

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia

Mariana Andrade Aganetti

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS IMUNOMODULATÓRIOS DO PEPTÍDEO
SINTÉTICO P140 EM MODELO EXPERIMENTAL DE ARTRITE GOTOSA - GOTA**

Belo Horizonte

2021

Mariana Andrade Aganetti

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS IMUNOMODULATÓRIOS DO PEPTÍDEO
SINTÉTICO P140 EM MODELO EXPERIMENTAL DE ARTRITE GOTOSA - GOTA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Imunologia.

Orientadora: Profa. Dra. Angélica Thomaz
Vieira

Co-orientadora: Dra. Sylviane Muller

Belo Horizonte

2021

- 043 Aganetti, Mariana Andrade.
Avaliação dos efeitos imunomodulatórios do peptídeo sintético P140 em modelo experimental de artrite gotosa - gota [manuscrito] / Mariana Andrade Aganetti. - 2021.
69 f. : il. ; 29,5 cm.
- Orientadora: Prof.^a Dr.^a. Angélica Thomaz Vieira. Coorientadora: Dr.^a. Sylviane Muller.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia.
1. Bioquímica e imunologia. 2. Gota (Doença). 3. Peptídeos. 4. Inflamação. 5. Autofagia. I. Vieira, Angélica Thomáz. II. Muller, Sylviane. III. Universidade Federal de MinasGerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 577.1



Universidade Federal de Minas Gerais
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha
 31270-901 – Belo Horizonte – MG
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615



ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE MARIANA ANDRADE AGANETTI. Aos dezessete dias do mês de agosto de 2021 às 09:00 horas, reuniu-se de forma “on line” utilizando a plataforma “Google Meet”, no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Avaliação do Papel do Peptídeo Sintético P140 no Modelo Murino Experimental de Gota", requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia, área de concentração: Imunologia. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Angélica Thomaz Vieira, da Universidade Federal de Minas Gerais, 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 do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Izabela Galvão (Universidade de Tecnologia de Sydney), aprovada; Dr. Luis Henrique Franco (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Angélica Thomaz Vieira - Orientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada:

APROVADA
 REPROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 17 de agosto de 2021.

Dra. Izabela Galvão (Universidade de Tecnologia de Sydney)

Dr. Luis Henrique Franco (UFMG)

Dra. Angélica Thomaz Vieira - Orientadora (UFMG)

Profª Leda Quercia Vieira
 Coordenadora do Programa de Pós-Graduação
 em Bioquímica e Imunologia

*A todos aqueles que estiveram ao meu lado
quando tudo parecia afundar, obrigada.*

AGRADECIMENTOS

Em muitas ocasiões me disseram que a pós graduação seria uma experiência em que eu me sentiria completamente sozinha, porém eu me senti totalmente o contrário. Eu encontrei diversas pessoas em que pude me apoiar e que me entenderam e me deram suporte em vários momentos cruciais que me fizeram chegar até aqui, e que por elas e pelo auxílio delas, eu vou conseguir continuar. É por isso que eu gostaria de agradecer, primeiramente a todos do Laboratório de Neurofarmacologia, principalmente ao Giovanni, vocês me abriram as portas no momento em que mais precisei de apoio, também gostaria de agradecer a Priscila que me auxiliou e que tantas vezes me ouviu e aconselhou.

Agradeço imensamente a Profa. Angélica por ter aberto as portas do seu laboratório para mim, e por ter sido mais do que uma orientadora, sempre muito compreensiva e querendo o nosso melhor, agradeço também aos seus alunos e principalmente a Viviani. Vivi foi e continua sendo minha parceira e braço direito e esquerdo dentro do laboratório, além de uma grande amiga na vida pessoal, obrigada por me acolher e fazer com que os dias sejam mais leves.

Agradeço também ao Latifúndio LAMEX e LMI, que fizeram nossa convivência ser muito boa, a Paula por ser uma ótima parceira de laboratório, ao Alexandre por sempre alegrar o ambiente, ao Narciso e ao Carlos por sempre estarem dispostos a nos ajudar.

Um agradecimento mais que especial ao meu parceiro de vida Geovani, que faz com que tudo tenha sentido, que me mantém firme vivendo um dia de cada vez, e que deu forças e me acompanhou a cada passo desse mestrado, que não foi fácil, obrigada por sempre estar comigo.

A minha família, minha mãe, minha irmã e meu pai, obrigada por serem meu centro e núcleo, por me fazerem repensar atitudes e por sempre estarem ao meu lado, amo muito vocês e saibam que tudo isso é por cada um de vocês.

RESUMO

A gota é uma doença inflamatória crônica causada pela deposição de cristais de monourato de sódio (MSU) nas articulações, na qual, desencadeia uma resposta inflamatória caracterizada pelo influxo de neutrófilos, ativação do complexo intracelular de proteínas do inflamassoma e hiperalgesia articular intensa. A prevalência da gota tem aumentado mundialmente nos últimos anos, e, ainda não possui tratamento eficaz. A terapia anti-inflamatória pode ser uma estratégia alternativa, pois detém o início da resposta inflamatória aguda ao MSU, entretanto ela não resolve o problema em si. Considerando as terapias anti-inflamatórias e estratégias alternativas, o peptídeo P140 é capaz de atuar (modulando células do sistema imunológico e a autofagia celular), apresentando efeitos benéficos para o tratamento do Lúpus, também uma doença inflamatória crônica. Assim, o presente trabalho tem como objetivo principal avaliar os efeitos do tratamento com o peptídeo P140 no modelo experimental murino de gota. Pode-se observar que ambas estratégias (pré e pós-tratamento) com o peptídeo sintético P140 reduziram o recrutamento de neutrófilos para a cavidade articular, a hipernocicepção (dor) e a lesão tecidual nos joelhos dos camundongos tratados e estimulados com injeção intra-articular de MSU. Para investigar melhor os mecanismos envolvidos, avaliamos *in vitro*, a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em macrófagos estimulados com MSU. Macrófagos derivados de medula óssea (BMDM) estimulados com o peptídeo P140 apresentaram menor produção de ROS, quando comparados com aqueles que não receberam o tratamento, sugerindo menor ativação do complexo de proteína inflamassoma. Em todos os experimentos utilizamos também como controle do peptídeo P140 o peptídeo truncado sC140, afim de melhor elucidar os mecanismos de ação do P140. Sendo assim, concluímos que o tratamento com o peptídeo P140 apresentou efeitos imunomoduladores importante no modelo de gota experimental, sugerindo ser uma estratégia terapêutica interessante para o tratamento desta patologia.

Palavras-chave: Gota, Peptídeo, Inflamassoma, Inflamação, Autofagia

ABSTRACT

Gout is a chronic inflammatory disease caused by the deposition of monosodium urate (MSU) crystals in joints, triggering an inflammatory response marked by increasing neutrophils in joints, inflammasome-dependent autophagy activation, and increase of hyperalgesia. The gout prevalence has grown, and this pathology does not have any effective treatment. Anti-inflammatory therapy is the most used strategy because it can stop at the beginning of acute MSU inflammatory response; however, it does not solve the problem. The P140 peptide can modulate the immune system and the autophagy response, presenting beneficial effects in lupus treatment, also a chronic inflammatory disease. Thus, the present work aims to elucidate the P140 treatment effects in a mice model of gout. Both therapeutic strategies, pre and post-treatment, decreased the neutrophil recruitment in joints, the hypernociception, and the tissue injury in the treated mice. To better investigate the pathways and mechanisms involved, we evaluate in vitro the species reactive oxygen (ROS) production from macrophages stimulated with MSU. The P140 treatment group shows decreased ROS production than the no-treatment group, suggesting a minor inflammasome activation in these cells. In all experiments, we use a control peptide named sC140 to clarify the P140 mechanisms. Therefore, we conclude the P140 treatment shows immunomodulatory effects in this mice model of gout, and this suggests this peptide be an attractive therapeutic strategy to treat this pathology.

Keywords: Gout, Peptide, Inflammasome, Inflammation, Autophagy.

LISTA DE FIGURA

Figura 1 – Inflamassoma no contexto da gota.	18
Figura 2 – Peptídeo P140 e sC140.....	21
Figura 3 – Atuação do Peptídeo P140.....	23
Figura 4 – Delineamento experimental dos grupos tratados.	28
Figura 5 – Delineamento experimental dos grupos	29
Figura 6 – Metodologia de Lavado da cavidade articular.....	30
Figura 7 - Foto do equipamento utilizado no teste de pressão crescente na pata de camundongo.	33
Figura 8 – Pré-tratamento com P140 induz uma redução de células inflamatórias na cavidade articular afetada pelo MSU	35
Figura 9 – O pré-tratamento com P140 reduz a inflamação articular promovida pela injeção de MSU.....	36
Figura 10 – Pré-tratamento com o P140 induz ao aumento da nocicepção.	37
Figura 11 – Visualização macroscópica dos joelhos tratados dos animais.....	38
Figura 12 - Pré-tratamento com P140 não induziu uma redução de células inflamatórias sistêmicas após o desafio com MSU	39
Figura 13 – Redução da concentração de ROS em relação aos tratamentos de macrófagos in vitro.....	40
Figura 14 – Pré-tratamento diminui a concentração de IL-1 β no tecido periarticular dos animais.	41
Figura 15 – Pós-tratamento reduz neutrófilos na cavidade periarticular.....	42
Figura 16 – Pós-tratamento demonstrou redução de neutrófilos na cavidade articular.	43
Figura 17 – Pós-tratamento com o peptídeo P140 induziu a redução de nocicepção nos animais tratados.....	44
Figura 18 – Jelhos induzidos a gota utilizando MSU dos animais pós-tratados.....	45
Figura 19 – O tratamento com P140 não demonstrou diferença significativa no número de neutrófilos apoptóticos na cavidade articular dos animais.....	46
Figura 20 – Pós-tratamento com o peptídeo levou a diminuição da concentração de IL-1 β no tecido periarticular dos animais.....	47
Figura 21 – Regulação da autofagia CMA pelo peptídeo P140.....	51
Figura 22 – Resultados compilados do uso do peptídeo P140 no modelo de gota.	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINEs - Anti-inflamatórios não esteroidais
BMDM - Macrófagos derivados de medula óssea
Casp1 - Caspase-1
CEUA - Comissão de ética no uso de animais
CMA - Autofagia mediada por chaperonas
EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
FDS - Food and Drug Administration
FFA - Ácidos graxos livres de cadeia longa
Hsc70 - Proteínas chaperonas heat-shock 70
IgM - Imunoglobulina M
IL-6 - Interleucina 6
IV - Via intravenosa
LMI - Laboratório de Microbiota e Imunomodulação
MSU - Monourato de sódio
NETs - Armadilhas extracelulares dos neutrófilos
NK - Células natural killer
PRRs - Receptores de reconhecimento de padrões
ROS - Espécie reativa de oxigênio
SCFA - Ácidos graxos de cadeia curta
TLR - Receptores do tipo Toll-like

Sumário

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 Aspectos gerais.....	13
1.2 Epidemiologia	14
2. Sistema Imunológico e Gota	14
2.1 Inflamassoma no contexto da Gota.....	16
3. Tratamentos medicamentosos para Gota	18
4. Peptídeo P140	20
4.1 Aspectos gerais.....	20
4.2 Atuação do Peptídeo.....	21
5. Justificativa	25
6. Objetivo Geral	26
6.1 Objetivos específicos.....	26
7. MATERIAIS E MÉTODOS	27
7.1 Peptídeo P140 e Peptídeo sC140.....	27
7.2 Animais Experimentais	27
7.3 Indução à Gota	28
7.4 Tratamento	28
7.5 Delineamento Experimental	29
7.6 Análise dos parâmetros inflamatórios	29
7.7 Processamento tecidual para dosagem de citocinas	31
7.8 Dosagem de Citocinas: Ensaio Imunoenzimático (ELISA)	31
7.9 Coleta e processamento histológico do joelho	32
7.10 Avaliação de Hipernocicepção – teste de pressão crescente na pata do camundongo.....	32
7.11 Cultura de macrófagos derivados da medula óssea (BMDM).....	33
7.12 Análise Estatística	34
8. RESULTADOS	35
8.1 P140 induziu a redução de células totais, em especial neutrófilos, na cavidade articular dos animais que foram desafiados com MSU	35
8.1.1 Pré-tratamento com P140 induziu a redução dos níveis de nocicepção	36
8.1.2 P140 não altera os níveis de células inflamatórias sistêmicas.....	38
8.1.3 O pré-tratamento com o peptídeo P140 induziu redução de ROS nas células tratadas e estimuladas com MSU in vitro	39
8.1.4 O pré-tratamento com o peptídeo P140 induziu a uma redução de IL-1 β no tecido periarticular.....	40

9. Avaliar o efeito da pós-administração do peptídeo P140 na resposta inflamatória induzida pelo MSU no modelo experimental murino de gota.....	41
9.1 O pós-tratamento com o peptídeo levou a redução de neutrófilos na articulação afetada pelo MSU.....	41
9.2 O pós-tratamento com o peptídeo levou a redução dos níveis de nocicepção dos animais.	43
9.3 Pós-tratamento com P140 não interferiu com o nível de neutrófilo apoptótico na cavidade articular.....	45
9.4 Pós-tratamento levou a redução de IL-1β no tecido periarticular dos animais	46
10. DISCUSSÃO	48
11. REFERÊNCIAS	56
12. ANEXO 1 – Certificado CEUA (COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS)	69

1. INTRODUÇÃO

Gota

1.1 Aspectos gerais

A artrite gotosa é uma doença conhecida a muito tempo pela sociedade humana, na civilização egípcia, em 2640 a.C, ela já era citada como “podagra”. Foi reconhecida também por Hipócrates no século V a.C e suas percepções clínicas naquela época ainda se fazem verdade nos dias atuais. Além disso, foi Hipócrates que observou a profunda relação entre a gota com o estilo de vida e dieta das pessoas que sofriam dessa mal, estando relacionada, naquela época, com o estilo de vida das pessoas ricas (NUKI; SIMKIN, 2006; SCHWARTZ, 2006).

Seis séculos após a descoberta de Hipócrates, Galeno foi o primeiro a descrever os tofos e associou a doença a fatores genéticos, mas também, a um estilo de vida de libertinagem e falta de controle próprio. Ainda nessa época, a doença era denominada como “podagra”, o primeiro a utilizar a nomenclatura “gota” foi o monge Randolphus de Bocking entre os anos de 1197- 1258. Esse termo deriva do latim *gutta* e tem relação com o que se acreditava na época, que no ser humano haviam quatro humores, quando equilibrados mantinham a boa saúde, mas em certas circunstâncias estes fluíam para as articulações e causavam inflamação e dor (NUKI; SIMKIN, 2006).

A gota, durante muito tempo, foi associada como “doença dos reis” pois estava ligada a alimentos ricos em proteína e ao consumo excessivo de álcool, algo que só era possível aos cidadãos de classe alta (BRZEZIŃSKA *et al.*, 2021). Logo, durante muito tempo ela era uma doença desejada, pois associava o doente a esse tipo de vida com mordomias, ela elevava o status de quem a tinha (NUKI; SIMKIN, 2006). Nos dias atuais, em que se entende a respeito da doença, é visto que ela tem se alastrado principalmente devido ao estilo de vida ocidental, o excesso de purina na dieta presente em alimentos derivados de carne, frutos do mar e cerveja, demonstra claramente a diferença entre países ocidentais e orientais em números de pessoas acometidas pela doença (BRZEZIŃSKA *et al.*, 2021; KUO *et al.*, 2015; NUKI; SIMKIN, 2006).

Um grande causador da inflamação e da dor local são os cristais de MSU, que são formados a partir do ácido úrico em excesso. Estudos feitos por Freudweiler em 1898 demonstrou que a injeção intra-articular de cristais de MSU levavam a formação de tofos locais, sendo um dos primeiros experimentos desse tipo conhecido (FREUDWEILER; BRILL; MCCARTY, 1965; NUKI; SIMKIN, 2006). O ácido úrico em excesso no organismo

é o grande causador da formação dos cristais de MSU que se depositam nas articulações, esse depósito gera a inflamação local e a dor. E o grande fator que gera esse excesso de ácido úrico corporal é a dieta (CHOI *et al.*, 2009; SO, ALEXANDER K.; MARTINON, 2017).

Ácidos graxos livres de cadeia longa (FFA) estão presentes na dieta e são responsáveis, além do MSU, em fazer parte do sinal 1 do início da formação do inflamassoma e reconhecimento do MSU pelos macrófagos residentes no tecido periarticular (JOOSTEN *et al.*, 2010; YAN *et al.*, 2013). Foi demonstrado que o acetato, que faz parte dos ácidos graxos de cadeia curta (SCFA), tem o papel contrário em relação ao FFAs, ele também se liga aos receptores do sinal 1 dos macrófagos, entretanto, tem o papel de modular a inflamação e a produção de IL-1 β (SO, ALEXANDER K.; MARTINON, 2017; VIEIRA *et al.*, 2017).

1.2 Epidemiologia

A gota é a artrite mais comum no mundo, estima-se que 1,4 mulheres e 4,0 homens a cada 1.000 pessoas sofrem de gota (REES; HUI; DOHERTY, 2014; YIN; LIU; WANG; *et al.*, 2020)

A prevalência da gota em adultos é de 3,2% no Reino Unido, sendo 5,2% em homens e 1,3% em mulheres, 3,9% em adultos no Estados Unidos, sendo 5,2% em homens e 2,7% nas mulheres, e 3,8% em Taiwan sendo 5,2% nos homens e 2,3% nas mulheres. Pode-se perceber que há uma maior prevalência da doença em homens adultos (COX *et al.*, 2021; DALBETH; MERRIMAN; STAMP, 2016; KUO *et al.*, 2015).

Em relação aos outros países, os dados que existem mostram que 1-2% dos adultos de países desenvolvidos tem a chance de desenvolver gota devido ao estilo de vida sedentário que muitos desenvolvem, além disso a dieta influencia diretamente como fator de risco assim como fatores genéticos (KUO *et al.*, 2015; VAPRATH KUNIYIL *et al.*, 2021; YIN; LIU; WANG; *et al.*, 2020). Além do estilo de vida e de fatores genéticos, a gota também está associada a idade, acometendo em maior número em pessoas mais velhas em relação aos mais jovens (YIN; LIU; WANG; *et al.*, 2020).

2. Sistema Imunológico e Gota

A gota é uma artrite inflamatória caracterizada pela inflamação das articulações. O processo patológico envolve tanto o sistema imune inato quanto o adaptativo. O desenvolvimento da gota se dá na presença de cristais de MSU que servem como um sinal de perigo para o sistema imune e levam a produção de citocinas e a expressão de moléculas

efetoras (CHEN, JUNWEI *et al.*, 2017; ZHU, YANYAN; PANDYA; CHOI, 2011). O aumento do nível de ácido úrico leva a deposição de MSU nas articulações e o MSU adverte o sistema imune convocando suas células de proteção, ativando o sistema inato e adaptativo. O MSU causa danos ao redor do tecido da articulação, as células do sistema inato – monócitos, mastócitos e neutrófilos – envolvem estes danos, o que leva a forma aguda da doença (CHEN, JUNWEI *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2021).

Um fator importante que gera inflamação na gota são as imunoglobulinas que se ligam ao MSU. A imunoglobulina M (IgM) adere ao MSU e leva a deposição desse cristal nas articulações, de uma maneira dose dependente. Além dela a IgG, em humanos, também se liga ao MSU. Logo, as Igs estão fortemente relacionadas com a deposição de MSU nas articulações afetadas (CHEN, JUNWEI *et al.*, 2017; KANEVETS *et al.*, 2009; SHI, YAN; MUCSI; NG, 2010; T; P; HR, 1984).

O MSU é reconhecido diretamente pelas células via receptores do tipo Toll-like (TLR), que são os principais receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) e dão o sinal de perigo para o sistema imune após entrar em contato com o MSU. O MSU é então reconhecido via PRRs, TLR2 e 4 e adaptador de superfície celular CD14, após ser reconhecido há ativação de Myd88 que leva a secreção de citocinas pró-inflamatórias e ao recrutamento de neutrófilos (BUSSO; SO, 2010; CHEN, JUNWEI *et al.*, 2017; SHI, YAN; MUCSI; NG, 2010).

Em relação a patologia, primeiramente os macrófagos locais são ativados pelo MSU, após isso há o recrutamento dos monócitos da circulação. Os monócitos são recrutados, entram no tecido da articulação e tem a função de interagir diretamente com o MSU, reconhecendo-o e iniciando a resposta aguda. Os monócitos, quando em contato com o MSU, se ativam e passam a liberar citocinas pró-inflamatórias como interleucina 6 (IL-6), IL-8, IL-18, TNF- α e IL-1 β (GUERNE *et al.*, 1989; LIU; AUPPERLE; TERKELTAUB, 2001). A IL-1 β é a principal citocina que causa toda a inflamação da gota (MARTINON *et al.*, 2006), estudos demonstram que o MSU leva a ativação do inflamassoma-NLRP3, via ativação da Caspase-1 (Casp1), levando a produção de IL-1 β e ao influxo de neutrófilos para o local acometido, o que sustenta a inflamação local nas articulações afetadas (CHEN, JUNWEI *et al.*, 2017; MARTINON; TSCHOPP, 2004).

