

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Patologia

Izabela Aparecida de Souza

**IMUNOMODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE NA ARTRITE GOTOSA AGUDA
MURINA ATRAVÉS DA REPROGRAMAÇÃO DE MACRÓFAGOS**

Belo Horizonte

2023

Izabela Aparecida de Souza

**IMUNOMODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE NA ARTRITE GOTOSA AGUDA
MURINA ATRAVÉS DA REPROGRAMAÇÃO DE MACRÓFAGOS**

Versão Final Corrigida

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Geral da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para a obtenção do título de Mestre em Patologia Investigativa.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Gonçalves

Coorientador: Prof. Dr. Flávio Almeida
Amaral

Belo Horizonte

2023

043

Souza, Izabela Aparecida de.

Imunomodulação da Resposta Imune na Artrite Gotosa Aguda Murina através da Reprogramação de Macrófagos [manuscrito] / Izabela Aparecida de Souza. – 2023.

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

Orientador: Ricardo Gonçalves. Coorientador: Flávio Almeida Amaral.

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

1. Patologia. 2. Gota. 3. Macrófagos. 4. Interleucina-10. 5. Inflamação. I. Gonçalves, Ricardo. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 616



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
COLEGIADO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

FOLHA DE APROVAÇÃO

“IMUNOMODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE NA ARTRITE GOTOSA AGUDA MURINA ATRAVÉS DA REPROGRAMAÇÃO DE MACRÓFAGOS”

IZABELA APARECIDA DE SOUZA

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de **Pós-Graduação em Patologia**, como requisito para obtenção do grau de **Mestre em PATOLOGIA**, área de concentração **PATOLOGIA INVESTIGATIVA**.

Aprovada em 14 de novembro, pela banca constituída pelos membros:

Profa. Izabela Galvao– ICB/UFMG

Profa. Milene Alvarenga Rachid– ICB/UFMG

Prof. Ricardo Goncalves– ICB/UFMG – Orientador

Belo Horizonte, 14 de novembro de 2023



Documento assinado eletronicamente por **Ricardo Goncalves, Professor do Magistério Superior**, em 27/11/2023, às 08:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Milene Alvarenga Rachid, Servidor(a)**, em 01/12/2023, às 14:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Izabela Galvão, Usuária Externa**, em 04/12/2023, às 09:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2825183** e o código CRC **DAB612FF**.

AGRADECIMENTOS

Gostaria imensamente de expressar a minha profunda gratidão a todos que estiveram ao meu lado ao longo desta jornada repleta de desafios e conquistas. Primeiramente, um agradecimento especial aos meus amados animais Church e Poe, que trouxeram tanto amor e companheirismo para os meus dias. Ao Rock, em memória, cujas lembranças permanecem vívidas.

Quero expressar minha imensa gratidão ao Daniel, por sua inestimável ajuda, companheirismo e compreensão. Sua presença constante nos meus experimentos quase o tornou um aluno de mestrado do laboratório. À família do Daniel, que esteve sempre presente, fornecendo apoio em vários momentos. Aos meus queridos amigos, cujo apoio e descontração foram fundamentais para manter o equilíbrio em meio às demandas desafiadoras do dia a dia.

Um reconhecimento especial ao meu orientador, Ricardo Gonçalves, e ao meu coorientador, Flavio Amaral, cuja orientação e sabedoria foram fundamentais para o meu crescimento acadêmico e profissional. As reuniões de ambos os laboratórios, LABIM e Imunofarmacologia, foram de imensa importância para o meu desenvolvimento.

Agradeço aos laboratórios LABIM e Imunofarmacologia, assim como ao laboratório de apoptose, pelos recursos e ambiente propício que possibilitaram a realização dos estudos e experimentos. Helen Lima, seus ensinamentos valiosos em qRT-PCR foram cruciais para o sucesso das minhas pesquisas.

Agradeço imensamente aos amigos do laboratório, em especial Quel, Gabi e Pierre, por todo o suporte, colaboração e disposição em participar dos experimentos que muitas vezes se estenderam por até 24 horas.

Por fim, expresso minha gratidão às agências de fomento CAPES e CNPq, cujo apoio financeiro foi fundamental para a concretização deste trabalho e para a continuidade das pesquisas.

Cada um de vocês desempenhou um papel essencial nessa trajetória, e sou imensamente grata por todo o apoio, incentivo e colaboração que recebi. Esta jornada não teria sido a mesma sem a presença e o auxílio de cada um de vocês. Muito obrigada por fazerem parte desta conquista!

"O importante é não parar de questionar.
A curiosidade tem sua própria razão de existir."

Albert Einstein

RESUMO

A artrite gotosa é uma inflamação das articulações caracterizada pela deposição de cristais de MSU (urato monossódico) nas articulações. No contexto da inflamação gotosa, os macrófagos desempenham um papel paradoxal, participando da patogênese, bem como da resolução da inflamação. Essas células têm a capacidade de adaptar seus perfis de ativação com base no microambiente tecidual e contribuem para processos fisiológicos e patológicos, buscando alcançar a homeostase. O objetivo deste estudo foi investigar e avaliar o potencial terapêutico dos macrófagos regulatórios (Mreg), visando aprimorar a compreensão e a aplicação do seu efeito em um modelo de gota, com foco na diminuição dos sintomas inflamatórios e na prevenção de danos articulares. Desta forma, foram realizados estudos *in vitro*, utilizando macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs) e *in vivo* através de modelos experimentais de gota em camundongos. A reprogramação dos macrófagos para um perfil regulatório levou a uma redução na liberação de IL-12 e a um aumento na liberação de IL-10 em comparação com outros subtipos de macrófagos. Em estudos *in vitro*, a co-incubação dos Mreg com macrófagos primados com LPS e posterior desafio com agonistas do inflamassoma NLRP3 resultou em uma redução na liberação de IL-1 β , uma citocina chave na inflamação gotosa. Além disso, observamos também uma diminuição da IL-1 β no modelo de peritonite aguda induzida por MSU em camundongos ao injetar os Mreg. A partir disso, foram injetados cristais de MSU nas articulações tibiofemorais de camundongos, o que resultou em inflamação tecidual associada a um influxo significativo de leucócitos, principalmente neutrófilos. Ao realizar a terapia com Mreg na articulação houve uma redução no influxo de neutrófilos e de liberação da quimiocina CXCL1. Esses resultados preliminares fornecem perspectivas para investigações posteriores sobre o papel dos Mreg e da IL-10 na via do inflamassoma NLRP3 e da diminuição da inflamação, bem como a possibilidade de manipulação do fenótipo de macrófagos. O estudo destaca os macrófagos como potenciais alvos terapêuticos na gota. A reprogramação dos macrófagos em direção a um perfil anti-inflamatório pode ser uma abordagem eficaz no controle da doença. Esses achados têm o potencial de contribuir para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas inovadoras para a artrite gotosa.

Palavras-chave: Gota; IL-10; Macrófago; Macrófago Regulatório; Inflamação; IL-1 β .

ABSTRACT

Gouty arthritis is an inflammation of the joints characterized by the deposition of MSU crystals (monosodium urate) within the joints. Within the context of gouty inflammation, macrophages play a paradoxical role, participating in both the pathogenesis and resolution of inflammation. These cells have the ability to adapt their activation profiles based on the tissue microenvironment and contribute to physiological and pathological processes in seeking to achieve homeostasis. The aim of this study was to investigate and evaluate the therapeutic potential of regulatory macrophages (Mreg), aiming to enhance the understanding and application of their effects in a gout model, focusing on reducing inflammatory symptoms and preventing joint damage. Consequently, *in vitro* studies were conducted using bone marrow-derived macrophages (BMDMs) and *in vivo* experiments using gout models in mice. Reprogramming macrophages toward a regulatory profile led to a decrease in the release of IL-12 and an increase in the release of IL-10 compared to other macrophage subtypes. In *in vitro* studies, co-incubation of Mreg with LPS-primed macrophages and subsequent challenge with NLRP3 inflammasome agonists resulted in a reduction in the release of IL-1 β , a key cytokine in gouty inflammation. Additionally, a decrease in IL-1 β was observed in the model of acute peritonitis induced by MSU in mice upon injecting Mreg. Subsequently, MSU crystals were injected into the tibiofemoral joints of mice, resulting in tissue inflammation associated with a significant influx of leukocytes, mainly neutrophils. Administering Mreg therapy to the joints led to a reduction in the influx of neutrophils and the release of the chemokine CXCL1. These preliminary results provide perspectives for further investigations into the role of Mregs and IL-10 in the NLRP3 inflammasome pathway and inflammation reduction, as well as the potential for manipulating the macrophage phenotype. The study highlights macrophages as potential therapeutic targets in gout. Reprogramming macrophages towards an anti-inflammatory profile could be an effective approach in disease management. These findings have the potential to contribute to the development of innovative therapeutic strategies for gouty arthritis.

Keywords: Gout; IL-10; Macrophage; Regulatory Macrophage; Inflammation; IL-1 β .

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

ACP	American College of Physicians (Colégio Americano De Médicos)
ADA	Adenosina Desaminase
ADO	Adenosina
ADP	Adenosina Difosfato
AINEs	Anti-Inflamatórios Não Esteroides
AMP	Adenosina Monofosfato
APC	Célula Apresentadora de Antígeno
ApoB	Apolipoproteína B
ApoE	Apolipoproteína E
Arg-1	Arginase-1
ASC	Apoptosis-Associated Speck-Like Protein Containing A Card
ATP	Adenosina Trifosfato
AUC	Ácido Úrico Circulante
BMDM	Bone Marrow-Derived Macrophages (Macrófagos Derivados de Medula Óssea)
CAPI	Centro de Aquisição e Processamento de Imagens
CARD	Caspase Activation and Recruitment Domain

CCL1	C-C Motif Chemokine Ligand 1
CD163	Cluster of Differentiation 163
CD206	Cluster of Differentiation 206
CD209	Cluster of Differentiation 209
CD80	Cluster of Differentiation 80
CD86	Cluster of Differentiation 86
CEUA	Comissão de Ética no Uso De Animais
CLIC	Proteína do Canal Intracelular de Cloreto
COX-2	Ciclooxigenase-2
CTH	Célula-Tronco Hematopoiética
CXCL1	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1
CXCL9/10/11	Chemokine (C-X-C motif) Ligand 9/10/11
DAMPs	Padrões Moleculares Associados a Danos
DC	Células Dendríticas
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Meio de Eagle Modificado por Dulbecco)
DNA	Ácido Desoxirribonucleico

E-IgG	Imunocomplexos Formados com Hemácias de Carneiro e IgG anti-hemácias de carneiro
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Ensaio Imunoenzimático Ligado A Enzimas)
ERK	Extracellular Signal-Regulated Kinase
EULAR	Liga Europeia Contra o Reumatismo
FCγR	Fc Gamma Receptor
FFA	Free Fatty Acid
Fizz1	Found In Inflammatory Zone 1
GDA	Guanina Desaminase
GlcNAc	N-Acetilglucosamina
GMP	Guanosina Monofosfato
GSDMD	Gasdermina D
GTP	Guanosina Trifosfato
HK	Hexoquinase
IBP	Inibidores da Bomba de Prótons
IC	Imunocomplexo
ICAM-1	Molécula de Adesão Intercelular-1

ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IECA	Inibidores da Enzima Conversora De Angiotensina
IFNAR	Receptor IFN A/B
IFNGR	Interferon-gamma Receptor
IFN- β	Interferon-B
IFN- γ	Interferon-Gama
IgG	Imunoglobulina G
IL-1	Interleukin-1
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina-12
IL-13	Interleucina-13
IL-1R	Interleukin-1 Receptor
IL-1Ra	Antagonista Do Receptor De Interleucina 1
IL-1 β	Interleucina-1 β
IL-23	Interleucina-23
IL-4	Interleucina-4

IL-4R α	Interleukin-4 Receptor Alpha
IL-6	Interleucina-6
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Induzível
IRF	Fator Regulador do Interferon
IRF3	Fator Regulador de Interferon 3
JAK	Janus Kinase
KLF4	Krüppel-Like Factor 4
LIGHT	Lymphotoxin-like, Exhibiting Inducible Expression, and Competing with HSV Glycoprotein D for HVEM, a Receptor Expressed by T Lymphocytes
LPS	Lipopolissacarídeo
LRR	Repetições Ricas em Leucinas
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MAVS	Proteína de Sinalização Antiviral Mitocondrial
M-CSF	Macrophage Colony-Stimulating Factor (Fator Estimulante De Colônia de Macrófagos)
MDP	Dipeptídeo Muramil
MES	2-(N-Morpholino)Ethanesulfonic Acid" (Ácido 2-(N-Morfolino)Etanossulfônico)
MHC-II	Major Histocompatibility Complex Class II

MSU	Monosodium Urate (Urato Monossódico)
mtROS	Espécies Reativas de Oxigênio Mitocondrial
MYD88	Myeloid Differentiation 88
MΦ	Macrófago
NAOH	Hidróxido de Sódio
NEK7	Quinase 7 Relacionada ao Nima
NETs	Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos
NF- κB	Fator Nuclear Kappa B
NIMA	Never in Mitosis Gene A
NK	Natural Killer
NLRP3	Nod-, Lrr- And Pyrin Domain-Containing Protein 3 (Proteína Contendo Domínio Nod, Lrr E Pirina 3)
NO	Óxido Nítrico
Ox-mtDNA	DNA Mitocondrial Oxidado
P2X7	Purinoceptor P2X7
PAF	Fator de Ativação de Plaquetas
PAMPs	Padrões Moleculares Associados a Patógenos

PBS	Phosphate-Buffered Saline (Solução Salina Tamponada Com Fosfato)
PGE2	Prostaglandina E2
PNP	Purine Nucleoside Phosphorylase (Purina Nucleosídeo Fosforilase)
PPAR γ	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma
PRRs	Receptores de Reconhecimento Padrão
PYD	Domínio de Pirina
qRT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa com Transcrição Reversa
RELM α	Molécula Semelhante à Resistina A
RM ϕ s	Macrófagos Regulatórios
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SFB	Soro Fetal Bovino
SOCS1	Suppressor of Cytokine Signaling 1
SP1	Specificity Protein 1
SRBC	Sheep Red Blood Cell (Célula Vermelha de Sangue de Ovelha)
STAT1	Signal Transducer and Activator Of Transcription 1
SYK	Spleen Tyrosine Kinase

TCD8 ⁺	Células T Citotóxicas CD8 ⁺
TGFβ	Transforming Growth Factor Beta
T _H 1	T Helper 1
TLR	Toll-Like Receptor (Receptor Tipo Toll)
TNF	Tumor Necrosis Factor (Fator De Necrose Tumoral)
TNFR	Receptor do Fator de Necrose Tumoral
TNF-α	Tumor Necrosis Factor-alpha
TRADD	TNF Receptor-Associated Death Domain
TRIF	TIR-Domain-Containing Adapter-Inducing Interferon-B
TWIK2	Domínio de Dois Poros Fraco Retificando Internamente K ⁺ Canal 2
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UI	Unidade Internacional
ULT	Terapia de Redução de Uratos
VCAM-1	Adesão Celular Vascular-1
XO	Xantina Oxidase
XOI	Inibidores da Xantina Oxidase

