the Rheumatic Diseases*. BMJ Publishing Group. doi: 10.1136/annrheumdis-2019-215315.

Richette, P. and Bardin, T. (2010) 'Gout', *The Lancet*, pp. 318–328. doi: 10.1016/S0140-6736(09)60883-7.

Rock, K. L., Kataoka, H. and Lai, J. J. (2013) 'Uric acid as a danger signal in gout and its comorbidities', *Nature Reviews Rheumatology*, pp. 13–23. doi: 10.1038/nrrheum.2012.143.

Ruiz, T. *et al.* (2017) 'The Anti-Inflammatory Potential of ACE2/Angiotensin-(1-7)/Mas Receptor Axis: Evidence from Basic and Clinical Research', pp. 1301–1313. doi: 10.2174/1389450117666160727142401.

Russo, R. C. *et al.* (2014) 'The CXCL8/IL-8 chemokine family and its receptors in inflammatory diseases', *Expert Review of Clinical Immunology*. Expert Reviews Ltd., pp. 593–619. doi: 10.1586/1744666X.2014.894886.

Santos, R. A. S. *et al.* (1988) 'Converting enzyme activity and angiotensin metabolism in the dog brainstem', *Hypertension*, 11(2), pp. 153–157. doi: 10.1161/01.hyp.11.2\_pt\_2.153.

Santos, R. A. S. *et al.* (1994) 'Characterization of a new angiotensin antagonist selective

for angiotensin-(1-7): Evidence that the actions of angiotensin-(1-7) are mediated by specific angiotensin receptors', *Brain Research Bulletin*, 35(4), pp. 293–298. doi: 10.1016/0361-9230(94)90104-X.

Santos, R. A. S. *et al.* (2003) 'Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(14), pp. 8258–8263. doi: 10.1073/pnas.1432869100.

Santos, R. A. S. *et al.* (2013) 'Angiotensin-converting enzyme 2, angiotensin-(1-7) and Mas: New players of the renin-angiotensin system', *Journal of Endocrinology*, 216(2). doi: 10.1530/JOE-12-0341.

Scanu, A. *et al.* (2012) 'Cytokine levels in human synovial fluid during the different stages of acute gout: Role of transforming growth factor  $\beta$ 1 in the resolution phase', *Annals of the Rheumatic Diseases*, 71(4), pp. 621–624. doi: 10.1136/annrheumdis-2011-200711.

Schauer, C. *et al.* (2014) 'Aggregated neutrophil extracellular traps limit inflammation by degrading cytokines and chemokines', *Nature Medicine*. Nature Publishing Group, 20(5), pp. 511–517. doi: 10.1038/nm.3547.

Schett, G. *et al.* (2015) 'Why does the gout attack stop? A roadmap for the immune pathogenesis of gout', *RMD Open*. BMJ Publishing Group. doi: 10.1136/rmdopen-2015-000046.

Shi, Y., Mucsi, A. D. and Ng, G. (2010) 'Monosodium urate crystals in inflammation and immunity', *Immunological Reviews*, 233(1), pp. 203–217. doi: 10.1111/j.0105-2896.2009.00851.x.

Sil, P. *et al.* (2017) 'Macrophage-derived IL-1 $\beta$  enhances monosodium urate crystal-triggered NET formation', *Inflammation Research*. Birkhauser Verlag AG, 66(3), pp. 227–237. doi: 10.1007/s00011-016-1008-0.

Silveira, K. D. *et al.* (2013) 'Mechanisms of the anti-inflammatory actions of the angiotensin type1 receptor antagonist losartan in experimental models of arthritis', *Peptides*. Elsevier Inc., 46, pp. 53–63. doi: 10.1016/j.peptides.2013.05.012.

da Silveira, K. D. *et al.* (2010) 'Anti-Inflammatory Effects of the Activation of the Angiotensin-(1–7) Receptor, Mas, in Experimental Models of Arthritis', *The Journal of Immunology*. The American Association of Immunologists, 185(9), pp. 5569–5576. doi: 10.4049/jimmunol.1000314.

Singh, G., Lingala, B. and Mithal, A. (2019) 'Gout and hyperuricaemia in the USA: prevalence and trends', *Rheumatology*, 58(12), pp. 2177–2180. doi: 10.1093/rheumatology/kez196.

SKEGGS, L. T., KAHN, J. R. and SHUMWAY, N. P. (1956) 'The preparation and function of the hypertensin-converting enzyme.', *The Journal of experimental medicine*, 103(3), pp. 295–299. doi: 10.1084/jem.103.3.295.