Em estudos com animais deficientes em NLRP3, macrófagos não conseguiam produzir IL-1 β após a exposição a MSU e ocorria uma dificuldade no recrutamento de neutrófilos para o local da inflamação. Isso sugere que o NLRP3 é parte importante da resposta imune inata, sendo o inflamassoma eficaz no controle da inflamação na gota. Logo,

interações entre MSU, sistema imune inato e PRRs levam a inflamação inata na doença da gota (CHEN, JUNWEI *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2021).

Quando os neutrófilos, que já estão presentes nas articulações, entram em contato com o MSU, eles se ativam. Além disso, há também o influxo de neutrófilos para a articulação gerado pela liberação de IL-1 β . Estas células expressam NF- κ B e AP-1 (fator de transcrição para citocinas pro inflamatórias) que levam a formação de IL-1 β , TNF- α , IL-6, CXCL-8 e ciclo-oxygenase 2 (CHEN, JUNWEI *et al.*, 2017; LIU; AUPPERLE; TERKELTAUB, 2001).

Outro papel importante dos neutrófilos na patologia é a liberação de armadilhas extracelulares dos neutrófilos (NETs), foi visto que estas são responsáveis no auxílio da resolução da inflamação na gota aguda. Os NETs tem a formação dependente de ROS e, uma vez formados, esses aglomerados conseguem, rapidamente, degradar uma gama de citocinas pró-inflamatórias. Estudos demonstraram que a inibição da formação de NETs levam a piora do quadro inflamatório localizado de animais submetidos a formação da gota (DESAI *et al.*, 2016; SCHAUER *et al.*, 2014; SO, ALEXANDER K.; MARTINON, 2017).

Outras células imunes presentes no contexto da inflamação da gota são os mastócitos, que costumam aparecer no início da inflamação, e são capazes de secretar IL-1 β e de ativar inflamassoma-NLRP3, e as células natural killer (NK) que são achadas em pessoas com caso agudo da doença. Além disso, há um maior número de NK nas articulações de pessoas com gota do que outras células do sistema imune (CHEN, JUNWEI *et al.*, 2017; EMPSON; MCQUEEN; DALBETH, 2010).

2.1 Inflamassoma no contexto da Gota

Inflamassoma são complexos de multiproteínas citosólicas que iniciam a resposta inflamatória. Esse complexo precisa de estímulos diferentes para ser formado e funcionar da maneira correta. O MSU serve como um estímulo para os macrófagos residentes da articulação, quando fagocitados ele leva a ruptura do fagossomo e essa ruptura serve de estímulo para a montagem e ativação do inflamassoma (BUSSO; EA, 2011; KLÜCK *et al.*, 2020; SO, ALEXANDER K.; MARTINON, 2017).

O primeiro sinal ocorre quando o MSU é reconhecido pelo receptor de membrana do macrófago, residente da articulação, PRR ou TLR2/4, a partir desse reconhecimento há ativação da via de sinalização do Myd88, que leva a ativação do fator de transcrição NF- κ B liberando pró-IL-1 β , pró-IL-18 e componentes necessários para a montagem e ativação do inflamassoma, como o NLRP3, para o citosol celular. Após esse primeiro reconhecimento, quando o MSU é fagocitado, ele leva a ruptura do fagossomo, e essa ruptura ativa ROS

mitocondrial, leva a liberação de catepsinas, ao influxo de cálcio e efluxo de potássio e cloreto. O influxo de cálcio e efluxo de potássio, juntamente com o ROS mitocondrial ativam NLRP3, que havia sido liberado no primeiro sinal. O efluxo de cloreto ativa ASC e a junção de NLRP3-ASC levam a ativação de Casp1 e sua posterior junção, formando então o complexo proteico inflamassoma-NLRP3-Casp1 (Figura 1) (BUSSO; EA, 2011; GHAEMI- OSKOUIE; SHI, 2011; SO, ALEXANDER K.; MARTINON, 2017).

Com a formação do inflamassoma e sua ativação, ocorre a quebra de pró-IL-1 β em IL- β e pró-IL-18 em IL-18 e liberação destas citocinas, principalmente IL-1 β , que é a principal responsável pela inflamação na gota. Ela tem o papel de vasodilatação e recrutamento de células do sistema imune para o local afetado (GHAEMI-OSKOUIE; SHI, 2011; KLÜCK *et al.*, 2020; SO, ALEXANDER K.; MARTINON, 2017).

O resultado da ativação do inflamassoma é a morte celular por piroptose, ela ocorre devido a ativação de Casp1 que leva a clivagem de gasdermina D, essa clivagem gera poros na membrana celular alterando a sua integridade e assim levando a morte celular. A piroptose auxilia na liberação das citocinas inflamatórias como IL-1 β , levando ao aumento da inflamação local (SO, ALEXANDER K.; MARTINON, 2017; WEBER *et al.*, 2020).

Além disso, o aumento da citocina IL-1 β leva a um ambiente pró-inflamatório, sendo essa uma resposta fisiológica corporal para o combate a infecções e para a restauração de tecidos. Entretanto, o excesso dessa citocina leva a degradação da cartilagem e do osso do local afetado pelo MSU. Esta citocina se liga ao receptor de IL-1 das células sinoviais e levam, através de via de sinalização de MyD88, a liberação de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, que amplificam o recrutamento de células inflamatórias do sistema imune e a inflamação localizada, além disso, a nível sistêmico a IL-1 β causa febre por atuar diretamente na regulação de temperatura corporal feita pelo hipotálamo (CHEN, CHUN-JEN *et al.*, 2006; DINARELLO, 2010; SO, ALEXANDER K.; MARTINON, 2017).

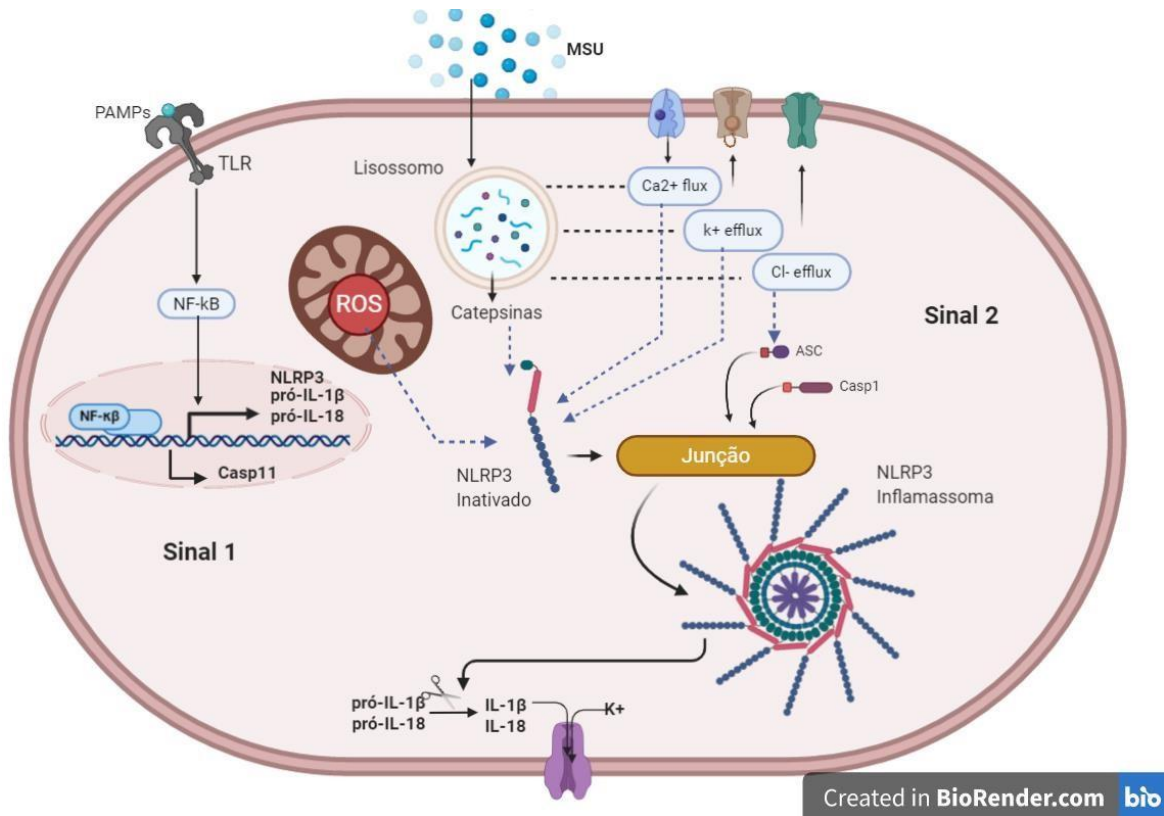


Figura 1 – Inflamassoma no contexto da gota.

Primeiro e segundo sinal, demonstrando as vias de sinalização que levam a ativação do inflamassoma e posterior liberação de citocinas pró-inflamatórias nas articulações afetadas pelo ácido úrico. Adaptado (GHAEMI-OSKOUIE; SHI, 2011), Criado por BioRender.com.

3. Tratamentos medicamentosos para Gota

As drogas utilizadas para tratamento de doenças autoimunes, como a gota, geralmente visam a imunossupressão do doente, alterando todo o sistema imunológico sem diferenciar aquilo que faz bem e o que faz mal a pessoa doente. Esse tipo de medicamento traz prejuízos, a longo prazo, para aqueles que os consome (BONAM; WANG; MULLER, 2018; VARDANYAN; HRUBY, 2016).

Logo, o manejo de pacientes com gota é um desafio para a medicina, a maioria dos médicos tratam o paciente apenas quando este apresenta a gota no seu estado ativo, ou seja, quando ele está em crise com dores, inflamações localizadas e inchaço. A falta de entendimento dos profissionais de saúde sobre o correto manejo do paciente, com orientações para melhor alimentação e hábitos de vida que levariam a diminuição do ácido úrico e, conseqüentemente, do MSU, na grande maioria das vezes, não ocorre e os pacientes ficam à mercê de tratamentos apenas durante crise (RAI *et al.*, 2018; STAMP; DALBETH, 2018). Estudos mostraram que o tratamento individualizado dos paciente leva a diversas melhorias como maior adesão ao tratamento e uma diminuição da concentração de ácido úrico após dois

anos de tratamento, quando comparados com o grupo que fez o tratamento habitual (DOHERTY *et al.*, 2018; STAMP; DALBETH, 2018).

Um dos medicamentos utilizados atualmente para o tratamento de gota é o Alopurinol. Ele tem a função de reduzir a concentração de ácido úrico corporal, e um medicamento alternativo com este mesmo fim é o Febuxostase, este medicamento apresenta maior atividade hipouricêmica em relação ao Alopurinol. Ambos medicamentos, mas principalmente Febuxostase, apresentam risco potencialmente aumentado de morte cardiovascular, segundo a Food and Drug Administration (FDA) como efeito adverso de seu uso (STAMP; DALBETH, 2018; WHITE *et al.*, 2018).

Outro tipo de tratamento muito utilizado em casos de crise de gota são anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), voltados para o melhoramento da dor causada pela doença (MUNSTER *et al.*, 2002; WANG, XIANG; WANG, 2019). São muito utilizados a Colchicina e os Glucocorticoides. Esses medicamentos inibem a síntese de prostaglandinas através inibição das enzimas ciclo-oxigenases (COX-1 e COX-2), o que leva a uma diminuição da inflamação (WANG, XIANG; WANG, 2019; WOESSNER; CASTELLS, 2013). Entretanto, essa classe de medicamentos é muito conhecida por causar reação de hipersensibilidade, reações anafiláticas, reações cutâneas, diarreia, náuseas, vômitos e outras complicações ligadas a resposta imune da pessoa que utiliza esta classe de medicamentos (RODDY; DOHERTY, 2013; TELES *et al.*, 2017; WOESSNER; CASTELLS, 2013).

Também são utilizados, em último caso, corticoides. Corticoides são hormônios esteroides naturalmente produzidos no córtex adrenal a partir do colesterol (CHROUSOS, 2009; KIMURA *et al.*, 2000). O objetivo de sua produção farmacêutica é potencializar sua ação anti-inflamatória. São lipofílicos, entram dentro das células e se ligam a receptores específicos, interagindo assim com o núcleo celular. Eles são capazes de suprimir ou ativar partes do DNA responsáveis por genes que regulam mediadores da inflamação e citocinas (ALSAEID; MAJEED, 1998; CHROUSOS, 2009). São medicamentos classificados em relação a duração da sua ação no organismo, sendo os medicamentos de ação curta: cortisona, hidrocortisona (suprimem o ACTH por 8 a 12 horas) (KIMURA *et al.*, 2000). Ação média: prednisona, prednisolona, metilprednisolona e triancinolona (suprimem o ACTH por 12 a 36 horas). E ação longa: dexametasona e betametasona (suprimem ACTH por 36 a 72 horas) (BUTTGEREIT; WEHLING; BURMESTER, 2004).

Corticoides interferem na circulação de células imunes, reduzem neutrófilos periféricos, inibem acúmulo de neutrófilos em locais e inflamação, promovem apoptose de células linfóides, modulam a função das células B, inibem a ação da histamina, a síntese de

prostaglandinas e a ação dos ativadores do plasminogênio, entre outras funções (ALSAEID; MAJEED, 1998; BUTTGEREIT; WEHLING; BURMESTER, 2004). A curto prazo o uso de corticoides traz um conforto e melhora para o doente, mas a longo prazo trazem diversos malefícios como perda de massa óssea, risco de problemas oculares e, por diminuir a resposta imunológica daqueles que utilizam, sua utilização precisa ser antes bem estudada (FAUCI, 1983; RODDY; DOHERTY, 2013).

Portanto, alternativas para o uso destes medicamentos são aguardadas pelo mercado farmacológico, principalmente medicamentos que não causem nenhum, ou poucos, efeitos colaterais (BONAM; WANG; MULLER, 2018).

4. Peptídeo P140

4.1 Aspectos gerais

O peptídeo P140 é um fragmento de 21-*mer* da pequena proteína ribonucleoproteína nuclear U1-70K spliceossômica, sendo *Mer* uma medida de comprimento do seu primer, utilizada para medir o número total de nucleotídeos presentes nas sequências dos primers desenhados. Este peptídeo contém um resíduo de fosfoserina na posição 140, que é adicionado quimicamente durante a síntese do peptídeo. Posteriormente, viu-se que essa modificação pontual era semelhante a modificação pós-transcricional natural específica da apoptose da proteína que ocorre especificamente em um estágio inicial da apoptose, antes da clivagem do C-terminal e da desfosforilação de outros resíduos de serina (figura 2) (PAGE *et al.*, 2011; WILHELM *et al.*, 2018).

A sequência do peptídeo P140 foi muito conservada durante a evolução, além disso, P140 interage, seletivamente, com a proteína constitutiva Hsc70/Hsc73 heat shock e também com o MHCII de humanos e camundongos (PAGE *et al.*, 2011; WILHELM *et al.*, 2018).

Como controle do peptídeo em teste foi feito também um peptídeo misturado (scrambled peptide) denominado sC140 (figura 2). Ele é utilizado como forma de tratamento para demonstrar que o que leva aos benefícios é a posição da fosforilação no P140 (PAGE *et al.*, 2011; WILHELM *et al.*, 2018).

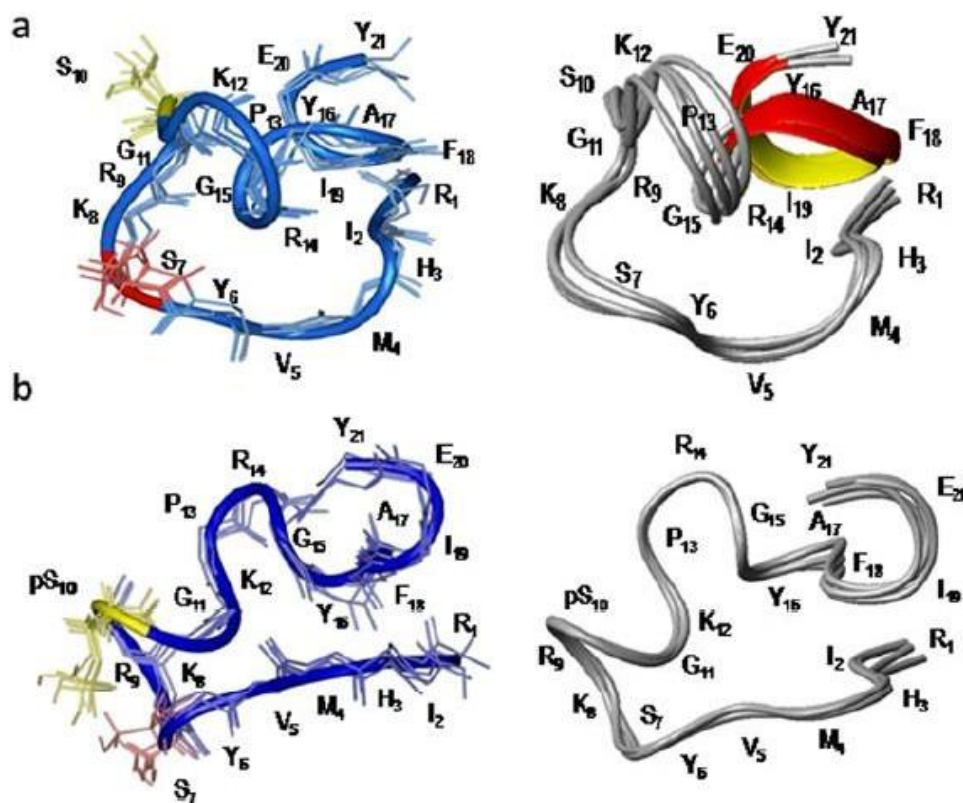


Figura 2 – Peptídeo P140 e sC140.

Espectroscopia por ressonância magnética nuclear (NMR) representando os peptídeos sC140 (a) e P140 (b) (PAGE *et al.*, 2009).

4.2 Atuação do Peptídeo

O peptídeo P140 é um inibidor de autofagia, em estudos feitos com camundongos e humanos com lúpus foi visto que ele entra nas células B, via processo de endocitose dependente da Cavidade de Clatrina, e se estabelece nos lisossomos. Nessas células o peptídeo tem o principal efeito de reduzir a superexpressão de MHCII e na regulação negativada maturação da célula em plasmócito (MACRI *et al.*, 2015; WANG, FENGJUAN *et al.*, 2020; WILHELM *et al.*, 2018).

Em relação a autofagia, P140 atua na autofagia CMA. Este tipo autofágico está associado a alterações nos lisossomos em número, tamanho e pH aumentados. Entretanto, com o uso de P140, essas alterações lisossomais não foram mais observadas (WANG, FENGJUAN *et al.*, 2017; WILHELM *et al.*, 2018). Também foi possível observar que P140 age no processo de macroautofagia. A macroautofagia está relacionada com a formação dos plasmócitos e formação de células B de memória, o peptídeo tem uma regulação negativa na maturação da células de plasmócito, diminuindo a liberação de IgGs (WANG, FENGJUAN *et al.*, 2020; WILHELM *et al.*, 2018).

Em relação a ação da proteína Hsc70, proteína importante na autofagia CMA, P140 inibe Hsc70 de dobrar as proteínas desnaturadas e isto interrompe a interação de Hsc70 com as co-chaperonas, inibindo assim a autofagia por CMA (PAGE *et al.*, 2011; WANG, FENGJUAN *et al.*, 2017). Além disso, a partir de imagens de fluorescência foi possível visualizar que P140 se co-localiza com as proteínas Hsc70 na superfície e no interior das células T, B, monócitos e granulócitos, levando a sua regulação negativa. Hsc70 está relacionada com a degradação e apresentação de antígenos via MHCII, principalmente na doença de Lúpus. Como o peptídeo leva a inibição da atuação de Hsc70 ocorre, como consequência, a inibição da apresentação de antígenos via MHCII, diminuindo assim a presença de células T autorreativas, uma importante atuação deste peptídeo (figura 3) (MACRI *et al.*, 2015; PAGE *et al.*, 2011).

Foi demonstrado que o tratamento com o P140, que atualmente se encontra em estudo clínico de fase 3 para lúpus, diminui a superexpressão MHCII, de maneira dose dependente, em células de pacientes com lúpus (WALLACE, 2019). A mesma resposta não foi obtida tratando as células com o peptídeo controle sC140. Esse efeito não teve relação com a quantidade total de células, que não se alterou (WALLACE, 2019; WILHELM *et al.*, 2018). Esses resultados também foram confirmados em experimentos *in vitro*. Utilizando o tratamento controle sC140 não foi obtido o mesmo resultado (MACRI *et al.*, 2015; PAGE *et al.*, 2011).