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Metabolismo de purinas, hiperuricemia e formação dos cristais de MSU.	26
Figura 2 - Priming e ativação do inflamassoma.	34
Figura 3 - Perfil e Funções das Subpopulações de Macrófagos na Resposta Imune.	50
Figura 4 - Diferenciação das células da medula óssea em macrófagos.	60
Figura 5 - Experimento in vitro com cristais de MSU e ATP	65
Figura 6 - Experimento Peritônio com cristais de MSU	67
Figura 7 - Isolamento e estímulo de macrófagos da medula óssea.	72
Figura 8 - O aumento da concentração de anticorpos IgG de coelho desencadeia maior liberação de IL-10.	74
Figura 9 - Quantificação relativa de mRNA por qRT-PCR.	75
Figura 10 - Cinética da expressão de mRNA e da liberação de citocinas por macrófagos ativados em diferentes perfis.	77
Figura 11 - M(IgG-IgG), M(beads-IgG-IgG) e M(beads-IgGA) na concentração de 3,0 mg/ml de IgG de coelho diminuem os níveis de IL-12 e aumentam os níveis de IL-10.	79
Figura 12 - Imunocomplexos com hemácias de ovelha aumentaram a liberação de IL-10 e não produziram IL-12.	80
Figura 13 - Quantificação relativa de mRNA dos M(e-IgG) por qRT-PCR.	81
Figura 14 - Avaliação da Polarização dos Macrófagos por ELISA.	82
Figura 15 - Primeira estratégia experimental.	83
Figura 16 - O coestímulo de IC com LPS aumentou a liberação de IL-10 e diminuiu a liberação de IL-12 quando comparado ao controle positivo.	85
Figura 17 - O coestímulo de IC com LPS diminuiu a liberação de IL-1β quando comparado ao controle positivo.	85
Figura 18 - Segunda estratégia experimental.	86
Figura 19 - Redução de citocinas inflamatórias em co-culturas de BMDM com M(e-IgG) desafiados com agonistas do inflamassoma NLRP3.	87
Figura 20 - Macrófagos regulatórios diminuem a liberação de IL-1β em modelo de peritonite aguda induzida por cristais de MSU em camundongos.	89
Figura 21 - Indução da gota e cinética da inflamação.	90
Figura 22 - Cinética da inflamação articular através da contagem de leucócitos totais, neutrófilos e mononucleares.	91
Figura 23 - Cinética da inflamação articular através da dosagem de IL-1β.	92
Figura 24 - Macrófagos regulatórios diminuem o influxo de neutrófilos e da quimiocina CXCL1 em modelo de artrite gotosa aguda induzida por cristais de MSU em camundongos.	93

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Sequência dos primers.	70
Quadro 2 - Classificação de subtipos de macrófagos com base nos estímulos utilizados.	73

Sumário

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1	Artrite gotosa: definição e epidemiologia	23
2.1.1	Metabolismo de purinas, formação de ácido úrico e hiperuricemia.....	25
2.1.2	Diagnóstico da artrite gotosa	28
2.1.3	Patogênese da gota e inflamassoma NLRP3	30
2.1.4	Resolução espontânea da artrite gotosa aguda	36
2.1.5	Complicações e comorbidades da artrite gotosa e da hiperuricemia	38
2.1.6	Tratamento	39
2.1.7	Tratamento crise aguda (redução da inflamação)	39
2.1.8	Tratamento crônico (diminuição dos níveis séricos de ácido úrico)	41
2.2	Biologia de Macrófagos	43
2.2.1	Macrófagos e seu papel na articulação saudável e na gota.....	51
2.2.2	O papel da IL-10 como citocina anti-inflamatória, na atividade dos macrófagos regulatórios e na resolução da gota	53
3	JUSTIFICATIVA.....	56
4	OBJETIVOS	57
4.1	Objetivo geral.....	57
4.2	Objetivos específicos.....	57
5	MATERIAIS E MÉTODOS	58
5.1	Animais	58
5.2	Preparo dos cristais de MSU	58
5.3	Indução da gota por injeção intra-articular de cristais de MSU	59
5.4	Isolamento de macrófagos da medula óssea	59
5.5	Estímulo de macrófagos.....	60

5.6	Produção de macrófagos regulatórios utilizando Beads/IgG de coelho	61
5.7	Produção de macrófagos regulatórios utilizando Prostaglandina (PGE2) ou Adenosina (ADO)	61
5.8	Produção de macrófagos regulatórios utilizando IgG de coelho e anticorpo anti-IgG de coelho	62
5.9	Produção de macrófagos regulatórios utilizando hemácias de ovelha e anticorpo anti-hemácias de ovelha	62
5.10	Cinética da inflamação articular	63
5.11	Cinética de liberação de citocinas pelos MΦs após a polarização	63
5.12	Estimulação <i>in vitro</i> de BMDM e desafio com cristais de MSU ou ATP	64
5.13	Ativação do inflamassoma NLRP3 por injeção peritoneal de cristais de MSU e terapia com macrófagos com diferentes estímulos	65
5.14	Terapia com macrófagos com diferentes estímulos na artrite gotosa murina	67
5.15	Eutanásia	68
5.16	Contagem total dos leucócitos	69
5.17	Contagem diferencial dos leucócitos	69
5.18	Processamento do tecido periarticular para dosagem de citocinas	69
5.19	PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)	69
5.20	Dosagem de citocinas por ELISA	70
5.21	Análises estatísticas	71
6	RESULTADOS	72
6.1	Reprogramação de macrófagos <i>in vitro</i>	72
6.2	Macrófagos Mreg reduzem a produção de IL-1β <i>in vitro</i>	81
6.3	Ativação do inflamassoma NLRP3 por injeção peritoneal de cristais de MSU e terapia com macrófagos	88
6.4	Perfil inflamatório da gota aguda em camundongos	90
6.5	Terapia com macrófagos com diferentes estímulos na artrite gotosa murina	92
7	DISCUSSÃO	94

7.1	Reprogramação de macrófagos <i>in vitro</i>.....	94
7.2	Vias purinérgica e a imunomodulação de macrófagos na gota aguda. .	96
7.3	Ensaio in vitro com macrófagos e MSU	98
7.4	Perfil inflamatório da gota aguda em camundongos	100
7.5	Terapia com Macrófagos sem Estímulo ou Regulatórios em Modelos murinos de Peritonite e Artrite Gotosa Induzidos por Cristais de MSU	101
8	CONCLUSÃO	105
	REFERÊNCIAS	106
	ANEXOS.....	119

1 INTRODUÇÃO

A gota, uma das formas mais prevalentes de artrite inflamatória em adultos, é especialmente comum entre os homens, com uma prevalência global de 1% a 6,8%. Sua incidência é estimada em 0,58% a 2,89% por 1000 pessoas-ano (DEHLIN; JACOBSSON; RODDY, 2020). Essa condição está intrinsecamente ligada à deposição de cristais de urato monossódico (MSU) nas articulações periféricas e em diversos tecidos, sendo potencializada pela hiperuricemia sustentada, resultante de um desequilíbrio entre a excreção e a produção de ácido úrico (SHI; MUCSI; NG, 2010; DALBETH et al., 2021).

O curso da doença pode ser dividido em quatro estágios clínicos distintos: hiperuricemia assintomática, artrite gotosa aguda, fase intercrítica e gota tofácea crônica (BARDIN; RICHETTE, 2014; DALBETH; STAMP, 2014). A fase aguda da doença, embora seja autolimitada, provoca intensa dor, resultando em significativa redução na qualidade de vida do paciente (SHI; MUCSI; NG, 2010; DALBETH; STAMP, 2014).

No contexto de sua patogênese, os macrófagos residentes na cavidade articular desempenham um papel crucial no desencadeamento da inflamação na artrite gotosa aguda. Ao fagocitar os cristais de MSU, essas células ativam o inflamassoma Nod-, LRR- e Pysin Domain- Containing Protein 3 (NLRP3), levando à liberação de citocinas pró-inflamatórias, incluindo a Interleucina-1 β (IL-1 β), além de outras, como o Fator de Necrose Tumoral (TNF) e a Interleucina-6 (IL-6). A IL-1 β , em particular, assume um papel importante como estimulador potente da inflamação, caracterizada principalmente por intenso influxo de neutrófilos (MARTIN; WALTON; HARPER, 2009; ROCK; KATAOKA; LAI, 2012; STEIGER; HARPER, 2013a).

É relevante destacar que no líquido sinovial saudável não há presença de neutrófilos "residentes", ao contrário dos macrófagos (DALBETH et al., 2019). Dessa forma, a injeção intra-articular de cristais de MSU em camundongos induz o recrutamento e acúmulo de neutrófilos para o local da aplicação, tornando-os um marcador característico da artrite gotosa aguda e desempenhando um papel fundamental no diagnóstico dessa fase da doença, além de contribuírem

significativamente para a dor e os danos articulares (MARTINON et al., 2006; POPANITA; NACCACHE, 2010; AMARAL et al., 2012).

Os macrófagos têm uma função central na patogênese da artrite gotosa, uma vez que desempenham um papel ativo na resposta inflamatória, podendo causar danos aos tecidos adjacentes (MARTIN; WALTON; HARPER, 2009; SIL et al., 2017). Por outro lado, é importante notar que os macrófagos são as únicas células do sistema imunológico presentes na camada íntima da sinóvia de indivíduos saudáveis, sendo células residentes nesse ambiente. Eles atuam na manutenção da homeostase e, assim, contribuem para a saúde geral da articulação (KUROWSKA-STOLARSKA; ALIVERNINI, 2017; LIU et al., 2022).

De fato, os macrófagos possuem uma característica fisiológica fundamental que lhes permite ajustar seu perfil de ativação de acordo com o microambiente em que se encontram, o que resulta em diferentes perfis, dependendo dos estímulos que recebem (MOSSER; HAMIZADEH; GONCALVES 2020) (MOSSER; EDWARDS, 2008). Atualmente, embora existam potencialmente inúmeros fenótipos, três populações distintas com diferentes estados de ativação estão bem descritas *in vitro*: os macrófagos ativados por via clássica, que demonstram maior atividade microbicida e tumoricida, liberando quantidades significativas de citocinas e mediadores pró-inflamatórios, como Interleucina-12 (IL-12) e IL-6 (ADAMS; HAMILTON, 1984; MANTOVANI et al., 2004; MARTINEZ; GORDON, 2014); os macrófagos alternativamente ativados, que resultam da ativação mediada por IL-4/IL-13 e são programados para promover o reparo tecidual, suprimir a resposta T_H1 e combater helmintos (STEIN et al., 1992; GORDON, 2003); e os macrófagos regulatórios, capazes de aumentar a produção de Interleucina-10 (IL-10), uma citocina anti-inflamatória, enquanto reduzem a produção de IL-12 quando estimulados *in vitro* por um agonista do receptor do tipo Toll (TLR) na presença de imunocomplexos, adenosina, prostaglandina, dentre outros (SUTTERWALA et al., 1998; MOSSER; EDWARDS, 2008).

Assim, por serem células com grande plasticidade, os macrófagos podem desempenhar um papel tanto na patogênese da doença quanto na promoção da cura do tecido inflamado, restabelecendo sua homeostase.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Artrite gotosa: definição e epidemiologia

A artrite gotosa, reconhecida como uma das primeiras doenças na história da medicina, teve sua primeira menção datada em 2.640 antes de Cristo (a.C.) pelos egípcios, que a denominaram de "podagra" ao referirem-se à gota na fase aguda, afetando a primeira articulação metatarsal. No século V a.C., Hipócrates estabeleceu uma relação entre a gota e o estilo de vida, percebendo que aqueles que consumiam uma farta alimentação e grandes quantidades de bebidas alcoólicas eram mais propensos a desenvolver a enfermidade, categorizando-a como a "doença dos ricos". Galeno, seis séculos depois, descreveu os tofos gotosos e relacionou a gota com libertinagem e comportamentos excessivos, bem como reconhecendo um componente hereditário. Mais tarde, no século XIII, Randolphus de Bocking, um monge dominicano, introduziu o termo "gota", derivado da palavra latina "gutta", referindo-se à crença medieval de que um dos quatro humores (sangue, fleuma, bÍlis amarela e bÍlis negra) em desequilÍbrio poderia gotejar para uma articulação, causando dor e inflamação (NUKI; SIMKIN, 2006). Avançando no tempo, Antoni van Leeuwenhoek, um pioneiro da microscopia, em 1679, descreveu a aparência dos cristais de tofos gotosos, embora sua composição química tenha permanecido desconhecida na época (MCCARTY, 1970).

A gota, uma das formas mais comuns e tratáveis de artrite inflamatória, está associada à hiperuricemia e se caracteriza pela deposição de cristais de MSU nas articulações e tecidos (MARTINON; GLIMCHER, 2006; DALBETH et al., 2021). As características clÍnicas da gota surgem como resultado da resposta inflamatória do organismo aos depósitos de cristais de MSU, que ocorrem nas articulações, nos tecidos subcutÂneos e em outros locais (MCCARTY; HOLLANDER, 1961; FAIRES; MCCARTY, 1962).

Tradicionalmente, tanto a hiperuricemia quanto a gota são classificadas em quatro estÁgios distintos: o primeiro deles é identificado como hiperuricemia assintomática, caracterizada por nÍveis elevados de ácido úrico no sangue, porém sem manifestações clÍnicas. O segundo estÁgio engloba a artrite gotosa aguda, em que a hiperuricemia persistente resulta na deposição de cristais de MSU nas articulações

(comumente afetando a primeira articulação metatarsal-falângica) ou nos tecidos periarticulares. Isso culmina em uma artrite inflamada aguda, que é dolorosa, autolimitada e intermitente. A terceira fase é denominada de gota intercrítica, caracterizada pelo período entre as crises agudas de gota, em que há ausência de sintomas, embora a hiperuricemia persista. Essa fase apresenta uma duração variável e tende a diminuir à medida que a doença progride. Finalmente, o quarto estágio da doença é conhecido como gota tofácea crônica, que geralmente se desenvolve após a presença da gota por muitos anos. Essa fase está associada a complicações como a formação de tofos e danos nos ossos e articulações (DALBETH; STAMP, 2014; DALBETH; MERRIMAN; STAMP, 2016; RAGAB; ELSHAHALY; BARDIN, 2017)

De acordo com Dehlin, Jacobsson e Roddy (2020), tanto a prevalência quanto a incidência de gota parecem estar aumentando em todo o mundo, principalmente nos países desenvolvidos. A prevalência relatada da gota varia de menos de 1% a aproximadamente 6,8% na população mundial, enquanto a incidência varia de 0,58 a 2,89 casos por 1.000 pessoas/ano, dependendo da população estudada e do método empregado. Os principais fatores de risco para a gota incluem hiperuricemia, predisposição genética, fatores alimentares, medicamentos e comorbidades (KUO et al., 2015; SINGH; GAFFO, 2020).