So, A. *et al.* (2007) 'A pilot study of IL-1 inhibition by anakinra in acute gout', *Arthritis Research and Therapy*, 9. doi: 10.1186/ar2143.

So, A. (2008) 'Developments in the scientific and clinical understanding of gout', *Arthritis Research and Therapy*. doi: 10.1186/ar2509.

So, A. *et al.* (2010) 'Canakinumab for the treatment of acute flares in difficult-to-treat gouty arthritis: Results of a multicenter, phase II, dose-ranging study', *Arthritis & Rheumatism*, 62(10), pp. 3064–3076. doi: 10.1002/art.27600.

So, A. K. and Martinon, F. (2017) 'Inflammation in gout: Mechanisms and therapeutic targets', *Nature Reviews Rheumatology*. Nature Publishing Group, pp. 639–647. doi: 10.1038/nrrheum.2017.155.

Soehnlein, O. and Lindbom, L. (2010) 'Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation', *Nature Reviews Immunology*, pp. 427–439. doi: 10.1038/nri2779.

Solinski, H. J., Gudermann, T. and Breit, A. (2014) 'Pharmacology and signaling of MAS-related G protein-coupled receptors', *Pharmacological Reviews*. American Society for Pharmacology and Experimental Therapy, 66(3), pp. 570–597. doi: 10.1124/pr.113.008425.

Souza, L. L. and Costa-Neto, C. M. (2012) 'Angiotensin-(1-7) decreases LPS-induced inflammatory response in macrophages', *Journal of Cellular Physiology*, 227(5), pp. 2117–2122. doi: 10.1002/jcp.22940.

Sugimoto, M. A. *et al.* (2016) 'Resolution of inflammation: What controls its onset?', *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A. doi: 10.3389/fimmu.2016.00160.

Tavares, L. D. *et al.* (2019) 'Phosphoinositide-3 kinase gamma regulates caspase-1 activation and leukocyte recruitment in acute murine gout', *Journal of Leukocyte Biology*, 106(3), pp. 619–629. doi: 10.1002/JLB.MA1118-470RR.

Terkeltaub, R. A. *et al.* (1991) 'Apolipoprotein (Apo) E inhibits the capacity of monosodium urate crystals to stimulate neutrophils. Characterization of intraarticular Apo E and demonstration of Apo E binding to urate crystals in vivo', *Journal of Clinical Investigation*, 87(1), pp. 20–26. doi: 10.1172/JCI114971.

Thornberry, N. A. *et al.* (1992) 'A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 $\beta$  processing in monocytes', *Nature*, 356(6372), pp. 768–774. doi: 10.1038/356768a0.

Tipnis, S. R. *et al.* (2000) 'A human homolog of angiotensin-converting enzyme: Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase', *Journal of Biological Chemistry*, 275(43), pp. 33238–33243. doi: 10.1074/jbc.M002615200.

Torres, R. *et al.* (2009) 'Hyperalgesia, synovitis and multiple biomarkers of inflammation are suppressed by interleukin 1 inhibition in a novel animal model of gouty arthritis', *Annals of the Rheumatic Diseases*, 68(10), pp. 1602–1608. doi: 10.1136/ard.2009.109355.

Tramontini, N. *et al.* (2004) 'Central role of complement membrane attack complex in monosodium urate crystal-induced neutrophilic rabbit knee synovitis', *Arthritis & Rheumatism*, 50(8), pp. 2633–2639. doi: 10.1002/art.20386.

Vago, J. P. *et al.* (2012a) 'Annexin A1 modulates natural and glucocorticoid-induced resolution of inflammation by enhancing neutrophil apoptosis', *Journal of Leukocyte Biology*. Wiley, 92(2), pp. 249–258. doi: 10.1189/jlb.0112008.

Vago, J. P. *et al.* (2012b) 'Annexin A1 modulates natural and glucocorticoid-induced resolution of inflammation by enhancing neutrophil apoptosis', *Journal of Leukocyte Biology*, 92(2), pp. 249–258. doi: 10.1189/jlb.0112008.

Villela, D. *et al.* (2015) 'Angiotensin type 2 receptor (AT 2 R) and receptor Mas: A complex liaison', *Clinical Science*. Portland Press Ltd, 128(4), pp. 227–234. doi: 10.1042/CS20130515.

Welches, W. R. *et al.* (1991) 'Evidence that prolyl endopeptidase participates in the processing of brain angiotensin', *Journal of Hypertension*, 9(7), pp. 631–638. doi: 10.1097/00004872-199107000-00008.