P140 reduziu a expressão de MHCII em camundongos e pacientes com lúpus. Além disso, o peptídeo diminui a atividade de auto reatividade das células T humanas e murinas, pois foi visto que as células TCD4+ ativadas se proliferaram menos na presença de P140. Esses resultados sugeriram que a diminuição de TCD4+ seja uma consequência direta da diminuição da expressão de MHCII devido a redução da apresentação antigênica (figura 3) (WALLACE, 2019; WILHELM *et al.*, 2018). Esses eventos contribuíram para a diminuição da proliferação e diferenciação de plasmócitos secretores de autoanticorpos, diminuindo a mortalidade dos animais, como foi visto em camundongos com lúpus tratados com P140, quando comparados com os animais tratados apenas com salina ou tratados com sC140. Como há uma diminuição de plasmócitos, consequentemente há uma diminuição de IgG (MACRI *et al.*, 2015; WILHELM *et al.*, 2018).

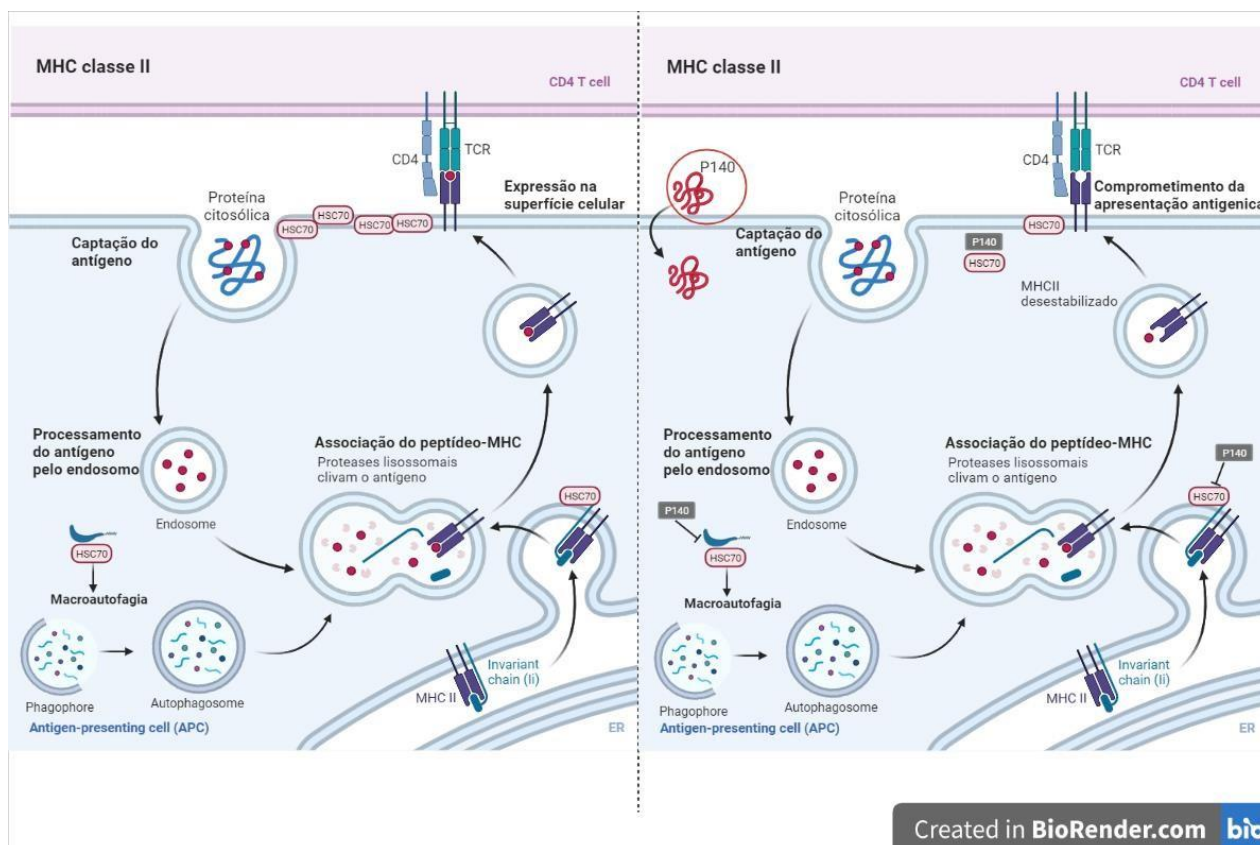


Figura 3 – Atuação do Peptídeo P140.

Atuação intracelular do peptídeo P140, demonstrando sua co-localização com a proteína Hsc70, o que faz com que haja diminuição da autofagia CMA e também desestabilização e comprometimento de apresentação antigênica via MHCII. Adaptado (PAGE *et al.*, 2009, 2011; WANG, FENGJUAN *et al.*, 2020; WILHELM *et al.*, 2018; ZIMMER *et al.*, 2013), Criado com BioRender.com.

O peptídeo P140, quando entra nas células B dos camundongos com lúpus, aumenta o acúmulo de marcadores de autofagia p62 e LC3-II, levando a um maior fluxo autofágico (PAGE *et al.*, 2011). O P140 se colocaliza com os lisossomos através da proteína Hsc70. Esta proteína está ligada a autofagia CMA por se ligar a Lamp2 da superfície dos lisossomos (BONAM; WANG; MULLER, 2018; ZHU, SHENG YU *et al.*, 2020).

Um dos muitos papéis da autofagia é regular a ativação do inflamassoma e controlar sua produção, processo e secreção das citocinas da família IL-1. As citocinas da família IL-1 são reguladoras chave das respostas do sistema imune inato e adaptativo (GARLANDA; DINARELLO; MANTOVANI, 2013; HARRIS, JAMES *et al.*, 2017; SO, ALEXANDER *et al.*, 2007). O balanço entre liberação de citocinas da família IL-1 e regulação do inflamassoma é crítico para manter a resposta imune saudável para muitos estímulos patogênicos pois evita-se inflamações crônicas inapropriadas que podem levar a doenças auto inflamatórias (HARRIS, JAMES *et al.*, 2017; RASHIDI *et al.*, 2019).

Estudos sugerem que a autofagia funciona como um mecanismo de feedback negativo que atenua os processos de inflamação (BIASIZZO; KOPITAR-JERALA, 2020; SHI, CHONG-SHAN *et al.*, 2012). Estudos de imagem confocal mostraram uma co-localização da ASC e da proteína lisossomal Lamp2, sugerindo que os inflamassomas ativos são marcados pelos autofagossomos e eventualmente destruídos pelos lisossomos (CAO *et al.*, 2019; HARRIS, JAMES *et al.*, 2017).

5. Justificativa

A gota é causada pela deposição de MSU nas articulações humanas, é uma doença que pode se tornar crônica e levar a uma debilitação severa (DALBETH *et al.*, 2019). Considerando essa cronicidade da doença, que tem evoluído mundialmente (KUO *et al.*, 2015), e que ainda não se exista tratamentos eficazes, esse trabalho visa demonstrar uma terapia alternativa, visto que as drogas disponíveis no mercado apresentam diversos efeitos colaterais que podem limitar a utilização nos pacientes acometidos pela patologia (LINDLER *et al.*, 2020).

Entender estratégias terapêuticas que tragam menores efeitos indesejados para os doentes se faz necessário, principalmente para que ocorra uma boa aceitação e uso do medicamento. Uma alternativa é o peptídeo sintético P140, que já vem sendo utilizado em testes clínicos fase 3 em pacientes com Lúpus (WALLACE, 2019; ZIMMER *et al.*, 2013). Já se sabe que esse peptídeo atua alterando o fluxo autofágico de células B e de células T, reduzindo a estabilidade o MHCII e, devido a isso, leva a uma menor apresentação de antigênica e posterior diminuição de autoanticorpos.

Considerando os mecanismos já demonstrados pelo peptídeo P140 na regulação de vias autofágicas e na redução da resposta imune em Lúpus, e uma vez que, as vias autofágicas possam atuar na regulação do inflamassoma, iremos investigar a participação do complexo inflamassoma no tratamento de gota com o P140, particularmente em neutrófilos e macrófagos.

6. Objetivo Geral

Avaliar o potencial terapêutico do peptídeo sintético P140 em um modelo experimental murino de Gota elucidando os mecanismos envolvidos nesse processo.

6.1 Objetivos específicos

6.1.1 Avaliar o efeito da pré-administração do peptídeo P140 na resposta inflamatória induzida pelo MSU no modelo experimental murino de gota avaliando o recrutamento celular na cavidade intra-articular, a produção de citocinas inflamatórias, a patologia e a nocicepção nos camundongos tratados *versus* não tratados

6.1.2 Avaliar o efeito da pós-administração (tratamento) do peptídeo P140 na resposta inflamatória induzida pelo MSU no modelo experimental murino de gota avaliando o recrutamento celular na cavidade intra-articular, a produção de citocinas inflamatórias, a patologia e a nocicepção nos camundongos tratados *versus* não tratados

6.1.3 Elucidar o papel do P140 na ativação do complexo de proteínas inflamassoma *in vitro* em macrófagos, através da produção de ROS e produção de IL-1 β

6.1.4 Elucidar o papel do P140 na ativação do complexo de proteínas inflamassoma *in vivo* no modelo de gota através da produção de IL-1 β

7. MATERIAIS E MÉTODOS

7.1 Peptídeo P140 e Peptídeo sC140

Foram utilizados dois tipos do peptídeo, o peptídeo com a fosforilação na altura -140 P140, e o peptídeo controle truncado (mistura) sC140. Ambos se apresentavam em formato liofilizados e foram gentilmente cedidos pela Dr. Sylviane Muller, da Université de Strasbourg, França. Os peptídeos foram ressuspensos em água Mili-Q a uma concentração de 10mg/ml e após isso diluídos 10X em salina. Cada animal recebeu 1 µg/ml do peptídeo.

7.2 Animais Experimentais

O presente estudo foi aprovado pelo comitê de ética em experimentação animal (CEUA) sob o protocolo de pesquisa número CEUA138/2020 (Anexo 1). Foram utilizados 50 camundongos C57BL/6 divididos em 5 grupos com 10 animais em cada grupo, os animais tinham 8 semanas, eram provenientes no Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), foram mantidos no biotério do departamento da Bioquímica e Imunologia, no ciclo claro-escuro de 12 horas e comida e água *ad libidum*.

O manejo dos animais foi realizado obedecendo às normas da ética animal em experimentação. Todos os experimentos foram realizados no departamento de Bioquímica e Imunologia no laboratório multiusuário LAMEX e no laboratório de Microbiota e Imunomodulação (LMI). Os 5 grupos foram denominados: MSU (gota), grupo pré-tratamento P140, grupo pré-tratamento sC140, grupo pós-tratamento PP140 e grupo pós-tratamento PsC140. Sendo então esse experimento dividido em dois grupos que foram tratados previamente a indução à gota, com ambos peptídeos, e dois grupos que foram tratados posteriormente a indução a gota (figura 4). Esses grupos foram duplicados, pois metade dos animais foram usados para a metodologia de Análise Histológica, sendo necessário a retirada total do joelho dos animais.

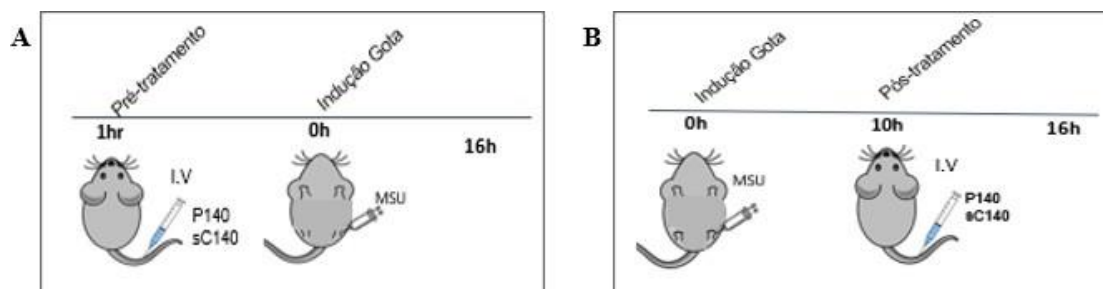


Figura 4 – Delineamento experimental dos grupos tratados.

Os animais foram divididos em grupos que foram pré-tratados com o peptídeo P140 e sC140 e após 1 hora houve a indução da gota com a utilização do MSU (A), e outros grupos foram induzidos a gota e pós-tratados com os peptídeos P140 e sC140 10 horas após o desafio com o MSU (B).

7.3 Indução à Gota

Para indução à gota 10 μ l com 100mg de cristais de MSU, feitos em colaboração com a aluna Izabela Galvão e descrito em sua tese (GALVÃO, 2015), foram introduzidos, com auxílio de uma agulha 30G e de uma seringa de 1mL, na região tibiofemoral do joelho direito dos camundongos, através de uma injeção intra-articular. A articulação contralateral foi utilizada como controle (injeção de veículo – PBS). Os camundongos foram anestesiados com uma mistura de cetamina 80 mg/kg e xilazina 15 mg/kg diluídos em PBS 1X para a realização da injeção. Essa indução foi feita no mesmo momento em todos os animais de todos os grupos e os parâmetros inflamatórios foram avaliados 16 horas após a injeção de cristais de MSU.

7.4 Tratamento

O grupo pré-tratamento recebeu os peptídeos P140 ou sC140 por via intravenosa (IV) 1 hora antes da indução da gota. O grupo pós-tratamento recebeu os peptídeos P140 ou sC140 IV 10 horas após a indução de gota por MSU. Após os tratamentos, esperou-se 16 horas e todos os animais foram eutanasiados utilizando anestesia com uma mistura de cetamina 80 mg/kg e xilazina 15 mg/kg diluídos em PBS 1X, após a anestesia fizemos a coleta de sangue a partir de um pequeno corte na base da cauda dos animais, realizamos o lavado da cavidade articular e recolhemos o tecido periarticular de ambos joelhos para análises de citocinas. Os animais separados para as análises histológicas do tecido periarticular do joelho tiveram toda a estrutura de seus joelhos removida e posteriormente tratadas para análise histológica do joelho tratado e não tratado, essa análise consiste em avaliação das estruturas afetadas e verificação da presença de infiltrado inflamatório no tecido periarticular.

7.5 Delineamento Experimental

Para compreender o papel do peptídeo P140 na patologia da gota foram utilizados camundongos C57BL/6 como modelo experimental para tratamento com o peptídeo. Como anteriormente descrito, foi utilizado o peptídeo como pré-tratamento, de maneira IV, e posteriormente foi induzido a gota no grupo de animais pré tratados (figura 5). No grupo pós-tratamento, primeiramente fizemos a indução da gota e posteriormente os animais foram tratados IV com o peptídeo P140 (figura 5).

Ao final do experimento, coletamos sangue dos animais a partir de um pequeno corte na base da cauda para esfregaço e análises de contagem celular, fizemos a coleta do lavado da cavidade intra-articular de ambos joelhos dos animais, coletamos o tecido periarticular dos joelhos e também fizemos a coleta de toda a estrutura do joelho para análise de histologia.

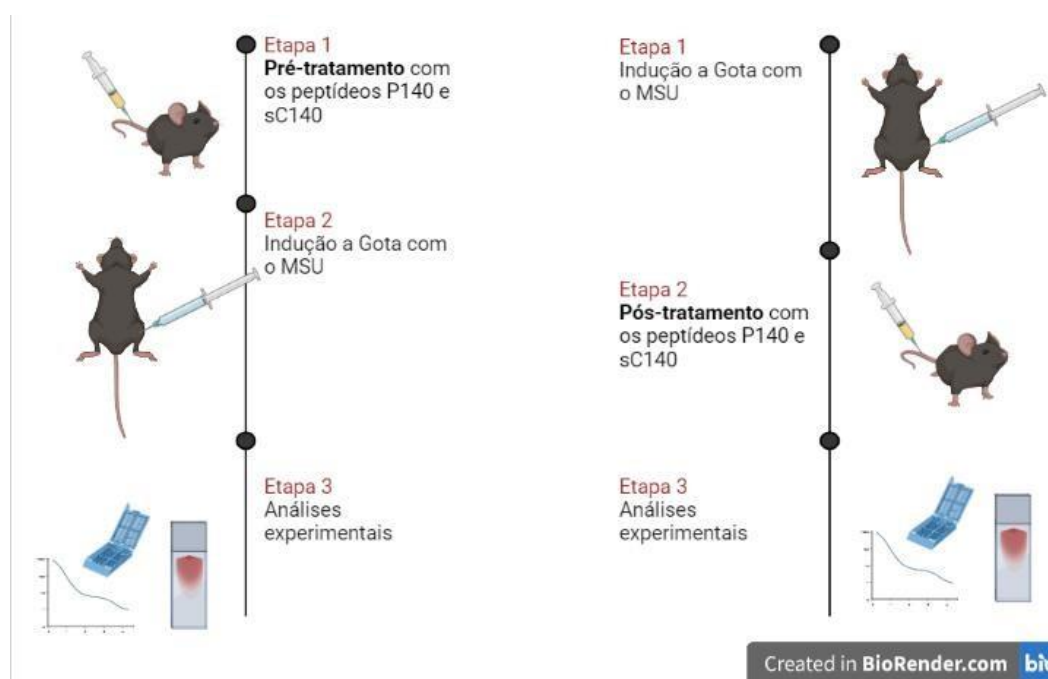


Figura 5 – Delineamento experimental dos grupos.

Os grupos foram divididos em dois, um foi pré-tratado com os peptídeos e posteriormente induzido a gota com o MSU. O outro grupo, primeiramente, foi induzido a gota e posteriormente foi pós-tratado com os peptídeos. Ambos foram eutanasiados, tiveram seu sangue, lavado intra-articular, tecidos dos joelhos e joelhos recolhidos ao mesmo tempo de experimento.

7.6 Análise dos parâmetros inflamatórios

7.6.1 Avaliação das células inflamatórias na cavidade articular

7.6.2 Contagem total e diferencial de células

Nós abrimos a cavidade articular dos joelhos dos camundongos, e com o auxílio de uma pipeta e de uma ponteira de 200 μ L fizemos o lavado dessas cavidades utilizando PBS contendo 3% de BSA (figura 6). Coletamos esse lavado e o utilizamos para contagem de células totais da cavidade articular. Alíquotas de 20 μ L do lavado foram diluídas em 20 μ L de solução Turk (IMBRALAB®), sendo a contagem total das células realizada em câmara de Neubauer, com o auxílio de microscópio óptico (aumento de 100x) e aplicativo telefônico de contagem de células (BloodDroid Cell Counter). O número total das células foi utilizado para o cálculo da porcentagem encontrados no lavado articular a partir da contagem/discriminação por visualização de lâminas preparadas por citocentrifugação utilizando o microscópio óptico, contávamos o total de células nas lâminas e discriminávamos qual porcentagem estava relacionado com qual tipo celular, com a ajuda do aplicativo telefônico (LORDÊLO VIVAS, 2012; PINHO *et al.*, 2007).

Para contagem diferencial, foram feitas análises da porcentagem de neutrófilos e monócitos de cada amostra e os resultados foram expressos como número de cada tipo celular x 10⁴/cavidade articular, baseando-se na contagem total de células.



Figura 6 – Metodologia de Lavado da cavidade articular.

Nessa ilustração podemos entender melhor como foram feitos os lavados da cavidade articular dos animais experimentais. Após a abertura local do joelho dos animais era feito o lavado com o auxílio de uma pipeta e uma ponteira de 200 μ L, o lavado era coletado e colocado em tudo eppendorfs de 1mL. Criado por BioRender.

7.6.3 Análise de apoptose de neutrófilos

A apoptose dos neutrófilos presentes no lavado articular dos animais desafiados com MSU, com ou sem os tratamentos, foi avaliada morfológicamente de acordo com o descrito anteriormente pelos autores GALVÃO *et al.*, 2019; SOUSA *et al.*, 2010; VAGO *et al.*, 2012. As células recuperadas da cavidade articular foram cito-centrifugadas, fixadas e coradas com Kit panótico rápido (LB Laborclin®) e contadas utilizando microscópio ótico para determinar

a porcentagem de células com morfologia apoptótica. As células apoptóticas foram identificadas por alterações morfológicas características como fragmentação nuclear e formação de corpos apoptóticos.

7.7 Processamento tecidual para dosagem de citocinas

De forma sucinta, os tecidos periarticulares dos joelhos foram removidos, pesados e processados com auxílio de um homogeneizador de tecidos (T 25 digital Ultra-turrax® - IKA - Staufen, Germany) com solução de extração de citocinas (NaCl 0,4M, NaPO₄ 10 mM, PMSF 0,1 mM, Cloreto de Benzetônio 0,1 mM, EDTA 10 mM, Tween 20 0,05%, 0,5% de BSA, 20 KI de Aprotinina) na proporção de 1mL por 100mg de tecido. Após homogeneização e centrifugação (10.000rpm 10 minutos a 4°C), o sobrenadante foi coletado e posteriormente mantido a -80°C para quantificação de citocinas.