A presença da gota exibe variações notáveis em nível mundial, com maiores índices de ocorrência nos países da Oceania, sobretudo entre as populações indígenas e nas ilhas do Pacífico Sul (KUO et al., 2015), contrastando com índices mais baixos nos países em desenvolvimento, embora isso possa estar vinculado à falta de dados em muitos desses países (DEHLIN; JACOBSSON; RODDY, 2020). Além das elevações de prevalência da gota nos Estados Unidos (CHEN-XU et al., 2019) e na Europa, também emergem evidências de um aumento nos índices de prevalência na Austrália, Canadá, China e Coreia do Sul (DEHLIN; JACOBSSON; RODDY, 2020).

A gota exibe maior prevalência em homens em comparação com mulheres, apresentando um aumento também associado à idade. Surge um padrão de aumento da prevalência ao longo da vida nos homens e, especialmente, após a menopausa nas mulheres (KUO et al., 2015; DEHLIN; JACOBSSON; RODDY, 2020; SINGH; GAFFO, 2020). Um estudo dinamarquês também evidenciou um aumento precoce na incidência

de gota entre homens em relação às mulheres (ZOBBE et al., 2019). A distinção significativa entre homens e mulheres e o aumento dos casos em mulheres em consonância com o envelhecimento podem ter uma relação com o papel dos hormônios sexuais femininos como fator protetor. Isso se sustenta em estudos que estabeleceram a associação entre a menopausa e um maior risco de gota entre mulheres, além do reconhecimento da terapia hormonal pós-menopausa como um moderado redutor de risco no desenvolvimento da doença (HAK et al., 2010).

Apesar do aumento da prevalência e incidência, o tratamento subótimo da gota continua em muitos países. O manejo da gota continua ruim, com menos de um terço dos pacientes recebendo terapia de redução de urato e desses, menos da metade adere ao tratamento e uma proporção ainda menor persiste com o tratamento ao longo da vida (DOHERTY et al., 2012). A gota, em geral, resulta na redução da qualidade de vida do paciente, na perda de função do órgão afetado, no aumento dos custos relacionados à saúde e na diminuição da produtividade econômica (SINGH, 2009; CHEN-XU et al., 2019).

A gota representa um ônus significativo em termos de despesas diretas com saúde, especialmente durante os episódios agudos da doença. Isso resulta não apenas em atendimentos de emergência e hospitalizações, mas também em uma considerável perda de produtividade no ambiente de trabalho (SHIELDS; BEARD, 2015). Um levantamento realizado em 2003 nos EUA apontou um ônus econômico estimado de \$27 milhões anuais devido a novos casos de gota aguda (KIM et al., 2003). Wertheimer et al. (2013) realizaram uma estimativa dos custos totais anuais nos EUA da ordem de bilhões de dólares. É importante ressaltar que esses valores certamente aumentaram atualmente.

Um estudo transversal revelou que os pacientes com gota não controlada apresentaram custos médicos totais mais elevados quando comparados àqueles com a doença devidamente controlada ou mesmo àqueles sem gota (FLORES et al., 2019). Esses achados destacam a relevância do controle dos episódios agudos de gota como uma forma de reduzir os custos médicos associados.

2.1.1 Metabolismo de purinas, formação de ácido úrico e hiperuricemia

A dieta, o metabolismo e a síntese *de novo* constituem as fontes fundamentais

das bases púricas (adenina e guanina). O ácido úrico constitui o produto resultante da metabolização dos nucleotídeos de purina em humanos. Dessa forma, esse composto é gerado tanto de maneira endógena quanto exógena (MAIUOLO et al., 2016; DANVE; SEHRA; NEOGI, 2021).

Várias reações enzimáticas conduzem à conversão de purinas em ácido úrico. Os nucleotídeos Adenosina monofosfato (AMP) e Guanosina monofosfato (GMP) são metabolizados por nucleotidases, perdendo grupos fosfato e transformando-se nos nucleosídeos Adenosina e Guanosina, respectivamente. A enzima adenosina desaminase (ADA) converte a adenosina em inosina. Os nucleosídeos formados sofrem a ação da purina nucleosídeo fosforilase (PNP), resultando na separação da pentose das bases púricas, formando a Guanina e a Hipoxantina. A guanina desaminase (GDA) converte a guanina em xantina, e a xantina oxidase (XO) converte a hipoxantina em xantina. A xantina é então transformada pela XO, produzindo o ácido úrico (**Figura 1**) (MAIUOLO et al., 2016; DANVE; SEHRA; NEOGI, 2021; ZHANG et al., 2022).

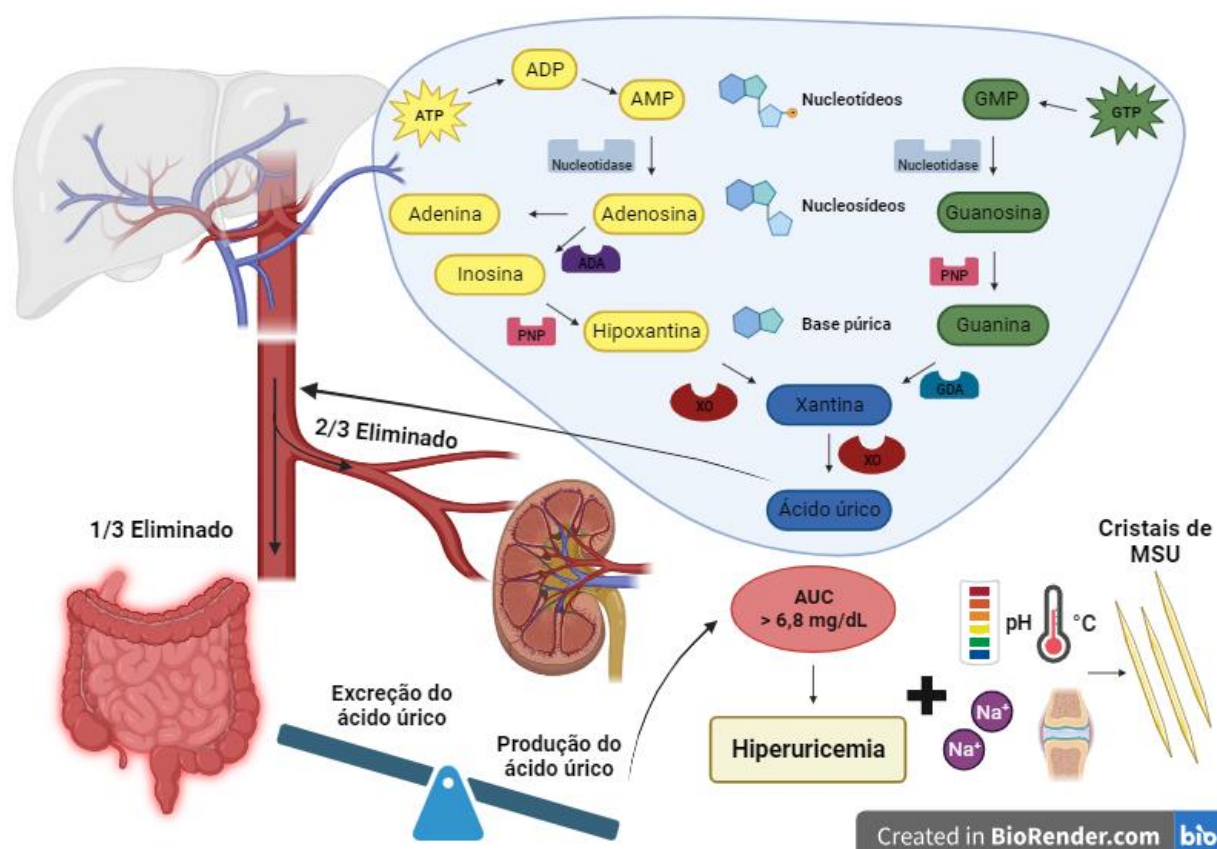


Figura 1 - Metabolismo de purinas, hiperuricemia e formação dos cristais de MSU.

O ácido úrico é produzido pela metabolização de bases púricas, adenina e guanina, e sua síntese envolve reações enzimáticas. O ácido úrico circula como íon urato, com níveis elevados associados à hiperuricemia. Variações de temperatura, pH, componentes da matriz cartilaginosa e íons afetam a formação e solubilidade de cristais de urato monossódico, desencadeando reações inflamatórias. ADA: Adenosina Desaminase; ADP: Adenosina Difosfato; AUC: Ácido Úrico Circulante; AMP: Adenosina Monofosfato; ATP: Adenosina Trifosfato; GDA: Guanina Desaminase; GMP: Guanosina Monofosfato; GTP: Guanosina Trifosfato; Na⁺: Íon Sódio (Sódio); PNP: Purina Nucleosídeo Fosforilase; XO: Xantina Oxidase. Adaptado de: (ZHANG et al., 2022). Criado em: Biorender.com

Na maioria dos mamíferos, o ácido úrico passa por uma conversão catalisada pela enzima uricase, transformando-se em alantoína, uma substância altamente solúvel que é prontamente excretada através da urina. Isso resulta em níveis séricos de urato bastante reduzidos nesses animais. No entanto, nos seres humanos, os níveis de urato são significativamente mais elevados em comparação com outros mamíferos, uma vez que perdemos essa enzima ao longo da escala evolutiva. Essa perda é a principal razão pela qual os humanos são os únicos entre os mamíferos que desenvolvem espontaneamente a condição conhecida como gota (ÁLVAREZ-LARIO; MACARRÓN-VICENTE, 2010).

Apesar desse cenário, estudos têm demonstrado que a inativação do gene responsável pela uricase trouxe vantagens evolutivas para os seres humanos. Primeiramente, tal inativação está associada ao efeito benéfico do ácido úrico na retenção de sal e no aumento da pressão sanguínea, propriedades que foram particularmente vantajosas para manter a estabilidade da pressão arterial durante períodos de baixa ingestão de sal (WATANABE et al., 2002). Além disso, o ácido úrico possui propriedades antioxidantes, na proteção contra doenças degenerativas neurológicas, e demonstrou possuir propriedades imunoestimuladoras (AMES et al., 1981; SCOTT; HOOPER, 2001; KUTZING; FIRESTEIN, 2008).

O ácido úrico, um ácido fraco com pKa de 5,75, encontra-se predominantemente nos líquidos corporais em condições fisiológicas (pH 7,4 e 37 °C), na forma de íon urato. Na corrente sanguínea, o ácido úrico circulante (AUC) é mantido em concentrações próximas de 6,0 mg/dL, considerado elevado dado que o limiar de saturação do urato em fluídos biológicos é aproximadamente 7,0 mg/dL, o excedente é principalmente eliminado pelos rins e, em menor proporção, pelo intestino (ROCK; KATAOKA; LAI, 2012; MARTILLO; NAZZAL; CRITTENDEN, 2014). A hiperuricemia é

tipicamente definida como a presença do AUC em níveis acima do ponto de saturação, momento em que o risco de cristalização se eleva. Há a caracterização de hiperuricemia patológica quando os níveis séricos de ácido úrico excedem 6,8 mg/dL, resultado da redução da excreção de ácido úrico e/ou do aumento da produção (LOEB, 1972; MARTILLO; NAZZAL; CRITTENDEN, 2014).

As moléculas de urato permanecem em completa dissolução até que ocorra um fator que altere sua solubilidade. A concentração de ácido úrico desempenha um papel crucial na formação dos cristais de urato monossódico, especialmente quando se encontra na forma de íons urato (MARTILLO; NAZZAL; CRITTENDEN, 2014; DALBETH et al., 2021). Estudos *in vitro* realizados em soluções aquosas indicam que uma redução de apenas 2°C, de 37 para 35°C, é suficiente para reduzir o ponto de solubilidade do urato de 6,8 para 6,0 mg/dL (LOEB, 1972). Além das variações de temperatura, o pH também demonstra influenciar a cristalização do urato (KIPPEN et al., 1974), enquanto concentrações de outros íons presentes na solução também afetam a solubilidade do urato (WILCOX; KHALAF, 1975; MARTILLO; NAZZAL; CRITTENDEN, 2014). Especula-se, adicionalmente, que o fluido articular e os componentes da cartilagem possam desempenhar um papel na formação dos cristais de urato (BURT; DUTT, 1986; MCGILL; DIEPPE, 1991).

Uma vez formados, os cristais de MSU depositados são capazes de provocar uma reação das células sinoviais que desencadeiam a liberação de citocinas que amplificam a resposta inflamatória local (DALBETH et al., 2021).

2.1.2 Diagnóstico da artrite gotosa

A gota muitas vezes é inicialmente confundida com uma torção ou infecção, ou em muitos casos, o diagnóstico é tardio. Nisto, a Liga Europeia Contra o Reumatismo (EULAR) desenvolveu recomendações em 2006, com base na prática clínica e nas melhores evidências disponíveis, para o diagnóstico da gota (ZHANG et al., 2006; SINGH, 2019). O padrão-ouro para o diagnóstico de gota é a análise do líquido sinovial ou do aspirado do tofo por microscopia de luz polarizada, visto que a identificação de cristais de MSU nessas amostras fornece um diagnóstico definitivo com 100% de especificidade (RICHETTE et al., 2019).

O Colégio Americano de Médicos (ACP) emitiu uma diretriz em 2017 para o

diagnóstico da gota, contrastando com as recomendações da EULAR de 2019. O ACP sugere que os médicos avaliem o líquido sinovial para cristais de MSU quando necessário, o que contrasta com a recomendação da EULAR de realizar a aspiração do líquido sinovial ou do tofo em todos os casos suspeitos de gota para confirmar a presença de cristais de MSU. Embora o ACP reconheça a análise do líquido sinovial como o padrão-ouro, ele destaca desafios práticos na atenção primária, uma vez que a maioria dos pacientes é inicialmente atendida nesses contextos, onde a análise do líquido sinovial raramente é realizada. Além disso, a detecção precisa de cristais de urato requer um microscópio de luz polarizada e um operador treinado. O ACP sugere a aspiração da articulação somente quando viável, a fim de minimizar desconforto e risco de infecção (QASEEM et al., 2017).

Em 2019, essas recomendações foram atualizadas por meio de um consenso de revisão sistemática da literatura e do método Delphi, envolvendo especialistas e pacientes. O estudo resultou em uma abordagem de três etapas para o diagnóstico da gota (RICHETTE et al., 2019; SINGH, 2019). O primeiro passo baseia-se na identificação de cristais de MSU usando microscopia de luz polarizada, quando a análise do líquido sinovial é viável, pois a presença desses cristais estabelece um diagnóstico definitivo de gota. Se não for possível analisar o líquido sinovial, o segundo passo é um diagnóstico clínico respaldado pela presença de hiperuricemia e características clínicas sugestivas de gota, tais como envolvimento monoarticular do pé (especialmente a primeira articulação metatarsfalângica) ou articulação do tornozelo; episódios anteriores de artrite aguda semelhante; início rápido de dor e inchaço intensos; eritema; sexo masculino; e presença de doenças cardiovasculares associadas. É importante ressaltar que o diagnóstico de gota não deve se basear apenas na hiperuricemia. A avaliação clínica é altamente indicativa da doença, mas carece de especificidade. Quando o diagnóstico clínico de gota é incerto e a identificação de cristais não é possível, a terceira etapa recomenda a realização de exames de imagem, principalmente ultrassonografia, para buscar evidências de deposição de cristais de MSU (RICHETTE et al., 2019).