Williams, M. R. *et al.* (2011) 'Emerging mechanisms of neutrophil recruitment across endothelium', *Trends in Immunology*, pp. 461–469. doi: 10.1016/j.it.2011.06.009.

Wilson, L. and Saseen, J. J. (2016) 'Gouty Arthritis: A Review of Acute Management and Prevention', *Pharmacotherapy*, 36(8), pp. 906–922. doi: 10.1002/phar.1788.

Yagnik, D. R. *et al.* (2000) 'Noninflammatory phagocytosis of monosodium urate monohydrate crystals by mouse macrophages: Implications for the control of joint inflammation in gout', *Arthritis & Rheumatism*, 43(8), pp. 1779–1789. doi: 10.1002/1529-0131(200008)43:8<1779::AID-ANR14>3.0.CO;2-2.

Yagnik, D. R. *et al.* (2004) 'Macrophage release of transforming growth factor  $\beta$ 1 during resolution of monosodium urate monohydrate crystal-induced inflammation', *Arthritis & Rheumatism*, 50(7), pp. 2273–2280. doi: 10.1002/art.20317.

Yang, C. S., Shin, D. M. and Jo, E. K. (2012) 'The role of NLR-related protein 3 inflammasome in host defense and inflammatory diseases', *International Neurourology Journal*, 16(1), pp. 2–12. doi: 10.5213/inj.2012.16.1.2.

Yokose, K. *et al.* (2018) 'TNF- $\alpha$  potentiates uric acid-induced interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) secretion in human neutrophils', *Modern Rheumatology*. Taylor and Francis Ltd, 28(3), pp. 513–517. doi: 10.1080/14397595.2017.1369924.

You, Y. *et al.* (2019) 'Angiotensin (1-7) inhibits arecoline-induced migration and collagen synthesis in human oral myofibroblasts via inhibiting NLRP3 inflammasome activation', *Journal of Cellular Physiology*, 234(4), pp. 4668–4680. doi: 10.1002/jcp.27267.

Zeng, M. *et al.* (2016) 'IL-37 inhibits the production of pro-inflammatory cytokines in MSU crystal-induced inflammatory response', *Clinical Rheumatology*. Springer London, 35(9), pp. 2251–2258. doi: 10.1007/s10067-015-3109-5.

Zhang, F. *et al.* (2016) 'Angiotensin-(1-7) abrogates angiotensin II-induced proliferation, migration and inflammation in VSMCs through inactivation of ROS-mediated PI3K/Akt and MAPK/ERK signaling pathways', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 6. doi: 10.1038/srep34621.

Zhang, L. L. *et al.* (2016) 'Angiotensin(1–7) attenuated Angiotensin II-induced hepatocyte EMT by inhibiting NOX-derived H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-activated NLRP3 inflammasome/IL-1 $\beta$ /Smad circuit', *Free Radical Biology and Medicine*. Elsevier Inc., 97, pp. 531–543. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.07.014.

Zhao, W. *et al.* (2015) 'Angiotensin 1-7 Promotes Cardiac Angiogenesis Following Infarction', *Current Vascular Pharmacology*, 13(1), pp. 37–42. doi: 10.2174/1570161113119990006.

Zhou, R. *et al.* (2010) 'Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation', *Nature Immunology*, 11(2), pp. 136–140. doi: 10.1038/ni.1831.

Zhu, Y., Pandya, B. J. and Choi, H. K. (2011) 'Prevalence of gout and hyperuricemia in the US general population: The National Health and Nutrition Examination Survey 2007-2008', *Arthritis & Rheumatism*, 63(10), pp. 3136–3141. doi: 10.1002/art.30520.

## 9. ANEXO 1

### UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

#### CEUA

#### COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

**Protocolo CEUA:** 295/2018

**Título do projeto:** Papel da Angiotensina 1-7 na resposta inflamatória induzida por cristais de ácido úrico

**Finalidade:** Pesquisa

**Pesquisador responsável:** Flavio Almeida Amaral

**Unidade:** Instituto de Ciências Biológicas

**Departamento:** Departamento de Bioquímica e Imunologia

**Situação atual:** [Decisão Final - Aprovado](#)

Aprovado na reunião do dia 12/11/2018. Validade: 12/11/2018 à 11/11/2023

Belo Horizonte, 12/11/2018.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

[https://aplicativos.ufmg.br/solicite\\_ceua/](https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/)

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