7.8 Dosagem de Citocinas: Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

Foi adicionado anticorpo de captura de interesse diluído em PBS a uma placa de 96 poços. Essa placa foi incubada a 4°C por 12 a 18 horas. O conteúdo foi retirado e os poços lavados 5 vezes (300 µL/mL) com o tampão de lavagem (PBS/Tween 0,5 %). Foi adicionado 200 µL/poço de tampão de bloqueio (PBS/BSA 1 %) e a placa foi incubada por 2 horas a temperatura ambiente. O conteúdo foi retirado e os poços lavados 5 vezes (300 µL/mL) com o tampão de lavagem (PBS/Tween 0,5 %). Após isso, foi adicionado 100 µL/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 5 vezes (300 µL/mL) com o tampão de lavagem (PBS/Tween 0,5 %). Foram adicionados 100 µL/poço de anticorpo de detecção e a placa foi incubada por 2 horas a temperatura ambiente. O conteúdo foi retirado e a placa lavada 5 vezes com tampão de lavagem. Foram adicionados 100 µL/poço de estreptavidina – HRP 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 5 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 finalizar a reação, foram adicionados 50 µL/poço de solução de H₂SO₄ 1 M. A leitura foi realizada em leitor de ELISA em densidade ótica de 490 nm.

7.9 Coleta e processamento histológico do joelho

O joelho direito dos camundongos foram retirados, as estrutura foram adicionada em cassetes histológicos e acondicionadas por 48 horas em formol tamponado 10%. Em seguida, os cassetes foram transferidos para solução de EDTA (Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético) 14% (Marca: Synth) para descalcificação óssea por 30 dias, com a troca da solução a cada 2 dias para garantir a descalcificação (BUMA *et al.*, 2000; CENTER FOR SKELETAL RESEARCH, 2016). Em seguida, foi realizado o processamento rotineiro para inclusão em parafina. A microtomia resultou em amostras do joelho como um todo (cavidade articular e tecido ósseo) para posterior coloração por HE e avaliação histopatológica das estruturas afetadas (presença e classificação do tipo de infiltrado inflamatório; cicatrização patológica associada com perda de função).

7.10 Avaliação de Hipernocicepção – teste de pressão crescente na pata do camundongo

Os experimentos foram realizados utilizando o teste de pressão crescente utilizando o aparelho Anestesiômetro Eletrônico (Insight Equipamentos, São Paulo, Brazil), que consiste em um transdutor de pressão conectado a um contador digital de força (g). Este método também é conhecido como Von Frey eletrônico (ÄNGEBY MÖLLER; JOHANSSON; BERGE, 1998). O contato do transdutor de pressão à pata é realizado através de uma ponteira descartável de polipropileno com 0,5 ou 4,15 mm² de diâmetro que é adaptada a ele. Os animais são alocados em caixas de acrílico, medindo 12 x 10 x 17 cm cujo assoalho é uma rede de malha igual a 5 mm² constituída de arame não maleável de 1 mm de espessura, durante 15 minutos antes do experimento para adaptação ao ambiente. Espelhos foram posicionados à 25 cm abaixo das caixas de experimentação, para facilitar a visualização da região plantar das patas dos animais. O experimentador deve aplicar, por entre as malhas da rede, uma pressão linearmente crescente no centro da planta da pata do camundongo até que o animal produza uma resposta caracterizada como sacudida (“flinch”) da pata estimulada. Os estímulos foram repetidos por até seis vezes, em geral até o animal apresentar 3 medidas similares com uma clara resposta de “flinch” após a retirada da pata. Os testes nociceptivos foram realizados no período da manhã.

Os testes foram feitos antes da indução a gota por MSU e 16 horas após a indução, antes de finalizarmos o experimento. A intensidade da nocicepção medida foi quantificada como a variação na pressão (D de reação em gramas) obtida subtraindo a média dos 3 valores

de medidas similares, observados antes do tratamento, da média dos 3 valores de medidas similares observados após a administração dos peptídeos.

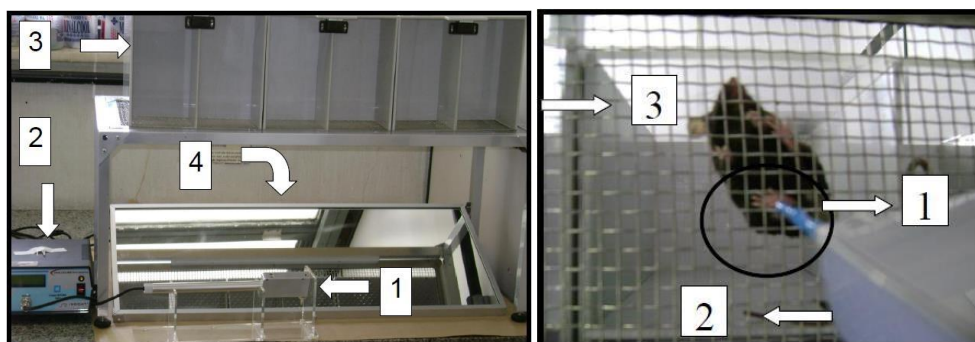


Figura 7 - Foto do equipamento utilizado no teste de pressão crescente na pata de camundongo.

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

7.11 Cultura de macrófagos derivados da medula óssea (BMDM)

Os camundongos C57/BL6 foram anestesiados e posteriormente eutanasiados por deslocamento cervical. Um corte na pele do abdome foi feito e a pele retirada do quadril para baixo (como uma “calça”). Os músculos da perna, mantendo o fêmur e a tíbia intactos, foram removidos e os ossos do fêmur foram separados da tíbia. Os ossos foram bem limpos, principalmente na parte da epífise, e colocados na placa de Petri, devidamente identificada e sobre o gelo.

Após a retirada de todos os ossos as epífises foram removidas através de um corte (sem quebrar os ossos). Com uma agulha de 24G acoplada a uma seringa de 5mL, foram inseridos 5 mL de meio DMEM completo (10% FBS, 20% LCCM) em cada osso, pelas 2 extremidades, fazendo leve e simultânea fricção, a fim de que houvesse total liberação das células da medula óssea. O meio que passou por dentro do osso foi coletado em um tubo de 50 mL (Falcon), fazendo assim um pool de células.

Para cada animal utilizado, distribuimos as suas células entre 4 placas de petri de cultura celular (com total de 20mL de meio por placa), e esse foi denominado o dia 0.

No dia 3 adicionamos mais 10mL de meio DMEM completo em cada placa de petri.

No dia 7 as células foram transferidas para placas de cultura de 24 poços. Retiramos o meio da placa de petri, desprendemos os macrófagos da placa utilizando 200µL de Tripsina-

EDTA por placa, passamos as células para um tubo de 50mL (falcon) e o centrifugamos durante 5min a 1500rpm em uma temperatura de 4°C para formação de um pellet. O sobrenadante foi desprezado e o pellet ressuspendido com meio DMEM completo. Fizemos a contagem celular em câmara de Neubauer, em uma diluição de 100X de células em Turk (IMBRALAB®). Por fim, os macrófagos foram divididos em placas de 24 poços num total de 4×10^4 células por poço.

No dia 8 os macrófagos foram estimulados com os tratamentos estipulados. Fizemos a retirada do sobrenadante e adicionamos DMEM incompleto (apenas o meio DMEM). As células foram estimuladas com 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LPS durante um período de 1 horas. Após esse período acrescentamos 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de MSU, aguardamos 10 minutos e tratamos as células com 25 mM dos peptídeos P140 e sC140. As células foram mantidas em estufa de CO₂ a 37 °C.

Aguardamos um intervalo de 6 horas, retiramos e armazenamos o sobrenadante em superfreezers à -80°C e coletamos e armazenamos as células também à -80°C.

7.12 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o software GraphPad Prism 8.0.2. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Os dados foram normalizados pelo teste Normality and Lognormality Tests, e a partir do teste de normalidade definimos o pós teste utilizado em cada experimento. A análise de diferença entre dois ou mais grupos foi realizado por 2way ANOVA seguido pelo pós-teste a depender do teste de normalidade, variando entre Tukey e Shapiro-Wilk.

A significância estatística foi estabelecida em $p < 0,05$.

8. RESULTADOS

8.1 P140 induziu a redução de células totais, em especial neutrófilos, na cavidade articular dos animais que foram desafiados com MSU

Os animais foram pré-tratados por via intravenosa, 1 hora antes do desafio com MSU, com o peptídeo P140 ou sC140 (1 µg/ml). O desafio com MSU levou a um aumento de células inflamatórias, com predominância de neutrófilos, na cavidade articular dos animais, comparados com os animais do grupo controle. Foi possível verificar que o pré-tratamento com o peptídeo levou a uma diminuição de células totais na cavidade articular (Figura 8A) e também diminuição na contagem de neutrófilos na cavidade articular (Figura 8B), e o tratamento com o peptídeo truncado não apresentou alteração no recrutamento de células comparado com os animais não tratados desafiados com MSU (Figura 8).

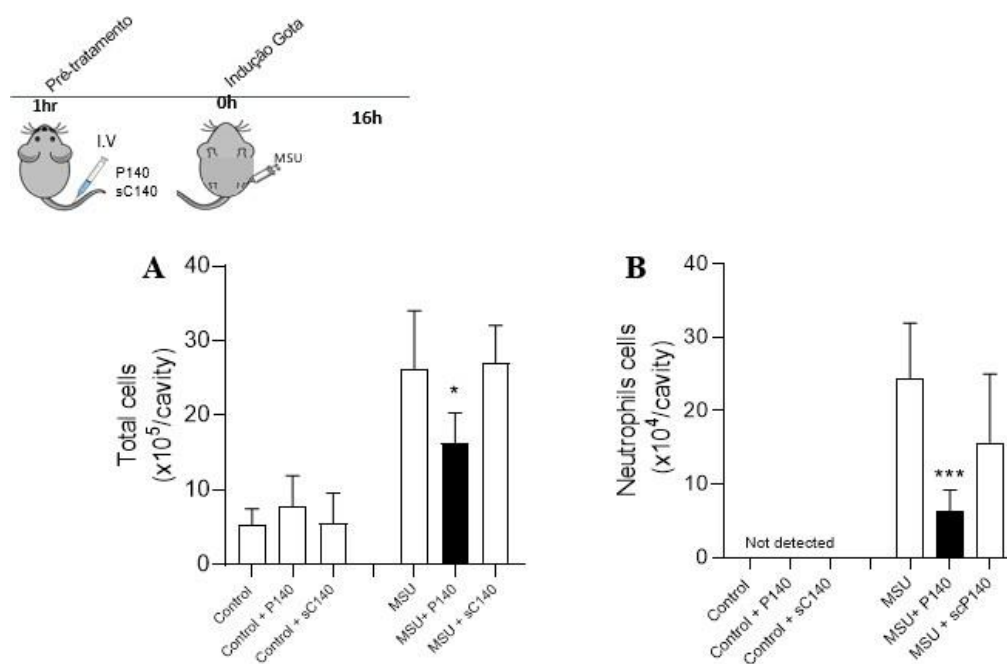


Figura 8 – Pré-tratamento com P140 induz uma redução de células inflamatórias na cavidade articular afetada pelo MSU.

O tratamento com o peptídeo induziu a uma redução de células totais na cavidade articular (A) sendo (*) $p=0,0363$ quando comparado com o grupo veículo (gota não tratado), assim como também induziu a redução de neutrófilos na cavidade articular (B) sendo (**) $p=0,0020$ quando comparado com o grupo veículo (gota não tratado). As barras representam a média \pm desvio padrão de 5 camundongos por grupo. (2way ANOVA seguida pelo pós-teste Shapiro-Wilk test).

Esses dados podem ser reiterados com a histologia do tecido periarticular destes animais, que demonstrou redução significativa da inflamação local em relação ao grupo não tratado e ao grupo peptídeo sC140 (figura 9).

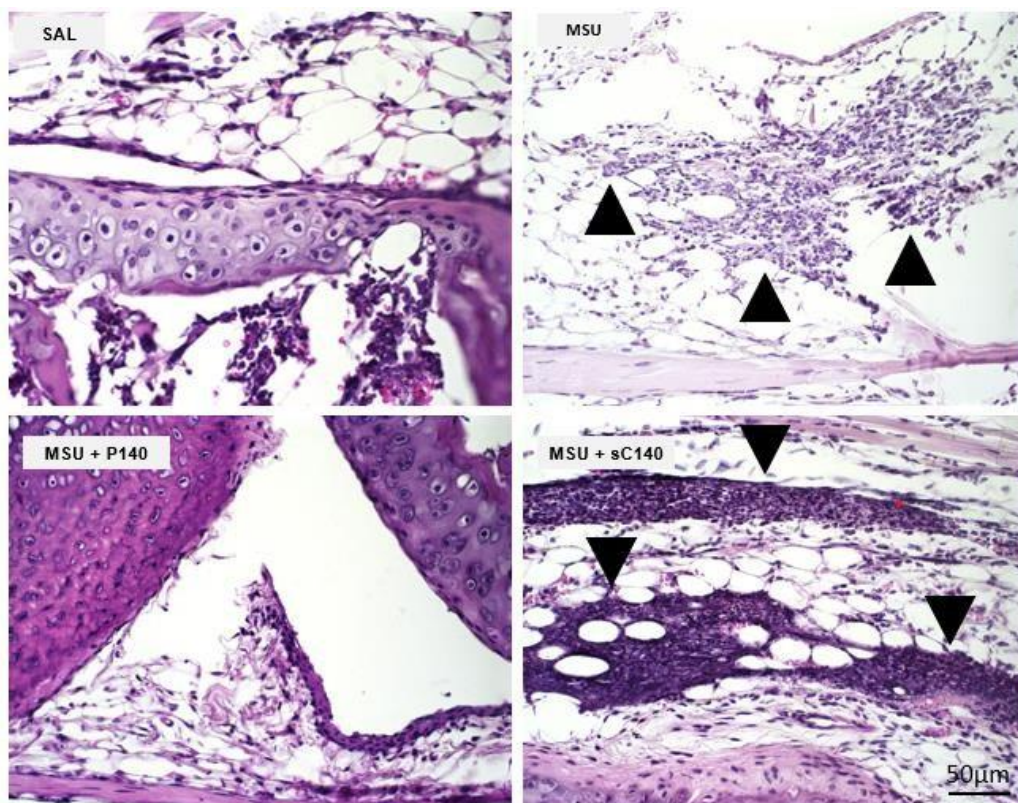


Figura 9 – O pré-tratamento com P140 reduz a inflamação articular promovida pela injeção de MSU.

No corte histológico salina (SAL) é possível verificar o tecido articular do joelho do animal, sem que haja presença de células do infiltrado inflamatório. No corte histológico (MSU), representa os animais que foram apenas desafiados com o MSU sem tratamento prévio, é possível verificar um alto nível infiltrado inflamatório local (setas pretas). No corte histológico (P140) representando os animais pré-tratados com este peptídeo é possível verificar o tecido articular do joelho sem que haja presença de células do infiltrado inflamatório. O corte histológico (sC140) representa o grupo de animais que foi pré-tratado com o peptídeo controle sC140, neste corte há uma presença extensa de infiltrado inflamatório, o que condiz com outros achados.

8.1.1 Pré-tratamento com P140 induziu a redução dos níveis de nocicepção

Os animais foram pré-tratados com o peptídeo P140 ou sC140 (1 µg/ml), a depender do grupo, por via endovenosa. 1 hora depois foi feito o desafio com o MSU (10 µl com 100mg) aplicado diretamente na articulação tíbio-femural e após 16 horas fizemos as análises, como descrito na metodologia. O teste de hipernocicepção busca demonstrar a pressão que os camundongos suportam em suas patas, logo, os camundongos que foram desafiados com o MSU, geralmente, suportam uma menor pressão em suas patas devido a inflamação local e a possível hiperalgesia que esta inflamação provavelmente gera. Portanto, quanto menor a coluna do gráfico de Hipernocicepção, estará representando que aquele grupo de animais aceitou uma menor pressão advinda do aparelho medidor. E, inversamente, quanto maior a coluna do gráfico, demonstra que os animais aceitaram uma maior pressão advinda do aparelho em suas patas.

O desafio com o MSU levou a uma diminuição de pressão vinda do aparelho que os animais aguentaram em suas patas, quando comparados ao grupo de animais controle. O grupo pré-tratamento com o peptídeo P140 apresentou uma melhora significativa em relação ao grupo gota sem tratamento MSU. Também foi possível observar que houve uma melhora significativa no grupo pré-tratado com o peptídeo controle sC140, em relação ao grupo gota não tratado MSU, e esse resultado foi inesperado.

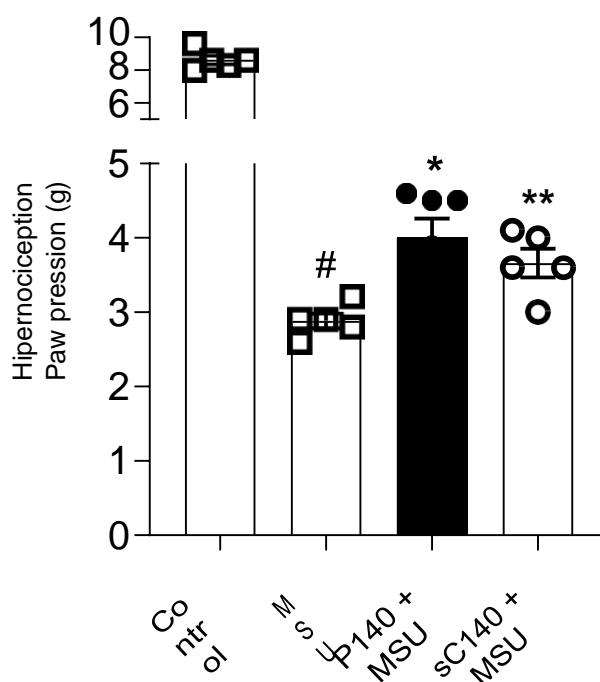


Figura 10 – Pré-tratamento com o P140 induz ao aumento da nociceção.

Foi possível demonstrar que o grupo MSU, em relação ao grupo controle, houve uma diminuição da Hipernociceção (#) $p < 0,0001$, o que demonstra que os animais não estavam aguentando tanto pressão em suas patas vinda do aparelho quando comparado ao grupo controle. Foi possível constatar uma diferença significativa entre os grupos P140 e MSU (*) $p = 0,0257$, em que o tratamento com o peptídeo fez com que os animais resistissem a uma maior pressão em suas patas quando comparado ao grupo veículo (gota não tratado). Também foi possível ver uma diferença significativa entre sC140 e MSU (**) $p = 0,0061$, em que também houve uma melhora em relação ao grupo MSU quando comparado com o grupo veículo (gota não tratado). As barras representam a média \pm desvio padrão de 5 camundongos por grupo (2way ANOVA seguido pelo pós-teste Tukey).

A partir das imagens macroscópicas dos joelhos tratados dos animais que foram induzidos a gota com o uso do MSU podemos verificar que essa melhora parece ser, macroscopicamente, visível nos animais utilizados nos experimentos (figura 11).

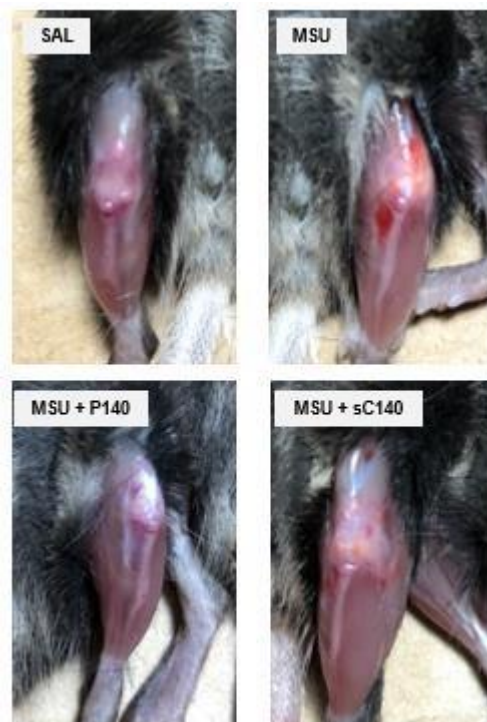


Figura 11 – Visualização macroscópica dos joelhos tratados dos animais.

Como é possível verificar nas imagens o grupo SAL não demonstrou, macroscopicamente, inflamação localizada. Entretanto os grupos MSU e MSU + sC140 demonstraram, macroscopicamente, inflamação localizada nos joelhos. O animal tratado com P140, demonstrado na figura MSU + P140 não demonstrou, visualmente, inflamação local.