As recomendações de 2019 também reforçaram algumas diretrizes de 2006, como a importância de investigar fatores de risco para hiperuricemia após o diagnóstico de gota, em particular: doença renal crônica; sobrepeso; uso de medicamentos (incluindo diuréticos, baixas doses de aspirina, ciclosporina e

tacrolimo); consumo excessivo de álcool (principalmente cerveja e destilados), refrigerantes, carnes e frutos do mar. Além disso, as recomendações salientaram a avaliação sistemática de comorbidades associadas em pessoas com gota, incluindo obesidade, insuficiência renal, hipertensão, doença cardíaca isquêmica, insuficiência cardíaca, diabetes e dislipidemia (RICHETTE et al., 2019).

2.1.3 Patogênese da gota e inflamassoma NLRP3

Na inflamação gotosa, diferentes mediadores estão envolvidos com efeitos distintos na iniciação, amplificação, atenuação e resolução das crises agudas. Uma crise aguda de gota tem início com a deposição de cristais de MSU nas articulações e nos tecidos periarticulares. Esses cristais são identificados pelas células do sistema imunológico inato como sinais endógenos pró-inflamatórios ou padrões moleculares associados a danos (DAMPs) (DALBETH et al., 2021; GALOZZI et al., 2021). Isso ocorre porque a necrose celular comumente resulta na liberação de ácido úrico previamente contido no citosol (SHI; EVANS; ROCK, 2003; ROCK et al., 2005).

Acredita-se que os macrófagos, tanto os macrófagos residentes quanto os derivados de monócitos circulantes, sejam importantes para iniciar e conduzir a fase pró-inflamatória precoce da gota aguda (SO; MARTINON, 2017). De acordo com Martin, Walton e Harper (2009), os macrófagos residentes desempenham um papel crucial na crise inflamatória. Eles fagocitam os cristais de MSU e desencadeiam a inflamação aguda, ao mesmo tempo em que ativam e atraem neutrófilos. Os macrófagos residentes também são uma fonte de citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-1 β e IL-6 (MARTIN; WALTON; HARPER, 2009). No entanto, durante a resposta inflamatória, ocorrem interações complexas entre diversos tipos celulares, como neutrófilos, sinoviócitos, mastócitos e células endoteliais. Isso sugere que outras células, como os fibroblastos sinoviais, também podem ter um papel na modulação da resposta inflamatória (ZHENG et al., 2015; RAGAB; ELSHAHALY; BARDIN, 2017).

Após a fagocitose, a ativação do inflamassoma NLRP3 pelos cristais de MSU é de particular relevância para o início do surto de gota, desencadeando a liberação de IL-1 β pelos macrófagos residentes (KINGSBURY; CONAGHAN; MCDERMOTT, 2011; DALBETH et al., 2021; GALOZZI et al., 2021). A pesquisa de Martinon et al. (2006) demonstrou o envolvimento do inflamassoma NLRP3 e da ativação da

caspase-1 na inflamação aguda induzida pelos cristais de MSU. Os pesquisadores manipularam camundongos deficientes em vários componentes do inflamassoma e da via de sinalização, como a caspase-1 e a proteína adaptadora ASC (*Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD - Caspase Activation and Recruitment Domain*). Eles observaram que esses camundongos apresentaram menor capacidade de ativação da IL-1 β quando estimulados com cristais de MSU. Além disso, camundongos deficientes em NLRP3 ou no receptor da IL-1 β (IL-1R) reduziram o recrutamento de neutrófilos em um modelo *in vivo* de peritonite induzida por cristais, reforçando a importância central do inflamassoma NLRP3 no desenvolvimento da inflamação aguda (MARTINON et al., 2006).

Os inflamassomas são complexos multiproteicos essenciais do sistema imune inato. Em 2002, Martinon et al. (2002) introduziram o termo "inflamassoma" para descrever a montagem de um complexo de alto peso molecular encontrado no citosol de células imunes estimuladas, o qual desempenha um papel na ativação de caspases inflamatórias, levando a respostas imunes sistêmicas subsequentes e inflamação (LATZ; XIAO; STUTZ, 2013; URWANISCH; LUCIANO; HOREJS-HOECK, 2021).

O inflamassoma NLRP3 é composto por três componentes: a proteína sensorial NLRP3, a proteína adaptadora ASC e a pró-caspase-1. O próprio NLRP3 é uma proteína tripartida pertencente à família de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) que consiste em um domínio na porção C-terminal formado por repetições ricas em leucinas (LRR) que são responsáveis pelo reconhecimento da molécula antigênica, um domínio de oligomerização do inflamassoma NACHT (também conhecido como NOD) na região central, e um domínio de pirina (PYD) efetor na região amino-terminal, que é necessário para a transdução de sinal. A ASC tem domínios PYD amino-terminal e um domínio CARD C-terminal e interage com o NLRP3 através do domínio PYD. A pró-caspase-1 consiste em um domínio CARD amino-terminal, um grande domínio catalítico central (p20) e um pequeno domínio catalítico C-terminal (p10). Usando o domínio CARD, a ASC aproxima da pró-caspase 1, o que inicia a autoclivagem da pró-caspase 1 e a formação da caspase 1 ativa que cliva a pró-IL-1 β e a pró-IL-18 em suas formas ativas (LATZ; XIAO; STUTZ, 2013; BROZ; DIXIT, 2016; MANGAN et al., 2018).

A ativação do NLRP3 exige também a presença da proteína quinase 7

relacionada ao NIMA (Never In Mitosis Gene A) (NEK7). Essa proteína liga-se ao domínio LRRs do NLRP3 e desempenha um papel crucial na montagem do inflamassoma em resposta tanto a estímulos canônicos quanto não canônicos (SCHMID-BURGK et al., 2016; SHARIF et al., 2019; ZHAO et al., 2020).

Além da ativação de citocinas pró-inflamatórias, a ativação do inflamassoma pode levar à piroptose, uma forma rápida e inflamatória de morte celular. A caspase-1 ativada também promove a clivagem da proteína Gasdermina D (GSDMD) liberando a porção N-terminal que oligomeriza na membrana plasmática, causando a formação de poros piroptóticos. Esses poros prejudicam a integridade da membrana plasmática celular e podem contribuir para a liberação de mediadores inflamatórios para o espaço extracelular, incluindo a IL-1 β . Esse processo é fundamental para a regulação da inflamação e respostas imunes diante de patógenos ou danos celulares (HE et al., 2015; SHI et al., 2015; BROZ; DIXIT, 2016).

Na literatura, é mencionado que a ativação do inflamassoma depende de dois sinais distintos, contribuindo para uma resposta mais específica. Embora a ativação da produção de IL-1 β e a função do inflamassoma NLRP3 na gota tenham sido detalhadamente documentadas, a via primordial que conecta os cristais de MSU à ativação do NLRP3 permanece pouco compreendida. O papel do inflamassoma pode ser subdividido em duas fases essenciais: o *priming* e a ativação. O inflamassoma NLRP3 depende de um sistema de duplo sinal, uma estratégia que assegura uma ativação controlada, evitando danos ao hospedeiro devido a ativações desreguladas (SO; MARTINON, 2017; DALBETH et al., 2021). Apesar que também pode ocorrer a ativação não canônica do inflamassoma NLRP3 que é desencadeada pela caspase 4 ou 5 em humanos e pela caspase 11 em camundongos. Nesta via, o NLRP3 é ativado após a detecção de Lipopolissacarídeo (LPS) intracelular (SHI et al., 2014; BROZ; DIXIT, 2016; MANGAN et al., 2018).

Na gota, a natureza do primeiro sinal não é clara. De acordo com as descobertas de Liu-Bryan et al. (2005), o primeiro sinal é transmitido através dos receptores do Tipo Toll (TLRs) e desencadeia uma série de eventos que regulam a expressão dos componentes essenciais para a montagem e ativação do NLRP3. Além disso, ele também desempenha um papel na síntese de pró-IL-1 β e nas proteínas precursoras das caspases inflamatórias (SO; MARTINON, 2017; DALBETH et al., 2021).

Diversos fatores são capazes de estimular esse primeiro sinal. Entre eles, podemos citar a presença de ácidos graxos livres (FFA), os quais podem ser induzidos pela ingestão de uma refeição volumosa ou pela ingestão de álcool (JOOSTEN et al., 2010). Além disso, componentes microbiológicos, como o LPS, também contribuem para o desencadeamento desse sinal (GIAMARELLOS-BOURBOULIS et al., 2009). Um outro elemento relevante é a proteína do complemento C5a, que também está envolvida nesse processo (AN et al., 2014).

No entanto, é importante destacar que, por si só, esse primeiro sinal não é capaz de acionar completamente a via do inflamassoma. Assim sendo, um segundo sinal é necessário, mais específico que o primeiro e direciona a agregação e oligomerização dos componentes do inflamassoma. Após o primeiro sinal o inflamassoma pode ser acionado por diversos estímulos, como resumido por Swanson et al. (2019). Esses estímulos geralmente não têm um efeito direto sobre o NLRP3, mas provocam estresse nas células e desencadeiam eventos intracelulares que posteriormente são identificados pelo NLRP3, como efluxo de Potássio (K^+), fluxo de cálcio (Ca^{2+}), efluxo de Cloreto (Cl^-), RNA viral através da proteína de sinalização antiviral mitocondrial (MAVS) na membrana mitocondrial externa, disfunção mitocondrial e produção de espécies reativas de oxigênio mitocondrial (mtROS), realocização de cardiolipina para a membrana mitocondrial externa e liberação de DNA mitocondrial oxidado (Ox-mtDNA), Adenosina Trifosfato (ATP) extracelular, inibição do metabolismo glicolítico ou dano lisossômico (BROZ; DIXIT, 2016; MANGAN et al., 2018; SWANSON; DENG; TING, 2019; ZHENG; LIWINSKI; ELINAV, 2020; URWANISCH; LUCIANO; HOREJS-HOECK, 2021).

Como a ativação inicial do inflamassoma NLRP3 exige um processo em duas etapas, a simples presença de cristais de MSU não conduz automaticamente à inflamação. Isso explica como esses cristais podem estar presentes nas articulações sem causar inflamação clinicamente perceptível. Um método comum de ativar o NLRP3 é por meio da ruptura lisossômica causada pela fagocitose de materiais cristalinos ou agregados proteicos. Ainda que o mecanismo específico da lesão lisossômica permaneça indefinido, ele está relacionado à liberação de catepsinas a partir do compartimento lisossômico (HORNUNG et al., 2008; MANGAN et al., 2018; DALBETH et al., 2021).

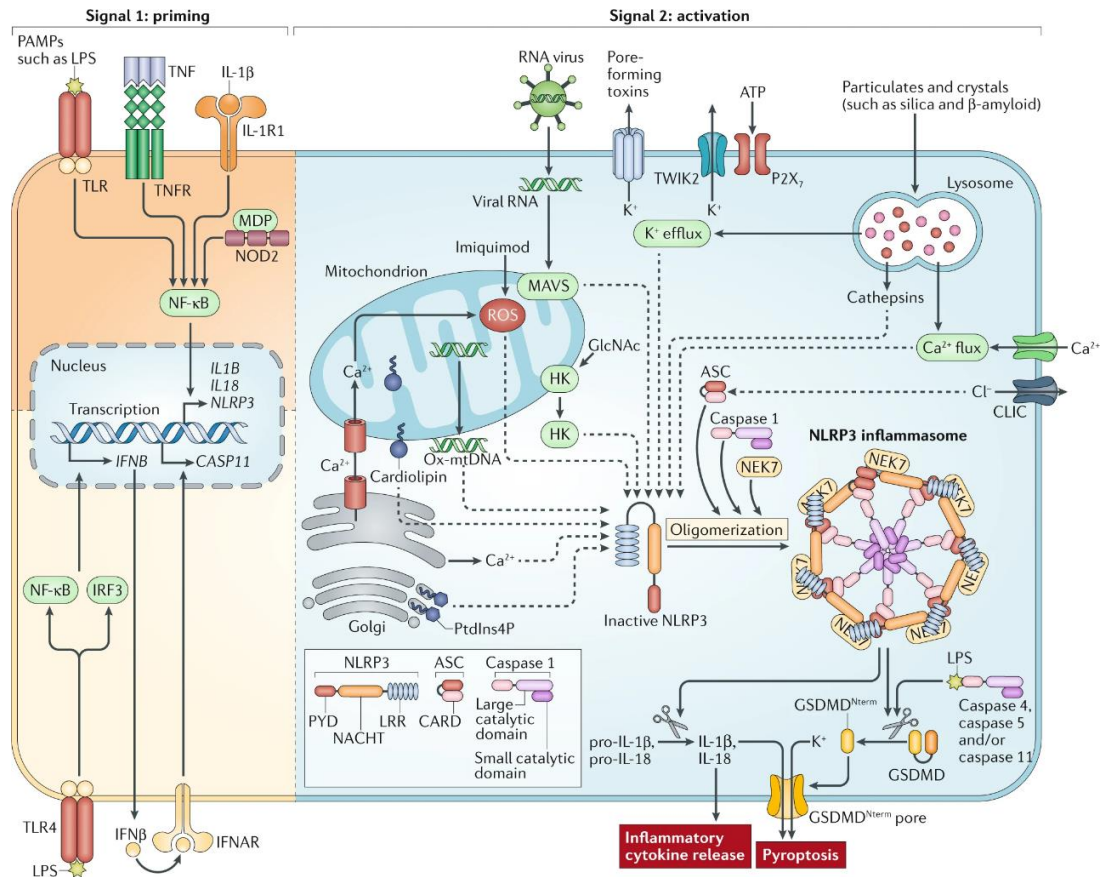


Figura 2 - Priming e ativação do inflamassoma.

O primeiro sinal envolve a ativação de citocinas ou padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), resultando na regulação positiva da transcrição dos componentes canônicos e não canônicos do inflamassoma NLRP3. O segundo sinal é desencadeado por vários PAMPs ou DAMPs que iniciam uma série de eventos de sinalização. A formação do inflamassoma ativa a caspase 1, que por sua vez cliva a pro-IL-1 β , a pro-IL-18 e a GSDMD. A detecção do LPS citosólico leva à ativação das caspases 4, 5 e 11, que clivam o GSDMD, resultando na piroptose. CARD: domínio de recrutamento de caspases; CLIC: proteína do canal intracelular de cloreto; GlcNAc: N-acetilglucosamina; GSDMD Nterm: domínio de morte celular GSDMD amino-terminal; HK: hexoquinase; IFNAR: receptor IFN α/β ; IL-1R1: receptor de IL-1 tipo 1; IRF3: fator regulador de interferon 3; LRR: repetição rica em leucina; MDP: dipeptídeo muramyl; NEK7: quinase 7 relacionada com NIMA; NF- κ B: fator nuclear- κ B; P2X7: purinoceptor P2X7; PtdIns4P: fosfatidilinositol-4-fosfato; PYD: domínio de pirina; ROS: espécies reativas de oxigênio; TLR: receptor do tipo Toll; TNF: fator de necrose tumoral; TNFR: receptor do fator de necrose tumoral; TWIK2: domínio de dois poros fraco retificando internamente K⁺ canal 2 (Fonte: SWANSON; DENG; TING, 2019).

A IL-1 β é uma citocina central na resposta inflamatória, produzida principalmente por macrófagos e monócitos ativados. Além de sua função inflamatória (DINARELLO, 1998), a IL-1 β também desempenha um papel crucial como um

pirogênio endógeno, contribuindo para a resposta febril (DINARELLO; GATTI; BARTFAI, 1999). Sua produção é cuidadosamente regulada por várias etapas, incluindo a produção do precursor pro-IL-1 β (p35), a clivagem desse precursor para formar a IL-1 β ativa (p17) e, finalmente, sua liberação no ambiente extracelular (MARTINON et al., 2002, 2006; BURNS; MARTINON, 2003).

Após sua liberação no líquido sinovial, a IL-1 β ativa estimula os receptores de IL-1 β (IL-1R) presentes em células como leucócitos, células endoteliais e sinoviócitos. A ligação da IL-1 β ao receptor IL-1RI, forma um complexo que ativa uma série de moléculas intracelulares, desencadeando uma variedade de respostas biológicas (DINARELLO, 2009; GABAY; LAMACCHIA; PALMER, 2010; DALBETH et al., 2021). Essa citocina tem a capacidade de induzir a expressão e síntese de genes específicos, como a ciclooxigenase tipo 2 (COX2), a fosfolipase A2 e a óxido nítrico sintase induzível (iNOS), responsáveis pela produção de mediadores inflamatórios como a prostaglandina-E2 (PGE2) e o fator de ativação de plaquetas (PAF), além do óxido nítrico (NO). Como resultado direto dessas ações, manifestam-se sintomas como febre, diminuição da sensibilidade à dor, vasodilatação e hipotensão. Outra propriedade pró-inflamatória crucial da IL-1 β é sua influência sobre a expressão de moléculas de adesão, tais como a molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) nas células mesenquimais, e a molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1) nas células endoteliais. Juntamente com a indução de quimiocinas e citocinas, essas propriedades da IL-1 β resulta no recrutamento de células inflamatórias, saindo da circulação para os espaços extravasculares e para os tecidos correspondentes (DINARELLO, 2009; GABAY; LAMACCHIA; PALMER, 2010).

Os neutrófilos desempenham um papel central na inflamação associada à gota, contribuindo para uma variedade de processos inflamatórios. Durante uma crise de gota, a articulação afetada sofre um influxo intenso de neutrófilos. Esse recrutamento de neutrófilos é um marcador importante para o diagnóstico da fase aguda da doença, uma vez que não é observado no líquido sinovial saudável (DALBETH et al., 2019, 2021). A chegada dos neutrófilos à articulação é mediada por vários quimioatraentes, incluindo quimiocinas como CXCL1/2, CXCL8, leucotrieno B4, ativação do complemento, moléculas de adesão como E-selectina e P-selectina, e a promoção da vasodilatação pela IL-1 β . Esses eventos são essenciais para a resposta inflamatória (MITROULIS; KAMBAS; RITIS, 2013).

Uma vez ativados, os neutrófilos liberam uma série de mediadores inflamatórios, incluindo ROS, citocinas, quimiocinas e componentes granulares, como enzimas proteolíticas e peptídeos antimicrobianos (MITROULIS; KAMBAS; RITIS, 2013). Além disso, a formação de Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos (NETs) é uma característica notável desse processo inflamatório. As NETs consistem em uma rede de DNA extracelular associada a histonas e proteínas granulares (BRINKMANN et al., 2004). Elas são liberadas em resposta aos cristais de MSU e moduladas por uma infinidade de fatores, incluindo citocinas inflamatórias como a IL-1 β (MITROULIS et al., 2011; MITROULIS; KAMBAS; RITIS, 2013; SIL et al., 2017). É sugerido que a formação de NETs ocorra de forma a imobilizar e neutralizar os cristais de MSU (SCHORN et al., 2012). No entanto, as NETs também podem contribuir para a inflamação e o dano tecidual. Diferentes elementos presentes em sua estrutura são importantes ativadores do sistema imune inato, como histonas, mieloperoxidases, elastases de neutrófilos, atuando como DAMPs e estimulando a produção de citocinas e quimiocinas que resultam em inflamação aguda, dolorosa e danos aos tecidos (LI et al., 2018). Curiosamente, durante a resolução da inflamação associada à gota, as NETs têm um papel positivo, degradando citocinas pró-inflamatórias (SCHAUER et al., 2014; DALBETH et al., 2021).

Em resumo, os neutrófilos desempenham um papel dual na inflamação da gota: eles são cruciais para a amplificação e manutenção da inflamação na fase aguda da doença, mas também têm um papel importante na resolução da inflamação (SCHETT et al., 2015; SO; MARTINON, 2017).

2.1.4 Resolução espontânea da artrite gotosa aguda

A artrite gotosa aguda apresenta uma característica interessante, que é a autolimitação da crise inflamatória. Caso não haja intervenção, a fase inflamatória se resolve espontaneamente em um período de 7 a 10 dias (WALLACE et al., 1977; DALBETH et al., 2019). Embora vários mecanismos tenham sido propostos para explicar essa resolução espontânea da inflamação, ainda há uma lacuna em relação aos estudos que validem quais mecanismos estão efetivamente envolvidos (STEIGER; HARPER, 2013a).

Uma interrupção da inflamação pode ocorrer por meio de modificações nas

proteínas que revestem os cristais de MSU (STEIGER; HARPER, 2013a). O revestimento dos cristais com imunoglobulina G (IgG) tem sido associado ao desencadeamento da fase inflamatória, uma vez que contribui para a identificação dos cristais e promovem a fagocitose (CHERIAN; SCHUMACHER, 1986). Há evidências que indicam que neutrófilos ativados produzem um mediador solúvel capaz de influenciar o revestimento de IgG nos cristais de MSU, limitando, assim, a inflamação (ROSEN et al., 1986). Notavelmente, Terkeltaub et al. (1984, 1991) demonstraram que os cristais de MSU podem sofrer uma alteração em seu revestimento proteico, por meio da interação com Apolipoproteína B (ApoB) e Apolipoproteína E (ApoE), o que mascara os cristais e suprime a resposta inflamatória neutrofílica.

Por outro lado, um aspecto fundamental na resolução da inflamação é a apoptose dos neutrófilos, seguida pela sua eliminação por macrófagos (AMULIC et al., 2012; MITROULIS; KAMBAS; RITIS, 2013) ou por outros neutrófilos (STEIGER; HARPER, 2013b). Esse processo, conhecido como eferocitose, leva à reprogramação dos macrófagos para um perfil anti-inflamatório (SCHIF-ZUCK et al., 2011; ARIEL; SERHAN, 2012; ELLIOTT; KOSTER; MURPHY, 2017; MAIMON et al., 2020; MOON et al., 2023). A eferocitose promove nos macrófagos uma redução na produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e TNF- α , e, ao mesmo tempo, aumenta os níveis de citocinas anti-inflamatórias, como TGF- β e, em alguns casos, IL-10 (ARIEL; SERHAN, 2012; ELLIOTT; KOSTER; MURPHY, 2017; MAIMON et al., 2020; MOON et al., 2023).

Os neutrófilos desempenham um papel crucial na resolução da artrite gotosa aguda, principalmente por meio da formação de NETs. A agregação das NETs contribui para a resolução da inflamação neutrofílica, ao degradar citocinas e quimiocinas por meio de serina proteases, interrompendo, assim, o recrutamento e a ativação contínua de neutrófilos (SCHAUER et al., 2014).

A regulação positiva de mediadores com propriedades anti-inflamatórias, como o antagonista do receptor de interleucina 1 (IL-1Ra), bem como a IL-10 e do TGF β 1 (MURAKAMI et al., 2002; CHEN et al., 2011; SCANU et al., 2012), além da IL-37 (LIU et al., 2016), juntamente com a ação de mediadores especializados na pró-resolução, como a produção de Anexina A1, (BARDEN et al., 2016; GALVÃO et al., 2017), desempenha um papel crucial na efetiva resolução do surto de gota, mesmo na

presença contínua de cristais de urato monossódico no local inflamado (STEIGER; HARPER, 2013a; DALBETH et al., 2021). As vias de sinalização purinérgicas também desempenham um papel fundamental na orquestração do processo de exacerbação e resolução da gota (HAMIDZADEH; MOSSER, 2016; KLAVER; THURNHER, 2021; LI; GAO; TAO, 2021). Estudos recentes destacam o papel dos metabólitos de purina na patogênese e na resolução da gota. Enquanto o ATP ativa o inflamassoma NLRP3 através dos receptores P2X, desencadeando a secreção de IL-1 β e as crises de gota, a adenosina atua por receptores acoplados à proteína G, exercendo efeitos anti-inflamatórios, influenciando a resolução (LI; GAO; TAO, 2021).

2.1.5 Complicações e comorbidades da artrite gotosa e da hiperuricemia

Pacientes com gota frequentemente apresentam uma série de comorbidades que incluem doença renal, hipertensão, diabetes mellitus tipo II, síndrome metabólica, doença cardiovascular, distúrbios lipídicos e sintomas respiratórios (ROCK; KATAOKA; LAI, 2012; KUO et al., 2015). Algumas dessas comorbidades contribuem para a gota, por exemplo, a doença renal, que pode aumentar os níveis de ácido úrico devido à excreção ineficiente. Não está claro se a gota e a hiperuricemia são causas ou consequências das comorbidades, ou se compartilham um antecessor. A relação precisa de mais estudos para entender a causa-efeito (PILLINGER; GOLDFARB; KEENAN, 2010).

Considerar o vínculo entre a gota/hiperuricemia e as comorbidades é importante. Além disso, avaliar a natureza crônica dessas doenças é crucial. Muitos pacientes enfrentam tanto a gota quanto uma ou mais das doenças mencionadas. Isso significa que os tratamentos medicamentosos para uma condição podem impactar a outra (ROBINSON; HORSBURGH, 2014).

Estudos mostraram que certos medicamentos anti-hipertensivos podem influenciar nos níveis de ácido úrico, como os betabloqueadores, os diuréticos de alça e os tiazídicos, que aumentam os níveis, enquanto alguns inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECA) e bloqueadores dos canais de cálcio o reduzem (STAMP; CHAPMAN, 2012; REES; HUI; DOHERTY, 2014). Da mesma forma, os fármacos usados no tratamento das dislipidemias, como atorvastatina e fenofibrato, diminuem os níveis de ácido úrico (STAMP; CHAPMAN, 2012; REES; HUI;

DOHERTY, 2014). Sob outra perspectiva, foi constatado que pacientes hipertensos tiveram a redução da pressão arterial com o uso de alopurinol, e o fármaco também reduz a morbi/mortalidade por doenças cardiovasculares (FEIG; SOLETSKY; JOHNSON, 2008; STAMP; CHAPMAN, 2012; REES; HUI; DOHERTY, 2014). Além disso, o alopurinol melhora a função renal em pacientes com gota e tem demonstrado retardar a progressão da doença renal (STAMP; CHAPMAN, 2012; REES; HUI; DOHERTY, 2014).

A escolha apropriada do tratamento farmacológico para pessoas com gota e com comorbidades é notoriamente importante para otimizar a terapia medicamentosa, visando potencializar ao máximo os benefícios e minimizar possíveis interações (ROBINSON; HORSBURGH, 2014).

2.1.6 Tratamento

O tratamento da gota requer duas abordagens complementares: uma busca pela redução dos níveis de ácido úrico no sangue e outra focada na diminuição da inflamação. Esse tratamento deve ser adaptado às necessidades individuais, considerando fatores como a experiência prévia do paciente com abordagens medicamentosas e não medicamentosas, a duração e gravidade da crise, as articulações afetadas, condições médicas associadas e contraindicações relevantes (RICHETTE et al., 2017) (KHANNA et al., 2012a, 2012b; RICHETTE et al., 2017).

2.1.7 Tratamento crise aguda (redução da inflamação)

Na abordagem atual para o tratamento de indivíduos com crise aguda de gota e/ou hiperuricemia, é crucial informar os pacientes sobre vários aspectos. Isso inclui a compreensão da fisiopatologia da doença, a disponibilidade de tratamentos eficazes, a potencial presença de comorbidades e fatores de risco cardiovascular, além de fornecer orientações sobre estilo de vida, perda de peso, exercício, consumo excessivo de carnes, frutos do mar e álcool, bem como o manejo de crises agudas e a redução farmacológica dos níveis de ácido úrico no sangue (RICHETTE et al., 2017; FITZGERALD et al., 2020; DALBETH et al., 2021).

O tratamento de primeira linha para artrite gotosa aguda envolve o uso de anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), corticoides ou colchicina. Recomenda-se o início

precoce desses medicamentos, pois isso melhora os resultados terapêuticos (RICHETTE et al., 2017; FITZGERALD et al., 2020). Para crises de intensidade leve a moderada, envolvendo até três pequenas articulações ou duas grandes articulações, a monoterapia com AINEs, colchicina ou corticoides é indicada. Para crises mais intensas, a terapia combinada com colchicina e AINEs, colchicina e corticoides, ou mesmo corticoides intra-articulares pode ser apropriada (RICHETTE et al., 2017).

A principal restrição para o uso de AINEs orais se relaciona com questões de segurança (REES; HUI; DOHERTY, 2014). Para minimizar os riscos de úlceras, hemorragias e perfurações gástricas, é comum combinar o uso de AINEs com inibidores da bomba de prótons (IBP) (REES; HUI; DOHERTY, 2014; RICHETTE et al., 2017). Pacientes com contraindicações ou com intolerâncias gastrointestinais aos AINES convencionais podem se beneficiar com os inibidores seletivos da ciclooxigenase 2 (COX-2) conhecidos como coxibes. O uso de coxibes, embora possam aliviar potenciais problemas gastrointestinais, existe uma preocupação decorrente do uso frequente e/ou prolongado devido à possível toxicidade cardiovascular e renal (CHEN; ASHCROFT, 2007).