8.1.2 P140 não altera os níveis de células inflamatórias sistêmicas

Como o P140 é administrado por via sistêmica, fomos avaliar se a redução de células inflamatórias na cavidade articular estava associada a alterações nas células circulantes, exercendo-se um possível efeito imunossupressor. Vimos que o uso do P140 como um pré-tratamento não trouxe diminuição das células inflamatórias sistêmicas (Figura 12), diferente daquilo que foi visto referente as células inflamatórias localizadas na região da cavidade articular. Como podemos concluir, o número de células totais (A), de neutrófilos totais (B) e de monócitos totais (C) sistêmicos não se alterou, significativamente, com o pré-tratamento utilizado. Entretanto, houve um aumento significativo do número de células inflamatórias com a utilização do peptídeo controle sC140, quando comparado ao grupo gota sem tratamento MSU.

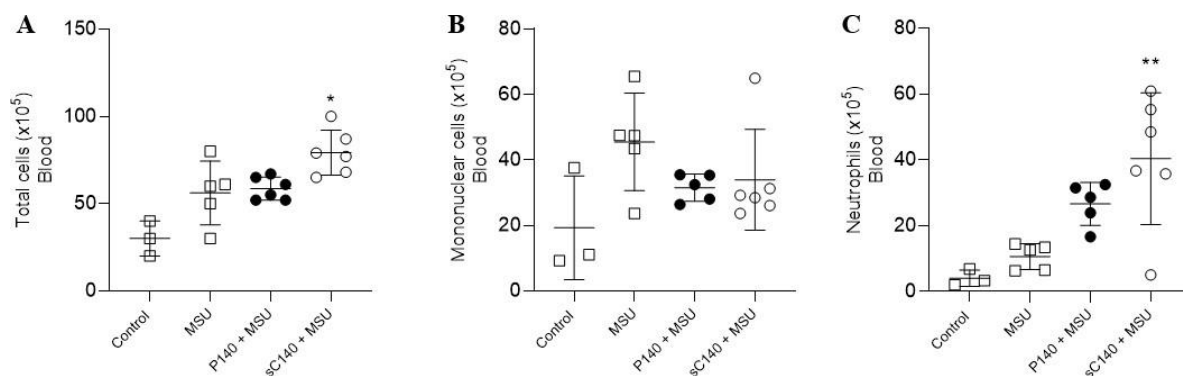


Figura 12 - Pré-tratamento com P140 não induziu uma redução de células inflamatórias sistêmicas após o desafio com MSU.

O tratamento com o peptídeo P140 não levou a uma redução significativa das células inflamatórias sistêmicas totais (A) $p=0,9996$ quando comparado ao grupo veículo (gota não tratado) MSU, entretanto houve um aumento significativo das células totais no grupo tratado com peptídeo controle sC140 (*) $p=0,0372$ comparado ao grupo MSU. Também não houve uma redução significativa de células mononucleares sistêmicas no grupo tratado com o peptídeo P140 (B) $p=0,3762$ quando comparado ao grupo veículo (gota não tratado) MSU. E os neutrófilos sistêmicos também não demonstraram redução com o tratamento P140 (C) $p=0,2078$ quando comparado ao grupo veículo (gota não tratado) MSU, entretanto houve um aumento significativo de neutrófilos sistêmicos no grupo tratado com o peptídeo controle sC140 (**) $p=0,0055$ quando comprado ao grupo MSU. As barras representam a média \pm desvio padrão de 5 camundongos por grupo (2way ANOVA seguida pelo pós-teste Shapiro-Wilk test).

8.1.3 O pré-tratamento com o peptídeo P140 induziu redução de ROS nas células tratadas e estimuladas com MSU *in vitro*

Fizemos a dosagem de Espécie reativa de oxigênio (ROS) *in vitro* devido a sua relação com a ativação do inflamassoma. No geral, quando ROS é liberado dentro da célula, ele auxilia na ativação do complexo do inflamassoma, sendo um dos fatores para que ocorra então a inflamação e a liberação de IL-1 β . Logo, foi feita a retirada das células da medula óssea dos animais e posterior cultivo para derivação de macrófagos, conforme descrito na metodologia. Posteriormente, foram feitas análises para verificação de nível de ROS em relação aos tratamentos utilizados nos macrófagos *in vitro*. Foi possível verificar que houve um aumento da liberação de ROS no MSU, grupo gota sem tratamento, em relação ao grupo controle. No grupo tratado com P140 houve redução da ROS quando comparado ao grupo gota não tratado MSU. Essa redução pode estar relacionada com a modulação da autofagia devido ao tratamento pelo peptídeo, o que pode levar a uma menor atuação do inflamassoma.

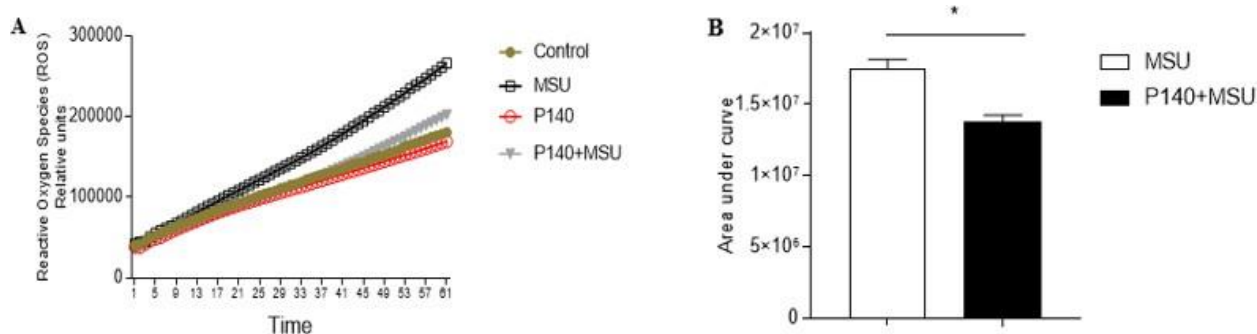


Figura 13 – Redução da concentração de ROS em relação aos tratamentos de macrófagos *in vitro*.

(A) Após experimentos *in vitro* foi possível verificar uma redução de ROS no grupo tratado P140 $p < 0,0001$ quando comparado ao grupo não tratado MSU. Essa redução nos levou a sugerir uma modulação da autofagia pelo uso do peptídeo. (B) Gráfico de área sob a curva referente ao gráfico A $p < 0,0001$ (AUC e 2way ANOVA seguido pelo pós-teste Tukey).

8.1.4 O pré-tratamento com o peptídeo P140 induziu a uma redução de IL-1 β no tecido periarticular

Os animais foram pré-tratados com o peptídeo P140 ou sC140 (1 $\mu\text{g/ml}$), a depender do grupo, por via endovenosa. 1 hora depois foi feito o desafio com o MSU (10 μl com 100mg) aplicado diretamente na articulação tíbio-femural e após 16 horas fizemos as análises, como descrito na metodologia. Foram feitos o processamento tecidual e posterior análise utilizando a técnica de ELISA nos tecidos periarticulares dos animais, conforme descrito na metodologia.

Foi possível verificar que houve um aumento da citocina IL-1 β no grupo gota não tratado MSU, quando comparado ao grupo controle. O grupo pré-tratado com o peptídeo P140 houve uma redução da citocina IL-1 β , quando comparado com os animais do grupo gota sem tratamento MSU. Houve também diferença significativa na concentração de citocina entre o grupo pré-tratado com o peptídeo controle sC140 e o grupo gota sem tratamento MSU, demonstrando que se faz necessário maiores estudos e experimentos para entender a atuação do peptídeo controle em relação a essa citocina.

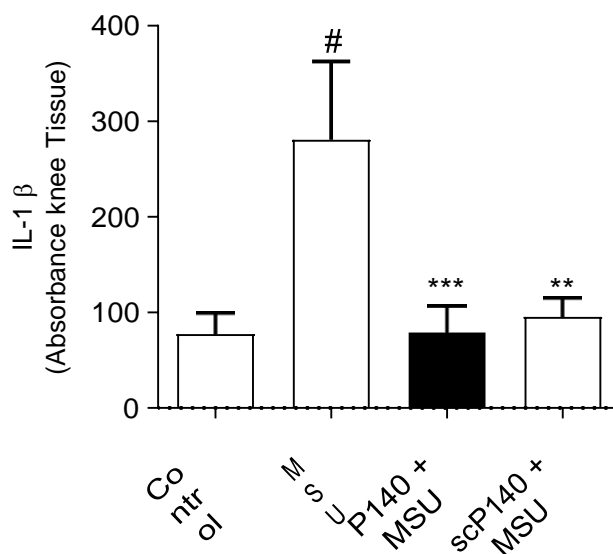


Figura 14 – Pré-tratamento diminui a concentração de IL-1 β no tecido periarticular dos animais.

Foi possível demonstrar que houve diferença significativa entre os grupos MSU e Controle (#) $p=0,0317$ quando comparado ao grupo controle. Também houve diferença significativa entre os grupos MSU e P140 (***) $p=0,0008$ quando comparado ao grupo veículo (gota não tratado), em que o grupo pré-tratado demonstrou uma diminuição da concentração de citocina nos tecidos dos animais e também houve uma diminuição significativa da concentração de IL-1 β no grupo pré-tratado com sC140, em relação ao grupo MSU (**) $p=0,0012$ quando comparado ao grupo veículo (gota não tratado), demonstrando que ambos peptídeos, nesse tratamento, tiveram uma atuação positiva em diminuir esta citocina inflamatória no local afetado pelo MSU. As barras representam a média \pm desvio padrão de 5 camundongos por grupo (2way ANOVA seguido pelo pós-teste Tukey).

9. Avaliar o efeito da pós-administração do peptídeo P140 na resposta inflamatória induzida pelo MSU no modelo experimental murino de gota.

Uma vez observado que o pré-tratamento inibiu a resposta inflamatória na gota experimental decidimos investigar se o pós-tratamento teria efeitos importantes.

9.1 O pós-tratamento com o peptídeo levou a redução de neutrófilos na articulação afetada pelo MSU

Induzimos a gota injetando MSU (10 μ l com 100mg) diretamente na articulação tíbio-femural dos animais, após 10 horas fizemos o tratamento com o peptídeo P140 ou sC140 (1 μ g/ml), a depender do grupo de animais. Foi esperado 16 horas, e foram feitas as análises, assim como descrito na metodologia. Foi possível verificar que o tratamento não demonstrou diferença no total de células inflamatórias localizadas na cavidade articular dos animais (A), e também não demonstrou diferença no total de células mononucleares (B). Entretanto, houve diferença significativa no total de neutrófilos localizados na cavidade articular dos animais, feito o pós-tratamento com o peptídeo P140 houve uma redução do número de neutrófilos

presentes na articulação afetada pelo MSU quando comparado ao grupo gota sem tratamento MSU.

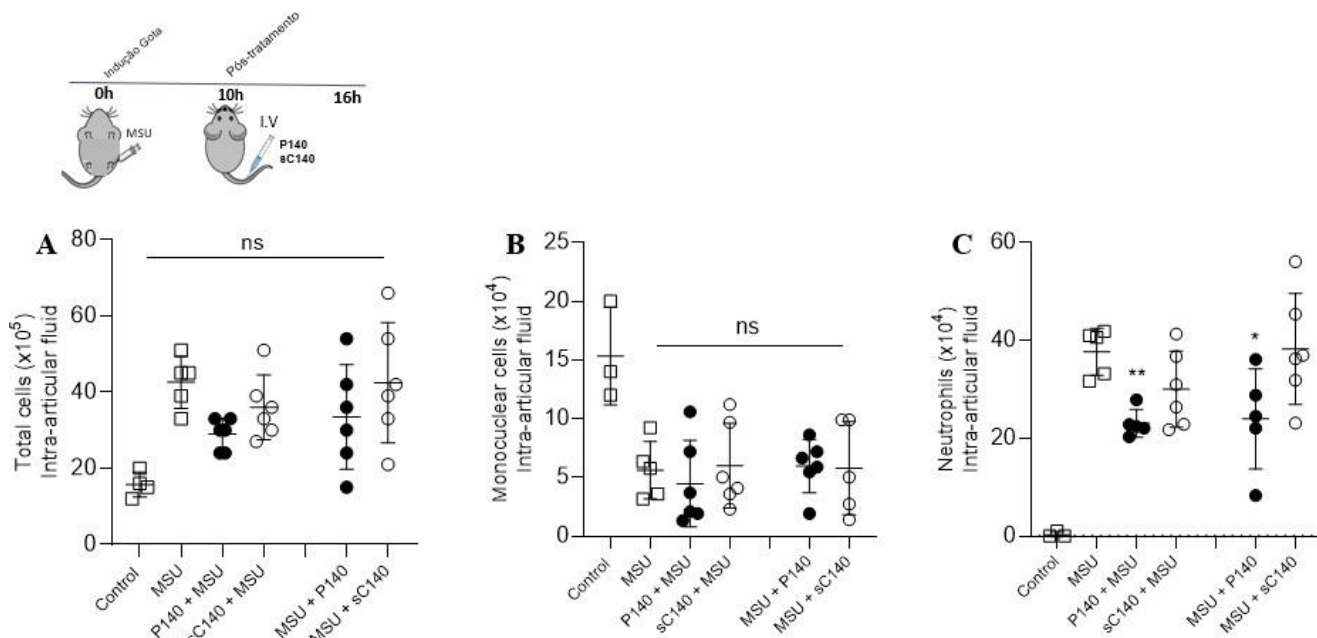


Figura 15 – Pós-tratamento reduz neutrófilos na cavidade periarticular.

Com a utilização do pós-tratamento com o peptídeo P140 foi possível demonstrar que (A) não houve diferença significativa no total de células inflamatória na cavidade articular, $p=0,6907$ quando comparado ao grupo veículo (gota não tratado) MSU, assim como (B) não houve diferença no total de células mononucleares também na cavidade articular, $p>0,9999$ quando comparado ao grupo veículo (gota não tratado) MSU. Entretanto (C) houve uma diminuição significativa de neutrófilos, em relação ao grupo MSU nas articulações pós-tratadas com o P140 (*) $p=0,0048$ quando comparado com o grupo veículo (gota não tratado) MSU. As barras representam a média \pm desvio padrão de 5 camundongos por grupo (2way ANOVA seguido pelo pós-teste Tukey).

Esses dados podem ser correlacionados utilizando a histologia do tecido periarticular destes animais, que demonstrou redução da inflamação local do grupo P140 em relação ao grupo não tratado MSU e ao grupo peptídeo controle sC140 (figura 16).

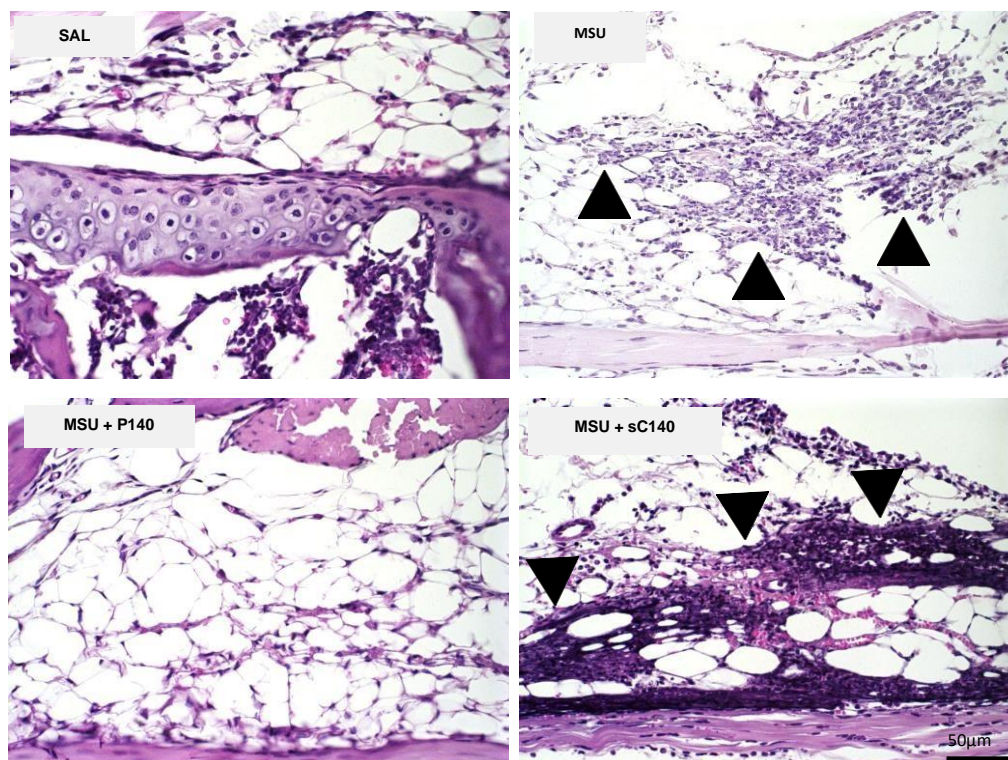


Figura 16 – Pós-tratamento demonstrou redução de neutrófilos na cavidade articular.

Para a histologia foram utilizados 5 animais por grupo. No corte histológico salina (SAL) é possível verificar o tecido articular do joelho do animal, sem que haja presença de células do infiltrado inflamatório. No corte histológico (MSU), representa os animais que foram apenas desafiados com o MSU sem tratamento prévio, é possível verificar um alto nível infiltrado inflamatório local (setas pretas). No corte histológico (P140) representando os animais pós-tratados com este peptídeo é possível verificar o tecido periarticular do joelho sem que haja presença de células do infiltrado inflamatório. O corte histológico (sC140) representa o grupo de animais que foi pós-tratado com o peptídeo controle sC140, neste corte há uma presença extensa de infiltrado inflamatório, o que condiz com outros achados.

9.2 O pós-tratamento com o peptídeo levou a redução dos níveis de nocicepção dos animais.

Induzimos a gota injetando MSU (10 µl com 100mg) diretamente na articulação tíbio-femural dos animais, após 10 horas fizemos o tratamento com o peptídeo P140 ou sC140 (1 µg/ml), a depender do grupo de animais. Foi esperado 16 horas, e foram feitas as análises, assim como descrito na metodologia. Como explicado anteriormente, o gráfico de nocicepção necessita de ser lido de maneira invertida. Foi possível verificar um aumento de Hipernocicepção no grupo gota sem tratamento MSU, quando comparado ao grupo controle. O grupo pós-tratado com o peptídeo P140 demonstrou uma significativa redução de nocicepção em relação ao grupo gota não tratado MSU. Assim como no pré-tratamento, o pós-tratamento com o peptídeo controle sC140 também demonstrou benefícios em relação a melhora da nocicepção, quando comparado ao grupo gota não tratado MSU.

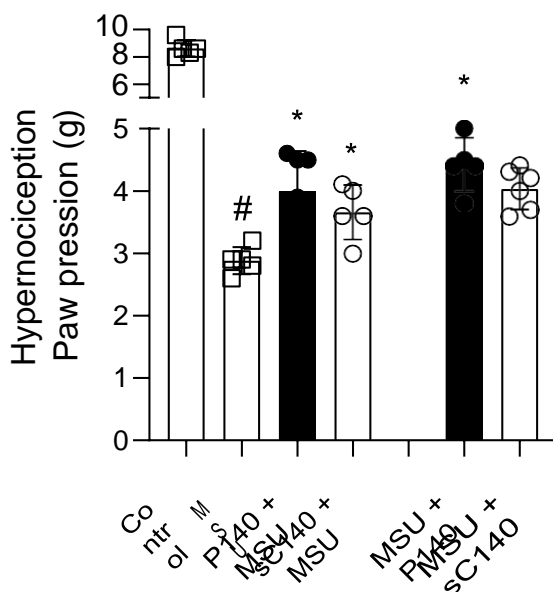


Figura 17 – Pós-tratamento com o peptídeo P140 induziu a redução de nociceção nos animais tratados.

Foi possível demonstrar que o grupo MSU, em relação ao grupo controle, houve uma diminuição da Hipernociceção (#) $p < 0,0001$, o que demonstra que os animais não estavam aguentando tanto pressão em suas patas vinda do aparelho quando comparado ao grupo controle. Após o tratamento com o P140 houve uma significativa redução dos níveis de nociceção dos animais, quando comparados ao grupo MSU $p = 0,0013$ quando comparado ao grupo veículo (gota não tratado). Houve também diferença significativa entre o grupo tratado com o peptídeo controle sC140 e o grupo MSU $p = 0,0026$ quando comparado ao grupo veículo (gota não tratado). As barras representam a média \pm desvio padrão de 5 camundongos por grupo. (2way ANOVA seguido pelo pós-teste Tukey).

A partir da visualização macroscópica dos joelhos dos animais pós-tratados, que foram induzidos a gota utilizando o MSU podemos verificar que essa melhoria foi aparente, macroscopicamente (figura 18).