A colchicina atua inibindo vários processos biológicos, incluindo divisão celular, função de leucócitos e fatores quimiotáticos, liberação de histamina por mastócitos, ativação do inflamassoma e liberação de IL-1 β . Ela é comparável a agentes biológicos com funções semelhantes, mas se destaca por ser uma opção financeiramente acessível (REES; HUI; DOHERTY, 2014). No entanto, sua eficácia está próxima da dose que causa efeitos gastrointestinais, o que pode levar à interrupção do tratamento antes da resolução da crise (EMMERSON, 1996). Os efeitos adversos da colchicina são dose-dependentes, incluindo diarreia, vômitos, náuseas, dor abdominal, cólicas e, raramente, problemas mais graves, como insuficiência cardíaca, hepatites, neuropatias reversíveis e supressão da medula óssea (MEAD; ARABINDOO; SMITH, 2014).

Evitar a administração de colchicina e AINEs é recomendado em pacientes com insuficiência renal grave. Além disso, é importante notar que a colchicina pode ter interações medicamentosas com inibidores da enzima CYP3A4 do Citocromo P450 e/ou da glicoproteína P, como ciclosporina, cetoconazol, verapamil ou claritromicina. Por essa razão, é aconselhável não usar esses medicamentos ao mesmo tempo ou

considerar a possibilidade de reduzir a dose da colchicina para evitar potenciais complicações (REES; HUI; DOHERTY, 2014; RICHETTE et al., 2017).

Corticoides orais, especialmente prednisolona, podem ser usados quando outras opções são contraindicadas. A administração intramuscular de corticosteroides é outro tratamento alternativo que se limita principalmente às condições hospitalares. Terapias biológicas são opções secundárias, incluindo inibidores da IL-1, embora sejam caros e apresentem riscos (REES; HUI; DOHERTY, 2014; RICHETTE et al., 2017; FITZGERALD et al., 2020). Complementando a ação farmacológica, existem indícios de que a aplicação de gelo no local inflamado pode contribuir para o tratamento da artrite gotosa aguda (SCHLESINGER et al., 2002; DALBETH et al., 2021).

2.1.8 Tratamento crônico (diminuição dos níveis séricos de ácido úrico)

A adesão à terapia de redução de urato (ULT) em pacientes com gota é um problema significativo. Vários fatores contribuem para essa baixa adesão, incluindo percepções negativas da doença por parte dos pacientes e dos profissionais de saúde, falta de conhecimento sobre a condição, suas causas e tratamentos. Idade avançada e presença de comorbidades, como diabetes e hipertensão, estão associadas a maior adesão. Isso sugere que pacientes mais conscientes de sua saúde e com maior compreensão das implicações da doença e do tratamento tendem a ser mais aderentes. Uma compreensão mais profunda das razões subjacentes para a fraca adesão é necessária para melhorar o manejo da gota e garantir que os pacientes recebam o tratamento adequado para esta condição inflamatória crônica (DOHERTY et al., 2012; SPENCER; CARR; DOHERTY, 2012; SCHEEPERS et al., 2018).

O tratamento da gota crônica tem como objetivo reduzir e manter os níveis séricos de urato abaixo de 6,0 mg/dl ao longo da vida. Isso é alcançado através da ULT, que combina a redução de uratos com profilaxia anti-inflamatória para diminuir a frequência de surtos de gota e o tamanho/número de tofos gotosos. A ULT envolve inibidores da xantina oxidase (XOI), uricosúricos e da enzima pegloticase (RICHETTE et al., 2017; FITZGERALD et al., 2020).

O alopurinol, um XOI, é normalmente utilizado como terapia hipouricemiante de primeira linha devido à sua eficácia e baixo custo. Caso os níveis de ácido úrico

circulante não possam ser alcançados com uma dose apropriada de alopurinol, ou se esse medicamento não for tolerado devido à insuficiência renal, torna-se necessário avaliar a medicação e considerar a possibilidade de substituição pelo Febuxostate, por um uricosúrico ou até mesmo pela combinação desses tratamentos (RICHETTE et al., 2017; FITZGERALD et al., 2020).

O Febuxostate, um inibidor seletivo da XO, é considerado uma alternativa adicional de primeira linha. Embora possa ser utilizado sem a necessidade de ajustes de dose ou preocupações com a toxicidade em pessoas com insuficiência renal, é importante ressaltar que o medicamento pode levar à insuficiência hepática. Além disso, seu custo é elevado e apresenta também riscos cardiovasculares (REES; HUI; DOHERTY, 2014; RICHETTE et al., 2017; FITZGERALD et al., 2020).

Os Uricosúricos, que incluem a probenecida, a benzbromarona e a sulfimpirazona, são classificados como medicamentos de segunda linha, sendo utilizados quando ocorre intolerância aos XOI ou em casos de contraindicação destes. Essas substâncias atuam promovendo um aumento na excreção renal de urato. No entanto, é importante observar que o probenecide e a sulfimpirazona não devem ser administrados a pacientes com insuficiência renal grave ou histórico de nefrolitíase, o que limita ainda mais o seu uso. A disponibilidade da benzbromarona tornou-se restrita, principalmente devido a preocupações decorrentes de relatos de hepatotoxicidade grave e supressão da medula óssea (LEE et al., 2008; BACH; SIMKIN, 2014). Nesse contexto, é fundamental considerar não apenas a eficácia desses medicamentos, mas também as limitações e potenciais efeitos adversos associados ao seu uso.

A pegloticase, uma enzima de origem suína, é utilizada em situações de gota tofácea crônica debilitante, quando a terapia hipouricemiante com XOI e/ou medicamentos uricosúricos não é eficaz (RICHETTE et al., 2017; FITZGERALD et al., 2020). Porém, é importante destacar que alguns pacientes podem desenvolver anticorpos contra a pegloticase, limitando seus efeitos no organismo (GANSON et al., 2006).

Alguns fármacos, como losartana, bloqueadores dos canais de cálcio, fenofibrato e estatinas, têm efeitos hipouricemiantes. Pacientes com indicação

primária para esses fármacos devem considerá-los tendo em conta os seus benefícios para ambas as doenças (RICHETTE et al., 2017).

A profilaxia contra crises é uma recomendação importante nos primeiros 6 meses de tratamento. Isso se deve ao fato de que o início da ULT pode expor o paciente aos cristais de MSU, resultando em um aumento da fase aguda da doença e, por consequência, contribuindo para a baixa adesão ao tratamento. Nesse sentido, o uso profilático da colchicina é indicado. Entretanto, é necessário fazer ajustes em pacientes com insuficiência renal e/ou que estejam em uso de estatinas, devido aos riscos potenciais de toxicidade associados (RICHETTE et al., 2017).

2.2 Biologia de Macrófagos

Van Furth et al. (1972) descreveram os macrófagos como células fagocíticas de origem hematopoiética pertencentes à linhagem mieloide. Essas células teriam sua origem a partir de uma célula-tronco hematopoiética (CTH) comum, que se compromete com a linhagem mieloide. Quando expostas ao fator estimulador de colônias de macrófagos, as células progenitoras passam por divisões sucessivas, diferenciando-se primeiramente em monoblastos e, posteriormente, em pró-monócitos. Esses pró-monócitos, por sua vez, amadurecem em monócitos, que deixam a medula óssea e entram na corrente sanguínea. Após permanecerem na corrente sanguínea por alguns dias, os monócitos seguem em direção aos tecidos, onde assumem o papel de macrófagos teciduais. Essa transição não apenas repõe as populações de macrófagos locais, mas também envolve a migração para regiões de tecido inflamado (VAN FURTH et al., 1972; GORDON; TAYLOR, 2005).

Estudos recentes têm revelado que a compreensão da ontogenia dos macrófagos ultrapassou a descrição inicial feita por Van Furth et al. (1972). Nesse sentido, monócitos originados da medula óssea não são os principais contribuintes para parte da população de macrófagos nos tecidos em estado estacionário ou durante certos processos inflamatórios (HASHIMOTO et al., 2013; GINHOUX; JUNG, 2014). De fato, os macrófagos têm origens diversas nos diferentes tecidos. Alguns derivam do saco vitelino, como é o caso da micróglia. Em outros casos, os macrófagos do saco vitelino desempenham um papel inicial, mas são substituídos por monócitos originados no fígado fetal, como os macrófagos alveolares, células de Kupffer e

células de Langerhans (GINHOUX et al., 2016; GINHOUX; GUILLIAMS, 2016; HOEFFEL; GINHOUX, 2018). Em determinadas situações, a população de macrófagos é inicialmente estabelecida por precursores embrionários, sendo posteriormente substituída após o nascimento por monócitos da medula óssea, como observado no coração (EPELMAN et al., 2014), na derme (TAMOUTOUNOUR et al., 2013) e no intestino (BAIN et al., 2014; DE SCHEPPER et al., 2018). Além disso, é importante notar que embora os monócitos desempenhem um papel crucial ao reabastecer as populações de macrófagos residentes em alguns tecidos, é importante ressaltar que os macrófagos têm a capacidade de se autorrenovar *in situ* (GORDON; TAYLOR, 2005; JENKINS et al., 2011).

Os macrófagos desempenham um papel fundamental na imunidade inata, sendo reconhecidos como células efectoras primordiais. A identificação de suas funções e a descrição de seu papel foram realizadas pioneiramente por Elie Metchnikoff. Foi ele quem inicialmente descreveu o mecanismo de fagocitose, cunhando o termo "macrófagos" para descrever as células que desempenham esse processo (derivado do grego "macro", significando grande, e "phagein", significando comer, resultando em "grandes células comedoras"). Além disso, Metchnikoff atribuiu aos fagócitos a responsabilidade de manter a homeostase e defender o organismo, uma concepção que lhe conferiu o Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina em 1908. Esse prestigioso reconhecimento foi compartilhado com Paul Ehrlich, em reconhecimento aos seus notáveis estudos no campo da imunidade (TAUBER, 2003; NATHAN, 2008; CAVAILLON, 2011; YONA; GORDON, 2015).

Com papel central na regulação da homeostase e na modulação da inflamação, os macrófagos desempenham funções essenciais em diversos tecidos, bem como proporcionam defesa contra infecções (GINHOUX; GUILLIAMS, 2016). Essa perspectiva é corroborada por Mosser e Edwards (2008), que destacam o papel predominante dos macrófagos na manutenção da homeostase devido a essas células estarem envolvidas em processos que ocorrem independentemente da sinalização de células imunes, tais como a fagocitose de eritrócitos e a eliminação de detritos celulares e células apoptóticas (MOSSER; EDWARDS, 2008; MOSSER; HAMIDZADEH; GONCALVES, 2020).

Para além do que foi dito, os macrófagos atuam como "transdutores de sinais"

nos tecidos, captando os estímulos fisiológicos e traduzindo-os em respostas adequadas para garantir o funcionamento ideal de órgãos e sistemas. A homeostase regulada pelos macrófagos é de tal importância que essas células estão presentes em praticamente todos os órgãos do corpo (MOSSER; HAMIDZADEH; GONCALVES, 2020). Em muitos cenários, a ausência ou a ativação anormal dos macrófagos resulta em disfunções orgânicas (RENAUD; GRAHAM, 2008; SMITH; MOHUN, 2011; HULSMANS et al., 2017). Essa notável habilidade dos macrófagos demonstra sua plasticidade, tornando-os altamente adaptáveis ao microambiente local e permitindo que adquiram funções específicas dos órgãos e das necessidades locais. Essa adaptação é impulsionada por fatores de transcrição específicos, gerando diversas populações celulares com funções distintas (MOSSER; EDWARDS, 2008).

No final da década de 1990, eram utilizados dois termos para categorizar diferentes populações de macrófagos. Os macrófagos classicamente ativados que eram associados à estimulação por interferon-gama (IFN- γ) juntamente com agonistas de TLR (MACKANESS, 1962; NATHAN et al., 1983) e os macrófagos alternativamente ativados quando estimulados pela interleucina-4 (IL-4) (STEIN et al., 1992) ou pela IL-13 (DOYLE et al., 1994).

No final do século 20, Mills et al. (2000) propuseram a classificação dos macrófagos em M1 e M2, designações que estavam relacionadas à ativação dos macrófagos e à polarização das células T auxiliares CD4⁺ (MILLS et al., 2000). Posteriormente, alguns pesquisadores começaram a subdividir os macrófagos M2 em subgrupos (M2a, M2b e M2c) de acordo com sua resposta aos sinais presentes no ambiente (MANTOVANI et al., 2004; MARTINEZ; GORDON, 2014). Baseado no trabalho de Mantovani et al. (2004), muitos pesquisadores começaram a usar os termos M1 para se referir a macrófagos ativados de maneira clássica e M2 para macrófagos ativados de maneira alternativa *in vitro*, o que infelizmente levou a mais confusão do que esclarecimento na área. Como resultado, muitos pesquisadores podem erroneamente considerar que existem apenas "dois tipos de macrófagos". Essa abordagem resultou na categorização equivocada de todos os macrófagos pró-inflamatórios como M1, inclusive denominando os macrófagos classicamente ativados como M1. Todos os outros fenótipos de macrófagos que não se enquadram nessa classificação foram erroneamente agrupados como M2 ou anti-inflamatórios (ORECCHIONI et al., 2019).

Em 1998, Sutterwala et al. (1998) descreveram uma população de macrófagos capaz de aumentar a produção de IL-10 e reduzir a produção de IL-12 quando ativados *in vitro* por um agonista de TLR na presença de imunocomplexos (SUTTERWALA et al., 1998). Com base nisso, Mosser e Edwards (2008) propuseram a existência de um espectro de ativação de macrófagos, criando uma analogia entre os macrófagos (macrófagos ativados de maneira clássica, macrófagos envolvidos na cicatrização de feridas e macrófagos regulatórios) e as cores primárias que se combinam para formar cores secundárias. Em outras palavras, os macrófagos podem ser ativados de várias formas, exibindo características compartilhadas por mais de uma população, resultando em um amplo "espectro" de populações possíveis, com funções distintas (MOSSER; EDWARDS, 2008).

Para os pesquisadores que não estão familiarizados com o campo dos macrófagos, o uso de marcadores pode ser confuso, principalmente porque os imunologistas estão habituados à forte associação entre marcadores e linhagens celulares (MURRAY et al., 2014). Dado que os estados de ativação dessas células são transitórios, a falta de marcadores de superfície confiáveis para cada população de macrófagos é evidente. No entanto, alguns marcadores alternativos têm sido usados em combinação, ou em sua ausência, para atribuir resultados de ativação. O critério mais sólido para a identificação dessas células é o seu estado funcional de ativação, o qual é caracterizado pelo perfil de citocinas produzidas após o estímulo apropriado (LOPES; MOSSER; GONÇALVES, 2020).

Nos últimos anos, uma variedade de termos têm sido empregados para descrever a ativação de macrófagos (MURRAY et al., 2014). Atualmente, apesar da existência de inúmeras possibilidades, três categorias de macrófagos com estados de ativação distintos são amplamente reconhecidas e reproduzidas *in vitro*: macrófagos classicamente ativados, macrófagos alternativamente ativados e macrófagos denominados regulatórios (EDWARDS et al., 2006; MOSSER; EDWARDS, 2008; MURRAY et al., 2014; MOSSER; GONÇALVES, 2015).

O termo "classicamente ativado" é utilizado para descrever macrófagos efetores envolvidos na resposta imune celular (ADAMS; HAMILTON, 1984). Essa ativação é resultado da estimulação de dois sinais cruciais: o IFN- γ , que ativa o Transdutor de Sinal e Ativador da Transcrição 1 (STAT1), e o TNF, que induz a ativação do NF- κ B.

Além disso, essa ativação pode ser desencadeada por agonistas do TLR, como o LPS (MOSSER, 2003; MOSSER; EDWARDS, 2008; ZHANG; MOSSER, 2008; HAMIDZADEH et al., 2017). O *priming* com IFN- γ pode potencializar a resposta quando combinada com a sinalização por TLR, resultando em um aumento na expressão de genes regulados pelo NF- κ B (HU; IVASHKIV, 2009; QIAO et al., 2013) e na estabilização dos mRNAs que codificam mediadores inflamatórios (BERGERON; OLIVIER, 2006).

A origem desses sinais é variada, com o IFN- γ sendo produzido por células do sistema imune adaptativo, como as células T helper 1 (T_H1), células T citotóxicas CD8⁺ (TCD8⁺), ou até mesmo durante respostas imunes inatas pelas células *natural killer* (NK). Por outro lado, o TNF é gerado tanto pelas células apresentadoras de antígenos (APCs) quanto por agonistas de TLR que operam de forma dependente de MyD88, induzindo a ativação do fator de transcrição NF- κ B e, conseqüentemente, a produção de TNF (MOSSER; EDWARDS, 2008). O IFN- β é produzido endogenamente a partir da ativação de TLR, via TRIF, podendo substituir o sinal de IFN- γ proveniente das células NK e células T (YAMAMOTO et al., 2003; MOSSER; EDWARDS, 2008; MÜLLER et al., 2018; MOSSER; HAMIDZADEH; GONCALVES, 2020).

Essa ativação leva à formação de uma população de macrófagos altamente eficaz na apresentação de antígenos e na eliminação de patógenos e células tumorais. Esses macrófagos se caracterizam por uma produção significativa de citocinas, quimiocinas e mediadores pró-inflamatórios, incluindo as citocinas IL-1 β , IL-12, IL-6, TNF e interferon-beta (IFN- β) e as quimiocinas CXCL9, CXCL10 e CXCL11. Além disso, eles exibem uma expressão aumentada de moléculas como CD80/86, MHC-II e TLR-2/4. Esses macrófagos também têm a capacidade de converter a L-arginina em óxido nítrico por meio da enzima iNOS (MANTOVANI et al., 2004; EDWARDS et al., 2006; MOSSER; EDWARDS, 2008; ZHANG; MOSSER, 2008; MARTINEZ; GORDON, 2014; VIOLA et al., 2019; MOSSER; HAMIDZADEH; GONCALVES, 2020). Apesar de sua importância na defesa do organismo, o controle dessa ativação é crucial para evitar danos aos tecidos do hospedeiro (MOSSER; EDWARDS, 2008).

Por outro lado, o termo "alternativamente ativado", conforme definido por Stein et al. (1992) e Gordon (2003), é empregado para descrever a função dos macrófagos M2, ou como mencionado por Mosser e Edwards (2008), para referir-se aos

macrófagos especializados na cicatrização de feridas. Essa subpopulação de macrófagos, induzida pela liberação de IL-4 por células do sistema imunológico inato (notavelmente basófilos e mastócitos) e adaptativo (como parte da resposta T_H2), é programada para promover a reparação tecidual, inibir a resposta T_H1 e combater helmintos (STEIN et al., 1992; GORDON, 2003; MOSSER; EDWARDS, 2008). Os macrófagos alternativamente ativados são especialmente observados em infecções helmínticas, mediadas por respostas imunes do tipo T_H2 (KREIDER et al., 2007).

A IL-4 estimula a atividade da arginase nos macrófagos, permitindo a conversão da arginina em ornitina, um precursor essencial de poliaminas e colágeno, contribuindo, assim, para a produção da matriz extracelular (KREIDER et al., 2007). Macrófagos tratados com IL-4 ativam os fatores de transcrição STAT6 e IRF4, induzindo a expressão intracelular da molécula semelhante à resistina α (RELM α), também conhecida como FIZZ1, um marcador não observado em outras populações de macrófagos. Além disso, induzem a expressão de ARG-1, YM1, SOCS1, KLF4 e PPAR γ . Adicionalmente, observa-se um aumento na expressão de moléculas como CD209, CD206 (Receptor de Manose) e CD163 (Receptor Scavenger) em humanos (STEIN et al., 1992; LOKE et al., 2002; RAES et al., 2002; MOSSER, 2003; HAMIDZADEH et al., 2017; CHEN et al., 2019; VIOLA et al., 2019). Contudo, assim como ocorre com os macrófagos classicamente ativados, os macrófagos M2 também podem se tornar prejudiciais ao hospedeiro quando sua capacidade de produção de matriz extracelular se desregula, podendo resultar em fibrose tecidual (HESSE et al., 2001).

A mais recente população de macrófagos, descrita por Sutterwala et al. (1998) e posteriormente chamada de macrófagos regulatórios, pode surgir após respostas imunes inatas ou adaptativas. Seu principal papel é atenuar a resposta imune e restringir a inflamação por meio da imunomodulação. Essas células produzem altos níveis da citocina anti-inflamatória IL-10 e reduzem a produção de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-12, tornando-se potentes inibidores da inflamação. Assim como os M1, eles exibem uma expressão aumentada de moléculas como CD80/86, MHC-II. Esses macrófagos também têm a capacidade de converter a L-arginina em óxido nítrico por meio da enzima iNOS (MOSSER, 2003; MOSSER; EDWARDS, 2008; FLEMING; MOSSER, 2011; VIOLA et al., 2019).

Para induzir um perfil regulatório, são necessários dois estímulos. O primeiro estímulo, por si só, não possui função estimulante e pode ser originado de imunocomplexos, prostaglandinas, adenosinas, IL-10, células apoptóticas, entre outros. Entretanto, quando ocorre o segundo estímulo, que provém de um agonista de TLR, como o LPS, induz-se o desenvolvimento dessas células que produzem altos níveis de IL-10, sendo a característica mais importante e confiável para identificar que as células reprogramadas se tornaram macrófagos regulatórios (GERBER; MOSSER, 2001; EDWARDS et al., 2006; WANG et al., 2019a). Dado que existem diversas formas de gerar macrófagos com propriedades imunorreguladoras, esses foram agrupados como "RMφs" e chegou-se a um consenso de que cada um desses RMφs deve ser identificado pelo estímulo utilizado para sua geração (MURRAY et al., 2014; CHANDRASEKARAN et al., 2019). A síntese da citocina reguladora TGFβ pelos macrófagos, após a ingestão de células apoptóticas na presença de sinais pró-inflamatórios, pode igualmente desempenhar um papel na capacidade imunorreguladora desses macrófagos (FADOK et al., 1998).

A ativação das MAPKs (ERK, p38) é aumentada em macrófagos estimulados com IC e agonista de TLR (LUCAS et al., 2005; MOSSER; EDWARDS, 2008; WANG et al., 2019a). A ativação da ERK promove a fosforilação de histonas no promotor da IL-10, tornando-o acessível aos fatores de transcrição que estimulam a expressão do gene da IL-10 (LUCAS et al., 2005; HAMIDZADEH et al., 2017). A superprodução de IL-10 em resposta à estimulação de macrófagos na presença de IC ocorre rapidamente, com transcritos detectáveis em minutos e produção de citocinas mensurável no sobrenadante em uma hora (ZHANG; EDWARDS; MOSSER, 2006).

Dessa forma, os macrófagos desempenham uma variedade de funções que dependem do seu fenótipo, desempenhando um papel fundamental na manutenção da saúde humana e podendo influenciar tanto na recuperação quanto na progressão de doenças (**Figura 3**). Portanto, torna-se crucial o controle do perfil de ativação dos macrófagos em terapias tanto de alcance sistêmico quanto local.

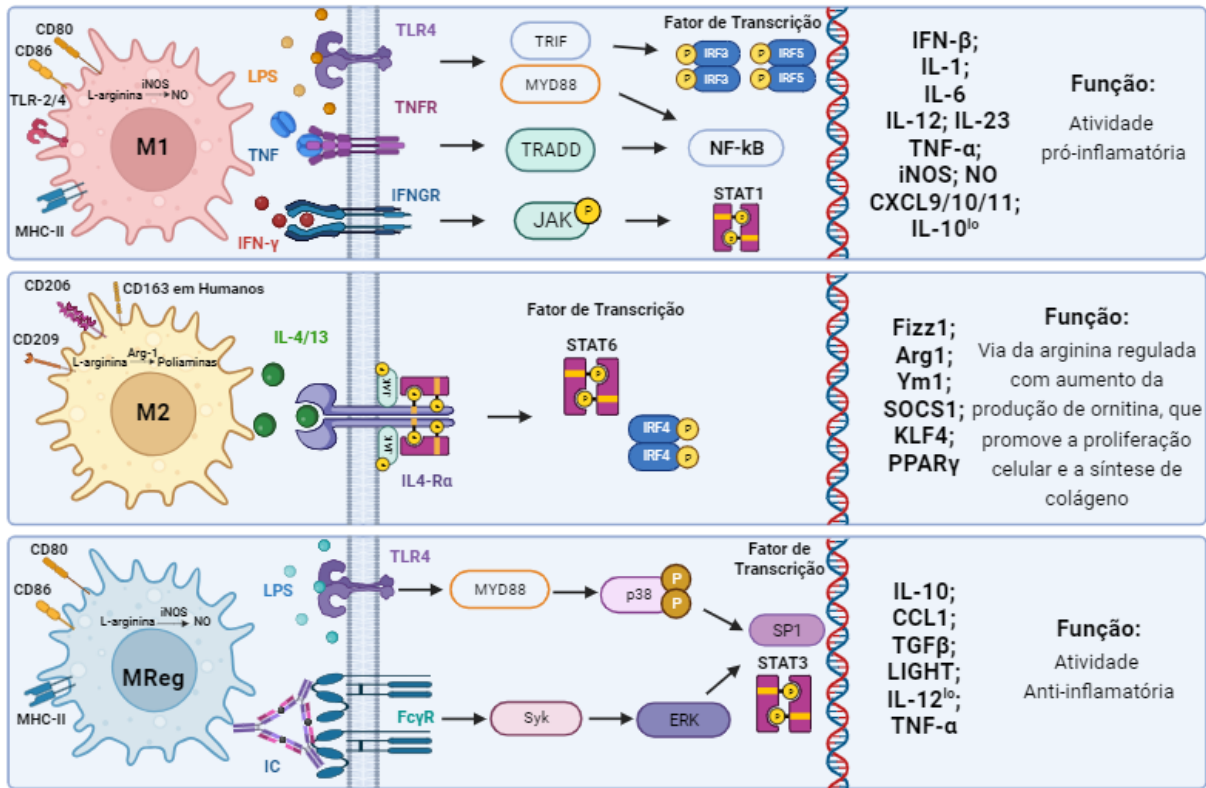


Figura 3 - Perfil e Funções das Subpopulações de Macrófagos na Resposta Imune.

Demonstração da ativação de macrófagos, com foco nas subpopulações M1, M2 e regulatórios. M1 (Classicamente Ativados): Estes macrófagos são ativados por IFN-γ e TNF, resultando em uma resposta imune pró-inflamatória. Eles produzem citocinas como IL-1β, IL-12 e TNF-α, além de óxido nítrico. Expressam moléculas como CD80/86 e MHC-II, promovendo a apresentação de antígenos e a eliminação de patógenos. M2 (Alternativamente Ativados): Induzidos pela IL-4, esses macrófagos promovem a reparação tecidual, suprimem respostas imunes do tipo T_H1 e combatem helmintos. Produzem ornitina, contribuindo para a matriz extracelular. Expressam marcadores como RELMα, ARG-1, CD209, CD206 e CD163. Macrófagos Regulatórios (RMφs): São especializados na imunomodulação e na restrição da inflamação. Produzem altos níveis de IL-10 e reduzem citocinas pró-inflamatórias como IL-12. Sua ativação requer dois estímulos, sendo o segundo frequentemente proveniente de agonistas de TLR. O equilíbrio entre essas subpopulações é crucial para a resposta imune e a obtenção da homeostase. Arg1: Arginase 1; CCL1: Quimiocina com Motivo C-C 1; CD80: Cluster de Diferenciação 80; CD86: Cluster de Diferenciação 86; CD163: Cluster de Diferenciação 163; CD206: Cluster de Diferenciação 206; CD209: Cluster de Diferenciação 209; CXCL9/10/11: Quimiocina (motivo C-X-C) Ligante 9/10/11; ERK: Quinase Regulada por Sinal Extracelular; FCγR: Receptor Fc Gama; Fizz1: Encontrado na Zona Inflamatória 1; IFN-β: Interferon-beta; IFN-γ: Interferon-gama; IFNGR: Receptor do Interferon-gama; IL-1: Interleucina-1; IL-4: Interleucina-4; IL-6: Interleucina-6; IL-10: Interleucina-10; IL-12: Interleucina-12; IL-13: Interleucina-23; IL-23: Interleucina-23; IL-4Rα: Receptor Alfa da Interleucina-4; iNOS: Óxido Nítrico Sintase Induzível; JAK: Janus Kinase; KLF4: Fator 4 semelhante ao Krüppel; LIGHT: Lymphotoxin-like, com Expressão Induzível e

Competição com a Glicoproteína D do HSV para o HVEM, um Receptor Expresso por Linfócitos T; LPS: Lipopolissacarídeo; MHC-II: Complexo Principal de Histocompatibilidade Classe II; MYD88: Resposta Primária de Diferenciação Mieloide 88; NF- κ B: Fator Nuclear Kappa B; NO: Óxido Nítrico; PPAR γ : Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma Gama; SP1: Proteína de Especificidade 1; STAT: Fator de Transcrição de Sinalização e Ativação de Transcrição; Syk: Quinase de Tirosina de Baço; TGF β : Fator de Crescimento Transformador Beta; TLR: Receptor Toll-Like; TNF: Fator de Necrose Tumoral; TNFR: Receptor do Fator de Necrose Tumoral; TNF- α : Fator de Necrose Tumoral Alfa; TRADD: Domínio Associado ao Receptor de Fator de Necrose Tumoral; TRIF: Adaptador com Domínio Receptor Toll/IL-1-Induzindo Interferon-beta. Adaptado de: (KASHFI; KANNIKAL; NATH, 2021). Criado em: Biorender.com

2.2.1 Macrófagos e seu papel na articulação saudável e na gota

A sinóvia é um tecido que desempenha várias funções essenciais dentro das articulações. Ela é composta por duas camadas principais: a íntima e a subíntima. Na camada íntima, encontram-se os sinoviócitos, que são células com características de fibroblastos e de macrófagos. Por outro lado, a camada subíntima compreende o tecido conjuntivo subjacente, composto por fibroblastos, células adiposas, macrófagos e vasos sanguíneos (LIU et al., 2022). Os fibroblastos sinoviais desempenham um papel fundamental na criação da matriz extracelular que sustenta a estrutura da membrana sinovial, enquanto secretam ácido hialurônico e lubrificina no líquido sinovial. Em contrapartida, os macrófagos do tecido sinovial são as células residentes mais abundantes na sinóvia saudável, embora suas funções durante a homeostase permaneçam pouco definidas (KUROWSKA-STOLARSKA; ALIVERNINI, 2017).