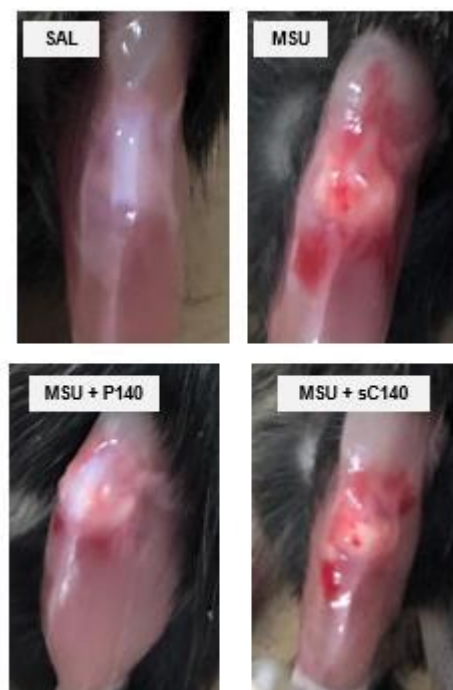


Figura 18 – Joelhos induzidos a gota utilizando MSU dos animais pós-tratados.

Como é possível verificar visualmente nas imagens dos joelhos dos animais experimentais, houve uma diferença visual entre os grupos. O grupo SAL não demonstrou inflamação, no contexto visual, no joelho dos animais. Já o grupo que foi induzido a gota, sem tratamento, MSU, demonstrou uma intensa inflamação localizada, macroscópica. O grupo induzido a gota e pós-tratado com o peptídeo controle demonstra também uma inflamação local, porém diminuída quando comparado com o grupo MSU. O grupo pós-tratado com o P140 demonstra uma diminuição da inflamação ainda maior do que o grupo tratado com o peptídeo controle, quando comparamos com o grupo MSU, corroborando com os demais achados.

9.3 Pós-tratamento com P140 não interferiu com o nível de neutrófilo apoptótico na cavidade articular

A partir dos dados de contagem de células locais e da diferença significativa no número de neutrófilos, fomos verificar se havia alguma diferença no número de neutrófilos apoptóticos no joelho que foi induzido a gota, visto que neutrófilos apoptóticos aparecem na fase inflamatória de crise de gota aguda, principalmente ao final da inflamação. Logo, induzimos a gota injetando MSU (10 μ l com 100mg) diretamente na articulação tíbio-femural dos animais, após 10 horas fizemos o tratamento com o peptídeo P140 ou sC140 (1 μ g/ml), a depender do grupo de animais. Foi esperado 16 horas, e foram feitas as análises, assim como descrito na metodologia. Foi possível verificar que não houve diferença significativa entre os grupos tratados e não tratados para gota referente ao nível de neutrófilos apoptóticos na cavidade articular em que foi injetado MSU.

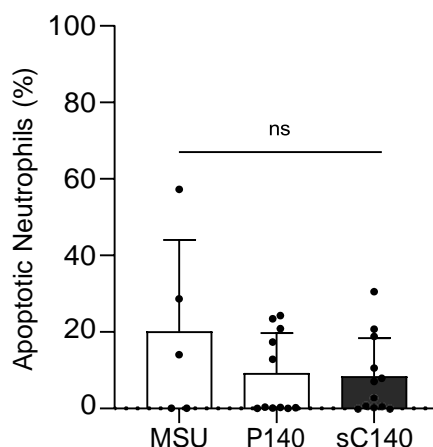


Figura 19 – O tratamento com P140 não demonstrou diferença significativa no número de neutrófilos apoptóticos na cavidade articular dos animais.

O tratamento com o peptídeo não demonstrou diferença significativa entre os grupos tratados e não tratados para gota e o nível de neutrófilos apoptóticos, $p=0,3085$. As barras representam a média \pm desvio padrão de 5 camundongos por grupo (2way ANOVA seguida pelo pós-teste Tukey).

9.4 Pós-tratamento levou a redução de IL-1 β no tecido periarticular dos animais

Induzimos a gota injetando MSU (10 μ l com 100mg) diretamente na articulação tíbio-femural dos animais, após 10 horas fizemos o tratamento com o peptídeo P140 ou sC140 (1 μ g/ml), a depender do grupo de animais. Foi esperado 16 horas, e foram feitas as análises, assim como descrito na metodologia. Foi demonstrado que o grupo gota sem tratamento MSU teve um aumento significativo de IL-1 β , quando comparado ao grupo controle. Houve uma diminuição significativa da concentração de IL-1 β no grupo pós-tratado pelo peptídeo P140, em relação ao grupo gota não tratado MSU. Entretanto, assim como no pré-tratamento, também verificamos que houve uma diferença significativa entre o grupo tratado com o peptídeo controle sC140 e o grupo gota não tratado MSU, logo reiterando a hipótese de que se faz necessário entender melhor a atuação do peptídeo controle em relação a essa citocina.

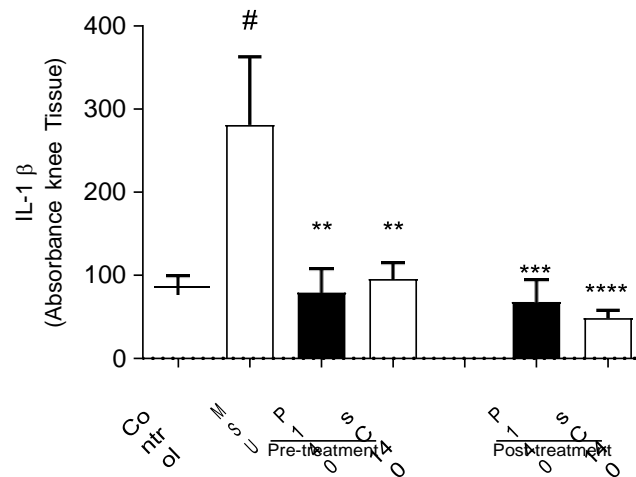


Figura 20 – Pós-tratamento com o peptídeo levou a diminuição da concentração de IL-1 β no tecido periarticular dos animais.

Após tratamento com o peptídeo, foi possível verificar uma diferença significativa entre o grupo MSU e o grupo Controle (#) $p=0,0317$. Houve diferença significativa de liberação da citocina pró-inflamatória, em que demonstra uma diminuição da concentração de IL-1 β no tecido periarticular entre o grupo P140 e o grupo MSU (***) $p=0,0003$ quando comparado ao grupo veículo (gota não tratado). Além disso, também foi possível verificar uma diferença significativa entre o grupo peptídeo controle sC140 e o grupo gota sem tratamento MSU (****) $p<0,0001$ quando comparado ao grupo veículo (gota não tratado), sendo um resultado não esperado, porém interessante para análises posteriores. As barras representam a média \pm desvio padrão de 5 camundongos por grupo (2way ANOVA seguido pelo pós-teste Tukey).

10. DISCUSSÃO

A gota é uma doença causada pela deposição de MSU nas articulações que leva a inflamação local devido ao recrutamento de células inflamatórias (BENAVENT *et al.*, 2021; HARRIS, MARK D.; SIEGEL; ALLOWAY, 1999) e a ativação de inflamassoma NLRP3, com posterior liberação de IL-1 β (BUSSO; SO, 2010; HARRIS, JAMES *et al.*, 2017; SCHRODER; TSCHOPP, 2010). No presente estudo foi possível observar, pela primeira vez, que o uso do peptídeo sintético P140 induz uma melhora, no aspecto inflamatório local, nos animais desafiados com gota e tratados com o peptídeo.

A gota é caracterizada por ataques inflamatórios localizados e limitantes (MITROULIS; KAMBAS; RITIS, 2013) que conduzem ao desgaste e a destruição das articulações, desfiguração e incapacidades (TERKELTAUB, 2010). O reconhecimento do cristal formado a partir do ácido úrico que se deposita nas articulações, denominado MSU, gera essa cascata inflamatória local e liberação de IL-1 β (MITROULIS; KAMBAS; RITIS, 2013; MITROULIS; SKENDROS; RITIS, 2010). As principais células relacionadas a esse ataque inflamatório são os macrófagos residentes das articulações, que são os primeiros a reconhecer o MSU (DALBETH *et al.*, 2019) e a levar a ativação do inflamassoma. Após a liberação do IL-1 β há o recrutamento dos neutrófilos para o local afetado (MITROULIS; KAMBAS; RITIS, 2013). Os nossos achados mostraram que o pré-tratamento com peptídeo P140 diminuiu o número de células inflamatórias totais na cavidade articular dos animais, com uma redução significativa de neutrófilos, quando comparados ao grupo com MSU não tratado. A redução de neutrófilos nas articulações pode estar associada com as melhoras clínicas (Hipernocicepção) e patológicas (histopatológica) também observadas nesse projeto. Muitos trabalhos tem demonstrado a papel de neutrófilos na patologia da gota experimental (AMARAL *et al.*, 2012; BROSTJAN; OEHLER, 2020; MITROULIS; KAMBAS; RITIS, 2013; SO, ALEXANDER, 2013), além disso, trabalhos tem demonstrados que estratégias farmacológicas de inibição de recrutamento de neutrófilos melhoram a inflamação da Gota (BRANDT, 1974; CHEN, BAOFENG *et al.*, 2019; TSEUGUEM; NGANGOUM; *et al.*, 2019; TSEUGUEM; NGUELEFACK; *et al.*, 2019).

Nas articulações afetadas pelo MSU os neutrófilos, podem ou não fagocitar o MSU, e posteriormente secretam mediadores inflamatórios que levam a uma piora do quadro da gota (MITROULIS; KAMBAS; RITIS, 2013). Os neutrófilos são recrutados para a cavidade intra-articular com gota após o primeiro reconhecimento do MSU pelos macrófagos e liberação de citocinas, tais quais, IL-1 β e a quimiocina CXCR2 (POPA-NITA; NACCACHE, 2010).

Apesar de não ter sido dosado CXCR2, observamos uma redução dos níveis de IL-1 β no tecido periarticular dos animais tratados com o peptídeo P140 após desafio com MSU, sugerindo um efeito do P140 associado a modulação do inflamassoma.

Essa redução significativa de neutrófilos poderia estar associada a um menor ambiente inflamatório local (AMARAL *et al.*, 2012; COELHO *et al.*, 2008; CUNHA *et al.*, 2008), com menor produção de citocinas e quimiocinas, para o qual eles, provavelmente, foram menos atraídos depois do desafio com o MSU. Outro ponto a ser levado em consideração, a respeito da redução local de neutrófilos, está relacionado com a possível atuação do peptídeo inibindo estas células de migrarem para os locais inflamados, correlacionando essa sugestão com o fato visto do número ligeiramente aumentado de neutrófilos sistêmicos no grupo tratado com P140, em relação ao grupo MSU.

Outro ponto que sugere uma evidência de atuação do peptídeo P140 no grupo tratado como inibidor de recrutamento de neutrófilos é o resultado de que não houve diferença na contagem de neutrófilos apoptóticos, sugerindo que o peptídeo a princípio, não interfere na sobrevivência dos neutrófilos no local inflamado.

Além disso, outra consideração associada ao contexto de infiltração de neutrófilos na cavidade articular com gota está relacionado com a hiperalgesia, os autores AMARAL *et al.*, 2012; YIN *et al.*, 2020 demonstraram que os neutrófilos estão diretamente relacionados com a hiperalgesia nos animais testados para gota. Logo, nossos resultados corroboram com a literatura, em que houve uma diminuição de neutrófilos e também uma diminuição de hiperalgesia desses animais tratados.

Em relação a medicações e terapias utilizadas para o tratamento desta doença, estudos feitos com outras terapias alternativas para o tratamento de gota, como por exemplo o uso dos fitoterápicos Curcumina, Eucaliptol e do extrato aquoso de *Paullinia pinnata* tem como um dos principais objetivos a redução do recrutamento neutrofílico, devido ao fato de que o aumento de neutrófilos locais leva ao aumento de hiperalgesia e inflamação (CHEN, BAOFENG *et al.*, 2019; TSEUGUEM; NGUELEFACK; *et al.*, 2019; YIN; LIU; WANG; *et al.*, 2020). Um outro exemplo de doença inflamatória autoimune com melhora do quadro quando há uma diminuição dos neutrófilos é a vasculite, estudos mostram que a atividade excessiva dos neutrófilos exacerba o quadro patológico (NAKAZAWA *et al.*, 2018; XIAO *et al.*, 2002).

Medicamentos muito utilizados na doença de gota como cloroquina e a hidroxicloroquina atuam na autofagia alterando o pH lisossomal, afetando a função celular como um todo. O principal efeito colateral destes medicamentos ocorrem nos olhos e no coração, aparecendo com o seu uso a longo prazo, sendo um efeito colateral acumulativo (VOMERO *et al.*, 2018; XIU *et al.*, 2014; ZIEGLER; UNANUE, 1982). Outros autores, por sua vez, defendem o uso de AINES, mesmo com os efeitos colaterais já citados como gastrointestinais, cardiovasculares e nefrotóxicos (FITZGERALD *et al.*, 2020; PILLINGER; MANDELL, 2020) e outros medicamentos, principalmente anti-inflamatórios. Entretanto, o principal ponto negativo a respeito do uso destes medicamentos são os efeitos colaterais, e esse é o ponto chave do peptídeo P140, ele não apresenta efeitos colaterais, segundo estudos publicados (BONAM; RUFF; MULLER, 2019; MONNEAUX *et al.*, 2003, 2007).

O peptídeo P140 atualmente vem sendo estudado e bastante publicado em casos de lúpus (BONAM; WANG; MULLER, 2018; MULLER, 2017; PAGE *et al.*, 2009; WANG, FENGJUAN *et al.*, 2020; WILHELM *et al.*, 2018; ZIMMER *et al.*, 2013), sua atuação como modulador da autofagia e do sistema imunológico nesta doença nos levou a utilizá-lo em um modelo animal de gota. Este peptídeo exibe propriedades físico-químicas intrínsecas altamente favoráveis, não é imunogênico, é seguro e não exibe atividade imunossupressora (BONAM; RUFF; MULLER, 2019; WANG, FENGJUAN *et al.*, 2020).

No modelo de lúpus ele atua como um imunomodulador que interfere nas respostas imunológicas excessivas e retarda, consideravelmente, o processo fisiopatológico (BONAM; WANG; MULLER, 2018; GROS; MULLER, 2014; RETNAKUMAR; MULLER, 2019; SCHALL *et al.*, 2012). Foi demonstrado que ele interage diretamente com a proteína Hsc70, se co-localizando diretamente com essa proteína, inibindo sua atividade chaperona (PAGE *et al.*, 2009, 2011).

O peptídeo, quando co-localizado com Hsc70, tem uma papel de regulação negativa, diminuindo assim o fluxo autofágico via CMA (BONAM; WANG; MULLER, 2018; MULLER, 2018) e essa modulação da resposta autofágica celular, pode estar relacionada com a melhora nos casos de gota, quando tratados com o peptídeo (figura 22), pois pode levar a uma modulação negativa da resposta autofágica após a fagocitose dos cristais de MSU, diminuindo assim a formação de NLRP3 (BONAM; WANG; MULLER, 2018).

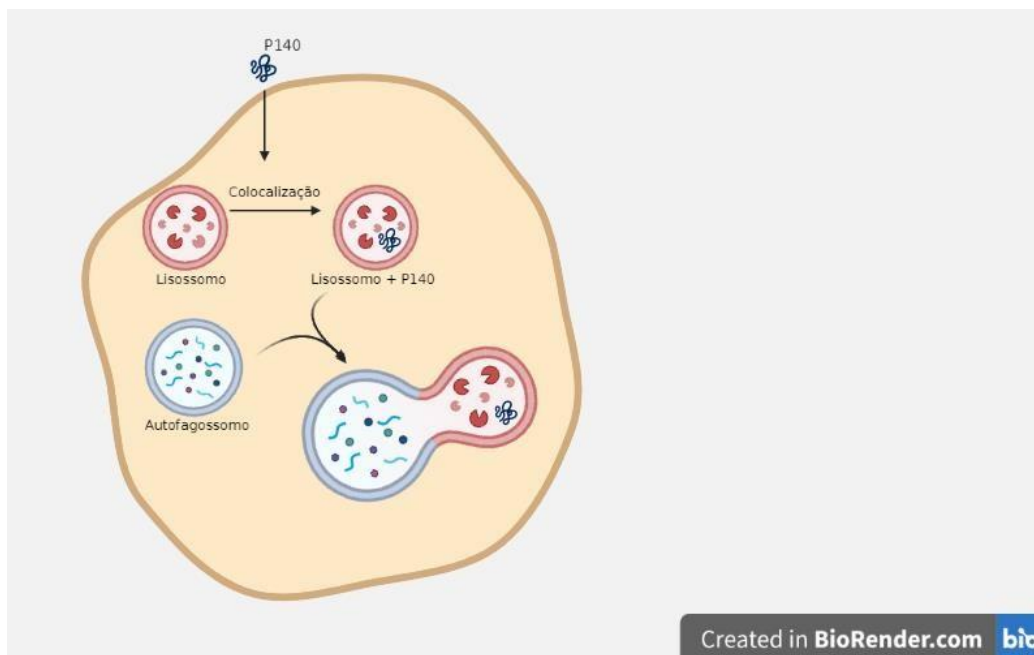


Figura 21 – Regulação da autofagia CMA pelo peptídeo P140.

Resumo da atuação direta do peptídeo P140 nos lisossomos que leva a modulação da autofagia celular. Adaptado (BONAM; WANG; MULLER, 2018; ZHU, SHENG YU *et al.*, 2020) Criado comBioRender.com.

Embora não explorado em nosso trabalho, nossa hipótese levantada é de que um dos mecanismos pelo qual o peptídeo poderia estar atuando na gota poderia ser na modulação da autofagia, afetando a resposta macrofágica ao cristal de MSU, quando este é fagocitado por estas células. Embora essa nossa hipótese seja apenas especulativa, a temos como perspectiva de estudo.

Quando há o aumento da autofagia de uma célula ocorre o decréscimo de Casp1 ativada, levando a uma menor formação do complexo inflamassoma que por sua vez diminui a clivagem de IL-1 β , conseqüentemente diminuindo sua liberação (CAO *et al.*, 2019; HARRIS, JAMES *et al.*, 2017)

Considerando a redução de IL-1 β nos tecidos articulares dos animais com gota tratados com P140, avaliamos produção de ROS, nos macrófagos derivados de medula óssea. Sabe-se que a liberação de ROS, no contexto estudado, está relacionado com a fagocitose, pela célula, do MSU; O MSU induz a uma alta produção celular de ROS (VIEIRA *et al.*, 2015), e embora não tenhamos estudado a fundo sobre esta via, entende-se que a produção de ROS leva a ativação de inflamassoma (AMARAL *et al.*, 2012; AMULIC *et al.*, 2012; YIN; LIU; LI; *et al.*, 2020), pois, já se é entendido, que ROS tem um papel importante na ativação da Casp1 (CRUZ *et al.*, 2007; DOSTERT *et al.*, 2008).

A redução de ROS nos macrófagos tratados com o peptídeo P140 *in vitro*, pode estar associado com a modulação do inflamassoma, uma vez que observamos uma diminuição da

concentração da citocina IL-1 β no tecido periarticular dos animais desafiados com MSU e tratados com o P140 (HARRIS, JAMES *et al.*, 2017; KLÜCK *et al.*, 2020; MARTINON *et al.*, 2006). Quando ocorre a diminuição do IL-1 β , consequentemente, há uma redução do quadro inflamatório local e uma melhora do quadro de gota (RAGAB; ELSHAHALY; BARDIN, 2017; SCHRODER; TSCHOPP, 2010; WEBER *et al.*, 2020).

Para entender melhor a atuação do peptídeo P140 o testamos como pós-tratamento, pois as células inflamatórias locais, principalmente os neutrófilos que mostraram uma diminuição no pré-tratamento, já estariam recrutadas para a cavidade articular (HARRIS, MARK D.; SIEGEL; ALLOWAY, 1999; MARTILLO; NAZZAL; CRITTENDEN, 2014).

Vimos que, com o uso do peptídeo P140 como pós-tratamento, após o desafio com o MSU, o grupo tratado demonstrou uma significativa redução de neutrófilos na cavidade articular, e correlacionando com esse dado, também foi possível observar diminuição da hipernocicepção dos animais tratados, em comparação do grupo MSU não tratado.

Esse dado de pós-tratamento levantou nova hipótese de que o peptídeo atua diretamente na atividade celular dos neutrófilos. Quando verificamos o número de neutrófilos apoptóticos no grupo pós-tratado com o P140, em relação ao grupo MSU, não conseguimos ver diferença significativa, o que sugere que essa atuação na atividade celular dos neutrófilos feita pelo peptídeo, não ocorre por apoptose, mas poderia ocorrer por outros mecanismos de morte celular que não são visíveis morfológicamente (FRANK; VINCE, 2018; GREEN; LLAMBI, 2015; KERR; WYLLIE; CURRIE, 1972), sendo necessário então explorar de uma maneira mais ampla esse ponto visto.

Sabemos que quando ocorre diminuição da citocina IL-1 β é devido ao fato de que houve uma diminuição da ativação do inflamassoma celular (RAGAB; ELSHAHALY; BARDIN, 2017; SCHRODER; TSCHOPP, 2010; WEBER *et al.*, 2020). Logo, com o uso do pós-tratamento com o peptídeo P140, em relação ao grupo não tratado MSU, houve diminuição significativa de IL-1 β , sugerindo então uma modulação do peptídeo do inflamassoma das células, mesmo com sua utilização após a desafio com o MSU.

Um ponto a se discutir é o fato de que, mesmo o peptídeo sendo administrado de maneira sistêmica, ele altera apenas as células inflamatórias locais, significativamente, referentes ao joelho desafiado com o MSU. Os autores PAGE *et al.*, 2011 viram que após a administração IV do peptídeo, a sua biodistribuição corporal ocorreu, preferencialmente, no pulmão e no baço, ocorrendo um acúmulo nesses dois órgãos, com uma co-localização do P140 nas células B e nos macrófagos, nestes órgãos. Nesses estudos o peptídeo não demonstrou impacto em células imunes circulantes (PAGE *et al.*, 2011). Entretanto, em nosso

trabalho podemos observar que houve um aumento das células inflamatórias circulantes, de células totais e de neutrófilos, que mesmo não significativo, já demonstra ser um ponto que precisa ser melhor elucidado, a fim de entender os efeitos colaterais desse aumento de células circulantes.

Em relação aos resultados significativos do peptídeo controle sC140, ele levou a diminuição significativa da Hipernocicepção tanto na sua pré-administração quando na pós-administração, quando comparado aos grupos MSU, e também levou a diminuição significativa da citocina IL-1 β no tecido periarticular dos grupos pré e pós-tratados, quando comparado aos grupos MSU. Já se foi demonstrado que esse peptídeo se diferencia do P140 a partir de fosforilações diferentes que ambos apresentam em suas estruturas (PAGE *et al.*, 2009). Estudos mostram que sC140 não possui o mesmo efeito de co-localização com Hsc70e Lamp2 que P140 possui (PAGE *et al.*, 2009, 2011) o que nos leva a inferir que este peptídeo controle não está atuando, em relação a diminuição da citocina IL-1 β e da diminuição da hiperalgesia, diretamente na diminuição da inflamação ou modulando autofagia, devido a sua diferente atuação, comprovada, nas células já estudadas. Logo, é mais provável que ele consiga agir, de alguma maneira, diretamente na citocina em si, ou nos neutrófilos, visto que os neutrófilos estão relacionados tanto com a nocicepção e também relacionados a liberação de IL-1 β . Mais estudos de vias de sinalização e aprofundamento a respeito da atuação deste peptídeo controle se fazem necessários.

Em resumo, nossos achados demonstraram que o peptídeo foi capaz de levar a diminuição de neutrófilos nas cavidades articulares desafiadas com o MSU, além de diminuição da nocicepção dos animais tratados e redução dos níveis da citocina pró- inflamatória IL-1 β no tecido periarticular dos joelhos dos animais com MSU, quando comparados com o grupo gota não tratado (figura 22). Embora os mecanismos pelos quais o peptídeo tenha demonstrado efeitos benéficos, tanto na prevenção como no tratamento na gota experimental, ainda precisam ser melhor elucidados, nossos dados sugerem que esta possa ser mais uma estratégia terapêutica promissora futura para pacientes com Gota.

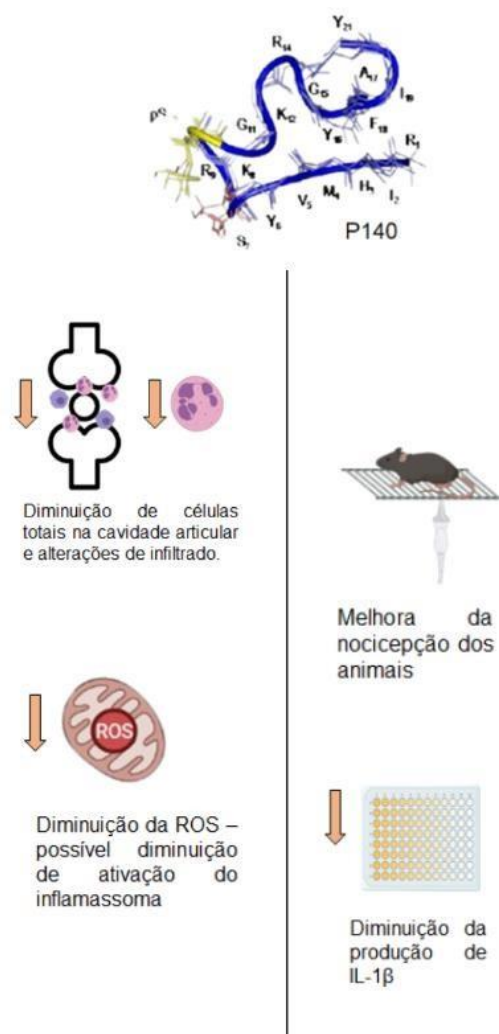


Figura 22 – Resultados compilados do uso do peptídeo P140 no modelo de gota.

Resumo dos resultados apresentados no decorrer deste trabalho, demonstrando o peptídeo ser capaz de diminuir as células inflamatórias localizadas, diminuir a nocicepção dos animais tratados, levar a uma diminuição da presença de IL-1 β no tecido periarticular dos joelhos desafiados e, *in vitro*, levar a diminuição de ROS nas células tratadas.

Perspectivas

Apesar de não termos elucidado completamente os mecanismos envolvidos no fenótipo gerado a partir do uso do peptídeo P140, o que esperamos como perspectiva, ele demonstra ser uma terapia alternativa promissora para o tratamento da artrite gotosa.

Como perspectivas temos por objetivo de elucidar o papel da autofagia na modulação do inflamassoma no nosso modelo murino de gota, explorar os mecanismos da montagem do inflamassoma e a atuação do peptídeo nesse processo. Além disso, iremos comparar as vias afetadas pelo peptídeo tanto nos macrófagos quanto nos neutrófilos, visto que ambos são células de extrema importância para a patologia estudada, e explorar melhor as vias autofágicas afetadas pelo peptídeo nestas células.

Também iremos investigar os efeitos anti-inflamatórios do tratamento com o peptídeo P140 em macrófagos, comparando os efeitos *in vitro* com a droga anti-inflamatória dexametasona, avaliando a produção da citocina IL-10, como forma de tentar correlacionar o efeito do peptídeo com o de uma droga anti-inflamatória comercialmente utilizada.

Outro ponto a ser verificado serão os fatores de sobrevivência celular, analisar a via do NF- κ B e entender se o tratamento com o peptídeo afeta esses fatores de alguma maneira. Verificar se o peptídeo P140 e o peptídeo controle sC140 afetam outras citocinas pró- inflamatórias como por exemplo IL-18, e tentar compreender como o peptídeo controle modula certas respostas e outras não.

11. REFERÊNCIAS

ALSAEID, Khaled; MAJEED, H. A. Acute rheumatic fever: Diagnosis and treatment. *Pediatric Annals*, v. 27, n. 5, p. 295–302, 1998.

AMARAL, Flávio A. *et al.* NLRP3 inflammasome-mediated neutrophil recruitment and hypernociception depend on leukotriene B4 in a murine model of gout. *Arthritis & Rheumatism*, v. 64, n. 2, p. 474–484, 1 fev. 2012. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/art.33355>>. Acesso em: 30 jul. 2021.

AMULIC, Borko *et al.* *Neutrophil Function: From Mechanisms to Disease. Annual Review of Immunology*, 30(1), 459–489 | 10.1146/annurev-immunol-020711-074942. Disponível em: <<https://sci-hub.se/>>. Acesso em: 5 ago. 2021.

ÄNGEBY MÖLLER, Kristina; JOHANSSON, Bo; BERGE, Odd Geir. Assessing mechanical allodynia in the rat paw with a new electronic algometer. *Journal of Neuroscience Methods*, v. 84, n. 1–2, p. 41–47, 1 out. 1998. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9821632/>>. Acesso em: 23 jun. 2021.

BENAVENT, Diego *et al.* Healthcare-related impact of gout in hospitalized patients in Spain. *Scientific Reports 2021 11:1*, v. 11, n. 1, p. 1–6, 24 jun. 2021. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41598-021-92673-3>>. Acesso em: 22 jul. 2021.

BIASIZZO, Monika; KOPITAR-JERALA, Nataša. Interplay Between NLRP3 Inflammasome and Autophagy. *Frontiers in Immunology*, v. 11, p. 591803, 9 out. 2020. Disponível em: <<https://pmc/articles/PMC7583715/>>. Acesso em: 5 ago. 2021.

BONAM, Srinivasa Reddy; RUFF, Marc; MULLER, Sylviane. HSPA8/HSC70 in Immune Disorders: A Molecular Rheostat that Adjusts Chaperone-Mediated Autophagy Substrates. *Cells*, v. 8, n. 8, 7 ago. 2019. Disponível em: <<https://pmc/articles/PMC6721745/>>. Acesso em: 20 jul. 2021.

BONAM, Srinivasa Reddy; WANG, Fengjuan; MULLER, Sylviane. Autophagy: A new concept in autoimmunity regulation and a novel therapeutic option. *Journal of Autoimmunity*, v. 94, p. 16–32, 1 nov. 2018.

BRANDT, Kenneth D. THE EFFECT OF SYNOVIAL HYALURONATE ON THE INGESTION OF MONOSODIUM URATE CRYSTALS BY LEUKOCYTES. *Clinica Chimica Acta*, v. 55, p. 307–315, 1974.

BROSTJAN, Christine; OEHLER, Rudolf. The role of neutrophil death in chronic inflammation and cancer. *Cell Death Discovery 2020 6:1*, v. 6, n. 1, p. 1–8, 22 abr. 2020. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41420-020-0255-6>>. Acesso em: 5 ago.

2021.

BRZEZIŃSKA, Olga *et al.* Role of Vitamin C in Prophylaxis and Treatment of Gout—A Literature Review. *Nutrients*, v. 13, n. 2, p. 1–20, 1 fev. 2021. Disponível em: </pmc/articles/PMC7926958/>. Acesso em: 20 jul. 2021.

BUMA, P *et al.* Neurovascular Plasticity in the Knee Joint of an Arthritic Mouse Model. *Anat Rec*, v. 260, p. 51–61, 2000.

BUSSO, Nathalie; EA, H. K. The mechanisms of inflammation in gout and pseudogout (CPP-induced arthritis). *Reumatismo*, v. 63, n. 4, p. 230–237, 2011.

BUSSO, Nathalie; SO, Alexander. Gout. Mechanisms of inflammation in gout. *Arthritis Research & Therapy*, v. 12, n. 2, p. 206, 26 abr. 2010. Disponível em: </pmc/articles/PMC2888190/>. Acesso em: 20 jul. 2021.

BUTTGEREIT, Frank; WEHLING, Martin; BURMESTER, Gerd-Rudiger. A NEW HYPOTHESIS OF MODULAR GLUCOCORTICOID ACTIONS Steroid Treatment of Rheumatic Diseases Revisited. v. 41, n. 5, p. 761–767, 2004.

CAO, Zhenrui *et al.* Interaction between autophagy and the NLRP3 inflammasome. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, v. 51, n. 11, p. 1087–1095, 18 nov. 2019. Disponível em: <https://academic.oup.com/abbs/article/51/11/1087/5586913>. Acesso em: 10 fev. 2021.

CENTER FOR SKELETAL RESEARCH. *Decalcification of Bone*. Disponível em: <https://www.csr-mgh.org/wp-content/uploads/2017/04/Decalcification_of_Bone2017-1.pdf>. Acesso em: 30 jul. 2021.

CHEN, Baofeng *et al.* Curcumin attenuates MSU crystal-induced inflammation by inhibiting the degradation of I κ B α and blocking mitochondrial damage. *Arthritis Research & Therapy*, v. 21, n. 1, 2019. Disponível em: </pmc/articles/PMC6712780/>. Acesso em: 24 jul. 2021.

CHEN, Chun-Jen *et al.* MyD88-dependent IL-1 receptor signaling is essential for gouty inflammation stimulated by monosodium urate crystals. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 116, n. 8, p. 2262, 1 ago. 2006. Disponível em: </pmc/articles/PMC1523415/>. Acesso em: 21 jul. 2021.

CHEN, Junwei *et al.* The Immunological Basis in the Pathogenesis of Gout. *Iran J Immunol*, v. 14, n. 2, p. 90–98, 2017.

CHOI, Hyon K. *et al.* Purine-Rich Foods, Dairy and Protein Intake, and the Risk of Gout in Men. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa035700>, v. 350, n. 11, p. 1093–1103, 8 out. 2009. Disponível em: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa035700>. Acesso em: 20 jul. 2021.

CHROUSOS, George P. The Hypothalamic–Pituitary–Adrenal Axis and Immune-Mediated Inflammation. *http://dx.doi.org/10.1056/NEJM199505183322008*, v. 332, n. 20, p. 1351–1363, 20 ago. 2009. Disponível em: <<https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJM199505183322008>>. Acesso em: 3 ago. 2021.

COELHO, Fernanda M. *et al.* The chemokine receptors CXCR1/CXCR2 modulate antigen-induced arthritis by regulating adhesion of neutrophils to the synovial microvasculature. *Arthritis & Rheumatism*, v. 58, n. 8, p. 2329–2337, 1 ago. 2008. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/art.23622>>. Acesso em: 6 ago. 2021.

COX, Peter *et al.* The incidence and prevalence of cardiovascular diseases in gout: a systematic review and meta-analysis. *Rheumatology International*, v. 1, p. 3, 13 maio 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00296-021-04876-6>>. Acesso em: 27 maio 2021.

CRUZ, Cristiane M. *et al.* ATP Activates a Reactive Oxygen Species-dependent Oxidative Stress Response and Secretion of Proinflammatory Cytokines in Macrophages. *The Journal of biological chemistry*, v. 282, n. 5, p. 2871, 2 jan. 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/162693903/>>. Acesso em: 5 ago. 2021.

CUNHA, Thiago M. *et al.* Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 83, n. 4, p. 824–832, 1 abr. 2008. Disponível em: <<https://jlb.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1189/jlb.0907654>>. Acesso em: 6 ago. 2021.

DALBETH, Nicola *et al.* Gout. *Nature reviews. Disease primers*, v. 5, n. 1, p. 69, 26 set. 2019. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31558729>>. Acesso em: 11 out. 2019.

DALBETH, Nicola; MERRIMAN, Tony R.; STAMP, Lisa K. *Gout. The Lancet*. [S.l.]: Lancet Publishing Group. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673616003469>>. Acesso em: 8 set. 2020. , 22 out. 2016

DESAI, Jyaysi *et al.* PMA and crystal-induced neutrophil extracellular trap formation involves RIPK1-RIPK3-MLKL signaling. *European Journal of Immunology*, v. 46, n. 1, p. 223–229, 1 jan. 2016. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/eji.201545605>>. Acesso em: 20 jul. 2021.

DINARELLO, Charles A. How Interleukin-1 β Induces Gouty Arthritis. *Arthritis and rheumatism*, v. 62, n. 11, p. 3140, nov. 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/203534984/>>. Acesso em: 21 jul. 2021.

DOHERTY, Michael *et al.* Efficacy and cost-effectiveness of nurse-led care involving

education and engagement of patients and a treat-to-target urate-lowering strategy versus usual care for gout: a randomised controlled trial. *The Lancet*, v. 392, n. 10156, p. 1403–1412, 20 out. 2018. Disponível em: <<http://www.thelancet.com/article/S0140673618321585/fulltext>>. Acesso em: 12 jul. 2021.

DOSTERT, Catherine *et al.* Innate Immune Activation Through Nalp3 Inflammasome Sensing of Asbestos and Silica. *Science (New York, N.Y.)*, v. 320, n. 5876, p. 674, 2 maio 2008. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC2396588/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18321585/)>. Acesso em: 5 ago. 2021.

EMPSON, Victoria G; MCQUEEN, Fiona M; DALBETH, Nicola. The natural killer cell: a further innate mediator of gouty inflammation? *Immunology and Cell Biology*, v. 88, n. 1, p. 24–31, 1 jan. 2010. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1038/icb.2009.91>>. Acesso em: 20 jul. 2021.

FAUCI, A. S. Corticosteroids in autoimmune disease. *Hospital Practice*, v. 18, n. 10, p. 99–114, 1983.

FITZGERALD, John D. *et al.* 2020 American College of Rheumatology Guideline for the Management of Gout. *Arthritis & Rheumatology*, v. 72, n. 6, p. 879–895, 1 jun. 2020. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/art.41247>>. Acesso em: 24 jul. 2021.

FRANK, Daniel; VINCE, James E. Pyroptosis versus necroptosis: similarities, differences, and crosstalk. *Cell Death & Differentiation* 2018 26:1, v. 26, n. 1, p. 99–114, 19 out. 2018. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41418-018-0212-6>>. Acesso em: 6 ago. 2021.

FREUDWEILER, Max; BRILL, Joseph M.; MCCARTY, Daniel J. Experimental investigations into the origin of gouty tophi. *Arthritis & Rheumatism*, v. 8, n. 2, p. 267–269, 1965.

GALVÃO, Izabela. Mecanismos envolvidos na resposta inflamatória e resolutive em um modelo murino de gota Mecanismos envolvidos na resposta inflamatória e resolutive em um modelo murino de gota. 2015.

GALVÃO, Izabela *et al.* ROCK Inhibition Drives Resolution of Acute Inflammation by Enhancing Neutrophil Apoptosis. *Cells*, v. 8, n. 9, 23 ago. 2019. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC6769994/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3141418/)>. Acesso em: 27 jul. 2021.

GARLANDA, Cecilia; DINARELLO, Charles A.; MANTOVANI, Alberto. The Interleukin-1 Family: Back to the Future. *Immunity*, v. 39, n. 6, p. 1003–1018, 12 dez. 2013.

GHAEMI-OSKOUIE, Faranak; SHI, Yan. The role of uric acid as an endogenous danger signal in immunity and inflammation. *Current Rheumatology Reports*, v. 13, n. 2, p.

160–166, abr. 2011. Disponível em: </pmc/articles/PMC3093438/?report=abstract>. Acesso em: 2 fev. 2021.

GREEN, Douglas R.; LLAMBI, Fabien. Cell Death Signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v. 7, n. 12, 1 dez. 2015. Disponível em: </pmc/articles/PMC4665079/>. Acesso em: 6 ago. 2021.

GROS, Frédéric; MULLER, Sylviane. Pharmacological regulators of autophagy and their link with modulators of lupus disease. *British Journal of Pharmacology*, v. 171, n. 19, p. 4337, 1 out. 2014. Disponível em: </pmc/articles/PMC4209143/>. Acesso em: 24 jul. 2021.

GUERNE, Pierre-André *et al.* Inflammatory microcrystals stimulate interleukin-6 production and secretion by human monocytes and synoviocytes. *Arthritis & Rheumatism*, v. 32, n. 11, p. 1443–1452, 1 nov. 1989. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/anr.1780321114>. Acesso em: 20 jul. 2021.

HARRIS, James *et al.* Autophagy and inflammasomes. *Molecular Immunology*, v. 86, p. 10–15, 1 jun. 2017.

HARRIS, Mark D.; SIEGEL, Lori B.; ALLOWAY, Jeffrey A. Gout and Hyperuricemia. *American Family Physician*, v. 59, n. 4, p. 925, 15 fev. 1999.

JOOSTEN, Leo A. B. *et al.* Engagement of fatty acids with toll-like receptor 2 drives interleukin-1 β production via the ASC/caspase 1 pathway in monosodium urate monohydrate crystal-induced gouty arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, v. 62, n. 11, p. 3237–3248, 1 nov. 2010. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/art.27667>. Acesso em: 20 jul. 2021.

KANEVETS, Uliana *et al.* A role of IgM antibodies in monosodium urate crystal formation and associated adjuvant activity. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, v. 182, n. 4, p. 1912, 15 fev. 2009. Disponível em: </pmc/articles/PMC2663336/>. Acesso em: 20 jul. 2021.

KERR, J F R; WYLLIE, A H; CURRIE, A R. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wideranging Implications in Tissue Kinetics. *British Journal of Cancer* 1972 26:4, v. 26, n. 4, p. 239–257, 1972. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/bjc197233>. Acesso em: 6 ago. 2021.

KIMURA, Y *et al.* High dose, alternate day corticosteroids for systemic onset juvenile rheumatoid arthritis - PubMed. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10955346/>. Acesso em: 3 ago. 2021.

KLÜCK, Viola *et al.* Dapansutrile, an oral selective NLRP3 inflammasome inhibitor, for treatment of gout flares: an open-label, dose-adaptive, proof-of-concept, phase 2a trial.

The Lancet Rheumatology, v. 2, n. 5, p. e270, 1 maio 2020. Disponível em: </pmc/articles/PMC7523621/>. Acesso em: 21 jul. 2021.

KUO, Chang-Fu *et al.* Global epidemiology of gout: prevalence, incidence and risk factors. *Nature Reviews Rheumatology* 2015 11:11, v. 11, n. 11, p. 649–662, 7 jul. 2015. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrrheum.2015.91>. Acesso em: 20 jul. 2021.

LINDLER, Breanna N. *et al.* Use of Herbal Medications for Treatment of Osteoarthritis and Rheumatoid Arthritis. *Medicines*, v. 7, n. 11, p. 67, 28 out. 2020. Disponível em: </pmc/articles/PMC7693010/>. Acesso em: 11 jul. 2021.

LIU, Ru; AUPPERLE, Karl; TERKELTAUB, Robert. Src family protein tyrosine kinase signaling mediates monosodium urate crystal-induced IL-8 expression by monocytic THP-1 cells. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 70, n. 6, p. 961–968, 1 dez. 2001. Disponível em: <https://jlb.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1189/jlb.70.6.961>. Acesso em: 20 jul.2021.

LORDÊLO VIVAS, Wanessa P. Manual Prático de Hematologia. 2012.

MACRI, Christophe *et al.* Modulation of deregulated chaperone-mediated autophagy by a phosphopeptide. *Autophagy*, v. 11, n. 3, p. 472–86, 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25719862>. Acesso em: 23 out. 2019.

MARTILLO, Miguel A.; NAZZAL, Lama; CRITTENDEN, Daria B. The crystallization of monosodium urate. *Current Rheumatology Reports*, v. 16, n. 2, p. 400, fev. 2014. Disponível em: </pmc/articles/PMC3975080/?report=abstract>. Acesso em: 8 set. 2020.

MARTINON, Fabio *et al.* Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature*, v. 440, n. 7081, p. 237–41, 9 mar. 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16407889>. Acesso em: 14 out. 2019.

MARTINON, Fabio; TSCHOPP, Jürg. Inflammatory Caspases: Linking an Intracellular Innate Immune System to Autoinflammatory Diseases. *Cell*, v. 117, n. 5, p. 561– 574, 28 maio 2004. Disponível em: <http://www.cell.com/article/S0092867404004908/fulltext>. Acesso em: 20 jul. 2021.

MITROULIS, Ioannis; KAMBAS, Konstantinos; RITIS, Konstantinos. Neutrophils, IL-1 β , and gout: is there a link? *Seminars in Immunopathology* 2013 35:4, v. 35, n. 4, p. 501– 512, 24 jan. 2013. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00281-013-0361-0>. Acesso em: 24 jul. 2021.

MITROULIS, Ioannis; SKENDROS, Panagiotis; RITIS, Konstantinos. Targeting IL-

1 β in disease; the expanding role of NLRP3 inflammasome. *European Journal of Internal Medicine*, v. 21, n. 3, p. 157–163, 1 jun. 2010. Disponível em:

<<http://www.ejinme.com/article/S0953620510000488/fulltext>>. Acesso em: 30 jul. 2021.

MONNEAUX, Fanny *et al.* Importance of spliceosomal RNP1 motif for intermolecular T-B cell spreading and tolerance restoration in lupus. *Arthritis Research & Therapy*, v. 9, n. 5, p. R111, 26 out. 2007. Disponível em: <pmc/articles/PMC2212579/>.

Acesso em: 24 jul. 2021.

MONNEAUX, Fanny *et al.* T cell recognition and therapeutic effect of a phosphorylated synthetic peptide of the 70K snRNP protein administered in MRL/lpr mice. *European Journal of Immunology*, v. 33, n. 2, p. 287–296, 1 fev. 2003. Disponível em:

<<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/immu.200310002>>. Acesso em: 24 jul. 2021.

MULLER, Sylviane. Autophagie, auto-immunité et maladies auto-immunes. *Medecine/Sciences*, v. 33, n. 3, p. 319–327, 1 mar. 2017. Disponível em:

<https://www.medecinesciences.org/articles/medsci/full_html/2017/03/medsci20173303p319/medsci20173303p319.html>. Acesso em: 22 jun. 2021.

MULLER, Sylviane. Excipients: not so inert? When the excipient plays the role of an active substance, as exemplified by systemic lupus. *Swiss Medical Weekly* 2018 148:2526, v. 148, n. 2526, p. w14631, 1 jul. 2018. Disponível em:

<<https://smw.ch/article/doi/smw.2018.14631>>. Acesso em: 20 jul. 2021.

MUNSTER, Tino *et al.* Hydroxychloroquine concentration–response relationships in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, v. 46, n. 6, p. 1460–1469, 1 jun. 2002. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/art.10307>>. Acesso em: 13 jul. 2021.

NAKAZAWA, Daigo *et al.* Pathogenesis and therapeutic interventions for ANCA-associated vasculitis. *Nature Reviews Rheumatology* 2018 15:2, v. 15, n. 2, p. 91–101, 12 dez. 2018. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41584-018-0145-y>>. Acesso em: 6 ago. 2021.

NUKI, George; SIMKIN, Peter A. *A concise history of gout and hyperuricemia and their treatment*. *Arthritis Research and Therapy*. [S.l.]: BioMed Central. Disponível em: <pmc/articles/PMC3226106/>. Acesso em: 27 maio 2021. , abr. 2006

PAGE, Nicolas *et al.* HSC70 blockade by the therapeutic peptide P140 affects autophagic processes and endogenous MHCII presentation in murine lupus. *Annals of the Rheumatic Diseases*, v. 70, n. 5, p. 837–843, 2011.

PAGE, Nicolas *et al.* The Spliceosomal Phosphopeptide P140 Controls the Lupus Disease by Interacting with the HSC70 Protein and via a Mechanism Mediated by $\gamma\delta$ T Cells. *PLoS ONE*, v. 4, n. 4, p. e5273, 23 abr. 2009. Disponível em:

<<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0005273>>. Acesso em: 19 jan. 2021.

PILLINGER, Michael H.; MANDELL, Brian F. Therapeutic approaches in the treatment of gout. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, v. 50, n. 3, p. S24–S30, 1 jun. 2020.

PINHO, Vanessa *et al.* Tissue- and Stimulus-Dependent Role of Phosphatidylinositol 3-Kinase Isoforms for Neutrophil Recruitment Induced by Chemoattractants In Vivo. *The Journal of Immunology*, v. 179, n. 11, p. 7891–7898, 1 dez. 2007. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/content/179/11/7891><http://www.jimmunol.org/content/179/11/7891.full#ref-list-1>>. Acesso em: 23 jun. 2021.

POPA-NITA, Oana; NACCACHE, Paul H. Crystal-induced neutrophil activation. *Immunology and Cell Biology*, v. 88, n. 1, p. 32–40, 1 jan. 2010. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1038/icb.2009.98>>. Acesso em: 22 jul. 2021.

RAGAB, Gaafar; ELSHAHALY, Mohsen; BARDIN, Thomas. *Gout: An old disease in new perspective – A review*. *Journal of Advanced Research*. [S.l.]: Elsevier B.V., 1 set. 2017

RAI, Sharan K *et al.* Key barriers to gout care: a systematic review and thematic synthesis of qualitative studies. *Rheumatology*, v. 57, n. 7, p. 1282–1292, 1 jul. 2018. Disponível em: <<https://academic.oup.com/rheumatology/article/57/7/1282/4975002>>. Acesso em: 21 jul. 2021.

RASHIDI, Maryam *et al.* The pyroptotic cell death effector Gasdermin D is activated by gout-associated uric acid crystals but is dispensable for cell death and IL-1 β release. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, v. 203, n. 3, p. 736, 1 ago. 2019. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC6650356/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31111111/)>. Acesso em: 21 jul. 2021.

REES, Frances; HUI, Michelle; DOHERTY, Michael. *Optimizing current treatment of gout*. *Nature Reviews Rheumatology*. [S.l.]: Nature Publishing Group. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nrrheum.2014.32>>. Acesso em: 27 maio 2021. , 11 mar. 2014

RETNAKUMAR, Sruthi Vijaya; MULLER, Sylviane. Pharmacological Autophagy Regulators as Therapeutic Agents for Inflammatory Bowel Diseases. *Trends in Molecular Medicine*, v. 25, n. 6, p. 516–537, 1 jun. 2019. Disponível em: <<http://www.cell.com/article/S1471491419300528/fulltext>>. Acesso em: 24 jul. 2021.

RODDY, Edward; DOHERTY, Michael. Treatment of hyperuricaemia and gout.

Clinical Medicine, v. 13, n. 4, p. 400, 1 ago. 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24312122/>. Acesso em: 13 jul. 2021.

SCHALL, Nicolas *et al.* Peptide-based approaches to treat lupus and other autoimmune diseases. *Journal of Autoimmunity*, v. 39, n. 3, p. 143–153, 1 set. 2012.

SCHAUER, Christine *et al.* Aggregated neutrophil extracellular traps limit inflammation by degrading cytokines and chemokines. *Nature Medicine* 2014 20:5, v. 20, n. 5, p. 511–517, 28 abr. 2014. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nm.3547>. Acesso em: 20 jul. 2021.

SCHRODER, Kate; TSCHOPP, Jurg. The Inflammasomes. *Cell*, v. 140, n. 6, p. 821–832, 19 mar. 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20303873>. Acesso em: 17 jun. 2019.

SCHWARTZ, Stephan A. Disease of Distinction. *EXPLORE*, v. 2, n. 6, p. 515–519, 1 nov. 2006.

SHI, Chong-Shan *et al.* Activation of autophagy by inflammatory signals limits IL-1 β production by targeting ubiquitinated inflammasomes for destruction. *Nature Immunology* 2012 13:3, v. 13, n. 3, p. 255–263, 29 jan. 2012. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/ni.2215>. Acesso em: 5 ago. 2021.

SHI, Yan; MUCSI, Ashley D.; NG, Gilbert. Monosodium urate crystals in inflammation and immunity. *Immunological Reviews*, v. 233, n. 1, p. 203–217, jan. 2010.

SO, Alexander *et al.* A pilot study of IL-1 inhibition by anakinra in acute gout. *Arthritis Research & Therapy*, v. 9, n. 2, p. R28, 12 mar. 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16680606/>. Acesso em: 21 jul. 2021.

SO, Alexander. How to regulate neutrophils in gout. *Arthritis Research & Therapy*, v. 15, n. 5, p. 118, 25 set. 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24312122/>. Acesso em: 5 ago. 2021.

SO, Alexander K.; MARTINON, Fabio. *Inflammation in gout: Mechanisms and therapeutic targets*. *Nature Reviews Rheumatology*. [S.l.]: Nature Publishing Group, 2017

SOUSA, Lirlândia P. *et al.* PDE4 inhibition drives resolution of neutrophilic inflammation by inducing apoptosis in a PKA-PI3K/Akt-dependent and NF- κ B-independent manner. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 87, n. 5, p. 895–904, 1 maio 2010. Disponível em: www.jleukbio.org. Acesso em: 23 jun. 2021.

STAMP, Lisa K; DALBETH, Nicola. Prevention and treatment of gout. *Nature Reviews Rheumatology* 2018 15:2, v. 15, n. 2, p. 68–70, 13 dez. 2018. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41584-018-0149-7>. Acesso em: 12 jul. 2021.

T, Bardin; P, Varghese Cherian; HR, Schumacher. Immunoglobulins on the surface of monosodium urate crystals: an immunoelectron microscopic study. *The Journal of Rheumatology*, v. 11, n. 3, p. 339–341, 1 jun. 1984. Disponível em: <<https://europepmc.org/article/med/6737374>>. Acesso em: 20 jul. 2021.

TELES, Kaian Amorim *et al.* Rotina de administração de ciclofosfamida em doenças autoimunes reumáticas: uma revisão. *Revista Brasileira de Reumatologia*, v. 57, n. 6, p. 596–604, 1 nov. 2017.

TERKELTAUB, Robert. Update on gout: new therapeutic strategies and options. *Nature Reviews Rheumatology* 2010 6:1, v. 6, n. 1, p. 30–38, jan. 2010. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nrrheum.2009.236>>. Acesso em: 30 jul. 2021.

TSEUGUEM, Pius Pum; NGUELEFACK, Téléphore Benoît; *et al.* Aqueous and Methanol Extracts of Paullinia pinnata (Sapindaceae) Improve Monosodium Urate-Induced Gouty Arthritis in Rat: Analgesic, Anti-Inflammatory, and Antioxidant Effects. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine: eCAM*, v. 2019, 2019. Disponível em: <[pmc/articles/PMC6915157/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36915157/)>. Acesso em: 5 ago. 2021.

TSEUGUEM, Pius Pum; NGANGOUM, Douglas Alphonse Mouga; *et al.* Aqueous and methanol extracts of Paullinia pinnata L. (Sapindaceae) improve inflammation, pain and histological features in CFA-induced mono-arthritis: Evidence from in vivo and in vitro studies. *Journal of ethnopharmacology*, v. 236, p. 183, 23 maio 2019. Disponível em: <[pmc/articles/PMC6484438/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36484438/)>. Acesso em: 5 ago. 2021.

VAGO, Juliana P. *et al.* Annexin A1 modulates natural and glucocorticoid-induced resolution of inflammation by enhancing neutrophil apoptosis. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 92, n. 2, p. 249–258, 1 ago. 2012. Disponível em: <www.jleukbio.org>. Acesso em: 23 jun. 2021.

VAPRATH KUNIYIL, Aswathi Rajan *et al.* Efficacy of Ayurvedic treatment protocol in gouty arthritis – a clinical study. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*, v. 0, n. 0, 11 maio 2021. Disponível em: <<https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/jcim-2020-0301/html>>. Acesso em: 27 maio 2021.

VARDANYAN, Ruben; HRUBY, Victor. Immunopharmacological Drugs. *Synthesis of Best-Seller Drugs*, p. 549–572, 1 jan. 2016.

VIEIRA, Angélica T. *et al.* A role for gut microbiota and the metabolite-sensing receptor GPR43 in a murine model of gout. *Arthritis and Rheumatology*, v. 67, n. 6, p. 1646–1656, 1 jun. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25914377/>>. Acesso em: 1 jun. 2021.

VIEIRA, Angélica T. *et al.* Dietary fiber and the short-chain fatty acid acetate promote resolution of neutrophilic inflammation in a model of gout in mice. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 101, n. 1, p. 275–284, jan. 2017.

VOMERO, Marta *et al.* Autophagy and Rheumatoid Arthritis: Current Knowledges and Future Perspectives. *Frontiers in Immunology*, v. 9, n. JUL, p. 1, 18 jul. 2018. Disponível em: </pmc/articles/PMC6058034/>. Acesso em: 24 jul. 2021.

WALLACE, Daniel. *A 52-Week, Randomized, Double-Blind, Parallel-Group, Placebo-Controlled Study to Evaluate the Efficacy and Safety of a 200-mcg Dose of IPP- 201101 Plus Standard of Care in Patients With Systemic Lupus Erythematosus - Full Text View* - *ClinicalTrials.gov*. Disponível em: <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02504645>. Acesso em: 23 jun. 2021.

WANG, Fengjuan *et al.* Assessing Autophagy in Mouse Models and Patients with Systemic Autoimmune Diseases. *Cells*, v. 6, n. 3, p. 16, 28 jun. 2017. Disponível em: </pmc/articles/PMC5617962/>. Acesso em: 21 jul. 2021.

WANG, Fengjuan *et al.* In Vivo Remodeling of Altered Autophagy-Lysosomal Pathway by a Phosphopeptide in Lupus. *Cells*, v. 9, n. 10, 20 out. 2020. Disponível em: </pmc/articles/PMC7589999/>. Acesso em: 10 fev. 2021.

WANG, Xiang; WANG, Yan-gang. Progress in Treatment of Gout Using Chinese and Western Medicine. *Chinese Journal of Integrative Medicine* 2019 26:1, v. 26, n. 1, p. 8–13, 18 jan. 2019. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11655-019-3058-y>. Acesso em: 12 jul. 2021.

WEBER, Alexander N. R. *et al.* Recent insights into the regulatory networks of NLRP3 inflammasome activation. *Journal of Cell Science*, v. 133, n. 23, 1 dez. 2020.

WHITE, William B. *et al.* Cardiovascular Safety of Febuxostat or Allopurinol in Patients with Gout. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1710895>, 12 mar. 2018. Disponível em: <https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1710895>. Acesso em: 12 jul. 2021.

WILHELM, Maud *et al.* Lupus Regulator Peptide P140 Represses B Cell Differentiation by Reducing HLA Class II Molecule Overexpression. *Arthritis and Rheumatology*, v. 70, n. 7, p. 1077–1088, 1 jul. 2018. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/art.40470>. Acesso em: 5 maio 2020.

WOESSNER, Katharine M.; CASTELLS, Mariana. NSAID Single-Drug-Induced Reactions. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, v. 33, n. 2, p. 237–249, 1 maio 2013.

XIAO, Hong *et al.* Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies specific for

myeloperoxidase cause glomerulonephritis and vasculitis in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 110, n. 7, p. 955, 1 out. 2002. Disponível em: </pmc/articles/PMC151154/>. Acesso em: 6 ago. 2021.

XIU, Yan *et al.* Chloroquine reduces osteoclastogenesis in murine osteoporosis by preventing TRAF3 degradation. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 124, n. 1, p. 297–310, 2 jan. 2014. Disponível em: <http://www.jci.org>. Acesso em: 24 jul. 2021.

YAN, Yiqing *et al.* Omega-3 Fatty Acids Prevent Inflammation and Metabolic Disorder through Inhibition of NLRP3 Inflammasome Activation. *Immunity*, v. 38, n. 6, p. 1154–1163, 27 jun. 2013. Disponível em: <http://www.cell.com/article/S1074761313002422/fulltext>. Acesso em: 20 jul. 2021.

YIN, Chengyu; LIU, Boyu; WANG, Ping; *et al.* Eucalyptol alleviates inflammation and pain responses in a mouse model of gout arthritis. *British Journal of Pharmacology*, v. 177, n. 9, p. 2042–2057, 1 maio 2020.

YIN, Chengyu; LIU, Boyu; LI, Yuanyuan; *et al.* IL-33/ST2 induces neutrophil-dependent reactive oxygen species production and mediates gout pain. *Theranostics*, v. 10, n. 26, p. 12189, 2020. Disponível em: </pmc/articles/PMC7667675/>. Acesso em: 30 jul. 2021.

ZHANG, Xueyan *et al.* A Purified Biflavonoid Extract From *Selaginella moellendorffii* Alleviates Gout Arthritis via NLRP3/ASC/Caspase-1 Axis Suppression. *Frontiers in Pharmacology*, v. 12, p. 676297, 17 maio 2021. Disponível em: </pmc/articles/PMC8165565/>. Acesso em: 20 jul. 2021.

ZHU, Sheng yu *et al.* *Lysosomal quality control of cell fate: a novel therapeutic target for human diseases.* *Cell Death and Disease*. [S.l.]: Springer Nature. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41419-020-03032-5>. Acesso em: 20 fev. 2021. , 1 set. 2020

ZHU, Yanyan; PANDYA, Bhavik J.; CHOI, Hyon K. Prevalence of gout and hyperuricemia in the US general population: The National Health and Nutrition Examination Survey 2007–2008. *Arthritis & Rheumatism*, v. 63, n. 10, p. 3136–3141, 1 out. 2011. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/art.30520>. Acesso em: 20 jul. 2021.

ZIEGLER, H K; UNANUE, E R. Decrease in macrophage antigen catabolism caused by ammonia and chloroquine is associated with inhibition of antigen presentation to T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 79, n. 1, p. 175–178, 1 jan. 1982. Disponível em: <https://www.pnas.org/content/79/1/175>. Acesso em: 24 jul. 2021.

ZIMMER, Robert *et al.* Lupuzor/P140 peptide in patients with systemic lupus erythematosus: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase IIb clinical trial. *Annals*

of the rheumatic diseases, v. 72, n. 11, p. 1830–5, nov. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23172751>>. Acesso em: 21 out. 2019.

12. ANEXO 1 – Certificado CEUA (COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Estratégias Terapêuticas de Modulação da Resposta Inflamatória Utilizando o Modelo Experimental de Gota", protocolo do CEUA: 138/2020 sob a responsabilidade de Angelica Thomaz Vieira que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 14/09/2020.

Vigência da Autorização	14/09/2020 a 13/09/2025
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6
Nº de animais	20
Peso/Idade	18g / 8(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério Central
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6
Nº de animais	20
Peso/Idade	18g / 8(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério Central
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6
Nº de animais	20
Peso/Idade	18g / 8(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério Central
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6
Nº de animais	20

Peso/Idade	18g / 8(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério Central
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6
Nº de animais	20
Peso/Idade	18g / 8(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério Central

Considerações posteriores:

14/09/2020	Aprovado na reunião "on line" do dia 14/09/2020. Validade: 14/09/2020 à 13/09/2025.
------------	--

1 / 2

Belo Horizonte, 05/08/2021.

Atenciosamente,

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

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