Conforme mencionado por Kurowska-Stolarska e Alivernini (2017), devido à localização dos macrófagos sinoviais na superfície da membrana sinovial e ao seu contato direto com o líquido sinovial em articulações saudáveis, há sugestões de que essas células desempenhem um papel especializado na reciclagem dos componentes lubrificantes do líquido sinovial e na liberação de fatores reguladores para a cartilagem e a renovação óssea. Similarmente a outros macrófagos residentes nos tecidos, eles também podem eliminar detritos celulares e patógenos, contribuindo assim para a prevenção de inflamações estéreis e sépticas (KUROWSKA-STOLARSKA; ALIVERNINI, 2017).

Os macrófagos sinoviais podem ser subdivididos em diversas subpopulações. Estudos recentes mostraram que essas células têm funções variadas, delineando um

rico conjunto de agrupamentos fenotípicos distintos entre os macrófagos residentes e aqueles que infiltram os tecidos. Enquanto algumas subpopulações de macrófagos residentes desempenham um papel mais proeminente na patogênese articular, outros fenótipos desempenham um papel fundamental na remissão da doença (CULEMANN et al., 2019; ALIVERNINI et al., 2020; KUROWSKA-STOLARSKA; ALIVERNINI, 2022; LIU et al., 2022).

Os macrófagos residentes no tecido, identificados como CX3CR1⁺, desempenham um papel crucial na formação de uma barreira imunológica interna no revestimento sinovial através da expressão de proteínas de junção. Isso permite o isolamento efetivo da articulação, protegendo-a contra patógenos e controlando o influxo de células inflamatórias (CULEMANN et al., 2019; ALIVERNINI et al., 2020). Além disso, essas células possuem a capacidade de se autorrenovar por meio da proliferação local (CULEMANN et al., 2019).

Na presença de cristais de MSU, os macrófagos residentes liberam IL-1 β , uma citocina crucial no desencadeamento da patogênese da gota, contribuindo para o recrutamento de neutrófilos e a formação de NETs por essas células (MARTIN; WALTON; HARPER, 2009). Monócitos também são atraídos para o local da inflamação em resposta aos cristais de MSU e liberam citocinas pró-inflamatórias (MARTIN et al., 2011).

A autorregulação da inflamação pelos macrófagos pode explicar a natureza autolimitada da gota aguda, bem como o fato de que a presença de cristais de MSU em uma articulação nem sempre está associada a sinais e sintomas inflamatórios (YAGNIK et al., 2000, 2004; LANDIS et al., 2002). Estudos descreveram uma autorregulação purinérgica em macrófagos estimulados por TLR, que envolve a produção de ATP, sua conversão em adenosina e a ativação de receptores P1 para reduzir citocinas inflamatórias e promover citocinas anti-inflamatórias (HAMIDZADEH; MOSSER, 2016). Além disso, os receptores purinérgicos P2Y14 e P2Y11 desempenham papéis distintos, com o P2Y14 promovendo respostas pró-inflamatórias e o P2Y11 suprimindo a resposta inflamatória em macrófagos (KLAVER; THURNHER, 2021). Isso poderia explicar por que a presença de cristais de MSU nas articulações, nem sempre desencadeia a ativação de macrófagos para um perfil inflamatório.

As variações na resposta dos macrófagos estão intimamente ligadas ao processo de ativação dessas células, que se adaptam de maneira notável ao ambiente em que se encontram (MOSSER; HAMIDZADEH; GONCALVES, 2020). À medida que avançamos na compreensão da plasticidade dessas células, surge o conceito de um "espectro" de diferentes populações de macrófagos (MOSSER; EDWARDS, 2008). Essa ideia sugere que os macrófagos podem existir em estados variados, cada um com funções e respostas específicas, dependendo do ambiente em que estão presentes (MOSSER; EDWARDS, 2008; MOSSER; HAMIDZADEH; GONCALVES, 2020). Este entendimento mais amplo e dinâmico do papel dos macrófagos permite uma visão mais profunda de como essas células afetam tanto o desencadeamento quanto a resolução dos processos inflamatórios.

2.2.2 O papel da IL-10 como citocina anti-inflamatória, na atividade dos macrófagos regulatórios e na resolução da gota

Identificada por Fiorentino et al. (1989), a IL-10 é o membro pioneiro de uma família de citocinas que inclui IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28 e IL-29. Seu receptor (IL-10R) pertence à categoria de receptores de citocinas classe II (OUYANG et al., 2011; OUYANG; GARRA, 2019).

A IL-10 é uma proteína secretada por várias células do sistema imunológico, tanto do sistema inato quanto do adaptativo. Isso inclui células dendríticas (DC), macrófagos, monócitos, mastócitos, células NK, eosinófilos, neutrófilos e praticamente todos os subconjuntos de células T (incluindo células T efectoras T_H1 , T_H2 e T_H17 , Treg e células TCD8⁺) e células B (ASADULLAH; STERRY; VOLK, 2003; MOSSER; ZHANG, 2008; OUYANG et al., 2011; OUYANG; GARRA, 2019; WEI; WANG; LI, 2020; CARLINI et al., 2023).

Essa citocina exerce seu efeito no sistema imunológico ao se ligar aos receptores IL-10R α e IL-10R β , que são amplamente expressos na maioria das células do sistema imunológico e em muitos outros tipos celulares não ligados ao sistema imune. Importante ressaltar que a IL-10R α está principalmente presente em leucócitos. Essa especificidade faz com que a IL-10 regule principalmente as respostas imunológicas em leucócitos, enquanto todos os outros membros regulam preferencialmente outros tipos de células, especialmente células epiteliais (OUYANG

et al., 2011; OUYANG; GARRA, 2019; WANG et al., 2019b).

A transdução de sinal das citocinas da família IL-10 ocorre por meio da ativação da via de sinalização envolvendo a Janus kinase (Jak) e os fatores de transcrição STAT. Como mencionado anteriormente, os receptores da família IL-10 têm duas subunidades, α e β . As subunidades α do receptor estão sempre associadas ao Jak1, enquanto Jak2 ou Tyk2 estão ligados às subunidades β . Quando o ligante se une ao receptor, ele inicia o recrutamento e a fosforilação dos STATs. Esses STATs se deslocam para o núcleo da célula, onde induzem a transcrição de genes específicos (OUYANG; GARRA, 2019; WANG et al., 2019b).

A IL-10 é considerada como uma citocina imunorreguladora chave, com atividades multifuncionais, que exercem efeitos múltiplos e, às vezes, até opostos nas células do sistema imunológico. Desempenha um papel crucial na regulação da resposta imunológica, reduzindo a inflamação e protegendo o organismo contra danos teciduais. Ela tem efeitos supressores em células do sistema imunológico, inibindo citocinas pró-inflamatórias, células apresentadoras de antígenos e células T (MOSSER; ZHANG, 2008; OUYANG et al., 2011; CARLINI et al., 2023).

Essa citocina possui meia-vida curta e baixa estabilidade *in vivo*, o que representa uma desvantagem significativa no seu uso terapêutico (CARLINI et al., 2023). Além disso, a IL-10 é frequentemente distribuída para muitas células diferentes que possuem receptores para IL-10, tornando difícil a sua concentração em áreas inflamadas (HAMIDZADEH et al., 2017). Portanto, uma abordagem potencialmente mais eficaz na regulação da inflamação pode ser a indução local de IL-10 por células da imunidade inata.

Diversos estudos têm demonstrado a promissora atuação da IL-10 na resolução da inflamação causada pela artrite gotosa. Por exemplo, uma pesquisa que empregou a terapia gênica da IL-10 por meio de um vetor de retrovírus constatou que a IL-10 exerceu um efeito anti-inflamatório em um modelo de gota aguda em camundongos (MURAKAMI et al., 2002). Além disso, outro estudo revelou que os níveis de IL-10 no fluido articular de pacientes com gota eram significativamente superiores em comparação com pacientes diagnosticados com osteoartrite ou indivíduos saudáveis. Tais níveis elevados estavam associados à resolução

espontânea da artrite gotosa aguda (CHEN et al., 2011). Outra pesquisa indicou que pacientes em remissão da gota aguda apresentavam concentrações séricas significativamente mais baixas de IL-1 β e TNF- α . Por outro lado, as concentrações de IL-10 eram consideravelmente mais altas em comparação com pacientes diagnosticados com artrite gotosa aguda (ZHANG et al., 2021). Adicionalmente, um estudo revelou que a artrite induzida por antígeno foi exacerbada em camundongos IL-10KO. Isso esteve associado ao aumento da expressão sinovial dos componentes do inflamassoma NLRP3 e à expressão localizada de IL-1 β , sugerindo o papel da IL-10 como regulador negativo do inflamassoma (GREENHILL et al., 2014).

A importância dessa citocina na limitação de doenças autoimunes e seu papel na imunossupressão já foram demonstrados em numerosos estudos (GERARD et al., 1993; ROTT; FLEISCHER; CASH, 1994; PENNLINE; ROQUE-GAFFNEY; MONAHAN, 1994; VAN LAETHEM et al., 1995; TANAKA et al., 1996; PERSSON et al., 1996; BARBARA et al., 2000; ASADULLAH; STERRY; VOLK, 2003; MOSSER; ZHANG, 2008; OUYANG et al., 2011; WANG et al., 2019b; OUYANG; GARRA, 2019; WEI; WANG; LI, 2020; LOPES; MOSSER; GONÇALVES, 2020; LOPES et al., 2021). No entanto, em algumas infecções, a IL-10 pode contribuir para doenças crônicas. Modelos animais que apresentam aumento na expressão de IL-10 estão associados à exacerbação de infecções oportunistas ou à promoção de um ambiente imunossupressor em tumores (SICA et al., 2000; MOSSER; ZHANG, 2008). Isso sugere que, embora a IL-10 desempenhe um papel crucial na regulação da resposta imunológica, seu excesso ou atividade descontrolada pode ter efeitos desfavoráveis.

Apesar desses desafios, a IL-10 continua sendo considerada um alvo promissor para o tratamento de doenças inflamatórias devido às suas propriedades anti-inflamatórias intrínsecas e seu potencial para modular a resposta imunológica (WANG et al., 2019b). Estratégias farmacológicas destinadas a potencializar ou restaurar a ação imunomoduladora da IL-10 podem representar novos caminhos promissores para neutralizar a tempestade de citocinas decorrente da inflamação exacerbada e mitigar eficazmente complicações graves em várias doenças inflamatórias (CARLINI et al., 2023).

3 JUSTIFICATIVA

Embora os conhecimentos sobre o início da inflamação aguda da gota sejam bem descritos, não há um tratamento específico, sendo o foco principal a redução da inflamação e da intensa dor (RICHETTE et al., 2017). A gota gera altos custos em cuidados de saúde, especialmente durante episódios agudos, resultando em atendimentos de emergência, hospitalizações e perda significativa de produtividade no trabalho (SHIELDS; BEARD, 2015). Portanto, torna-se de suma importância explorar alternativas terapêuticas que possam aliviar a recorrente inflamação aguda, a fim de prevenir deformações articulares ao longo do tempo e a perda de função.

Neste contexto, os macrófagos podem ser considerados um dos principais alvos de estudo para o desenvolvimento de terapias para o controle da gota, afinal, são as células ativadas pelos cristais, que induzem um influxo intenso de neutrófilos e participam ativamente da patogênese das lesões e da intensa dor (MARTIN; WALTON; HARPER, 2009; SO; MARTINON, 2017). Isso por si, já seria considerado uma importante característica que justificasse seu enfoque como alvo terapêutico na gota. Ou seja, métodos terapêuticos que visem o controle de ativação dos macrófagos em resposta aos cristais, podem ser considerados importantes no controle da doença. Ocorre que os macrófagos, como nenhuma outra célula, apresentam importante característica de plasticidade, que na maioria das vezes, visa a manutenção da homeostase tecidual (MOSSER; EDWARDS, 2008; MOSSER; HAMIDZADEH; GONCALVES, 2020).

Com isso, os mesmos macrófagos que são estimulados para que respondam inflamando, são também as células que podem alterar completamente sua fisiologia, desinflamando e controlando a gota (MOSSER; EDWARDS, 2008). Portanto, analisar, avaliar e explorar as potenciais ações anti-inflamatórias e pró-resolutivas dos macrófagos regulatórios é uma abordagem inovadora como terapia para doenças inflamatórias.

Nesse sentido, a investigação de novas estratégias terapêuticas para a artrite gotosa, que busquem regular a atividade dos macrófagos ou modificar seu perfil de ativação para um perfil regulatório, pode ser uma ferramenta importante no desenvolvimento de novas tecnologias para controlar a doença.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Investigar e avaliar o potencial terapêutico dos macrófagos regulatórios, visando aprimorar a compreensão e a aplicação do seu efeito em um modelo de gota, com foco na inflamação.

4.2 Objetivos específicos

- Avaliar, por meio de ensaios *in vitro*, a cinética de liberação de citocinas por macrófagos polarizados em diferentes perfis.
- Investigar, por meio de estudos *in vitro*, a capacidade dos macrófagos regulatórios de reduzir as citocinas inflamatórias-chave associadas à artrite gotosa aguda.
- Avaliar, por meio de contagem global, diferencial de leucócitos e liberação de citocinas, o papel desempenhado por macrófagos não estimulados e macrófagos regulatórios quando introduzidos na cavidade peritoneal duas horas antes do desafio com cristais de MSU, utilizando um modelo murino.
- Investigar a cinética da resposta inflamatória nas articulações após a administração de cristais de MSU em camundongos, utilizando a contagem global, diferencial de leucócitos intra-articulares e liberação de citocinas.
- Investigar, através da contagem global, diferencial de leucócitos intra-articulares e liberação de citocinas, o impacto de macrófagos não estimulados e da terapia imune celular com macrófagos regulatórios quando administrados na cavidade articular duas horas antes da indução da artrite gotosa aguda em um modelo murino.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 de 6 a 8 semanas, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os camundongos foram mantidos no biotério do departamento de Patologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG. Os experimentos foram realizados em ambientes separados do local de alojamento. Foram ofertadas ração e água sem restrições para os animais. Houve controle de temperatura (28 a 30°C), umidade (50%), ventilação e ciclo da luz (claro/escuro de 12/12 horas).

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de ética no uso de animais (CEUA) sob o protocolo de pesquisa número 330/2019.

5.2 Preparo dos cristais de MSU

Utilizamos o método descrito por Seegmiller et al. (1962) adaptado por Amaral et al., (2012). Para preparo dos cristais, 1,68 g de ácido úrico (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, USA) foram adicionados em 500 ml de uma solução de hidróxido de sódio (NaOH 0,01 M) (J.T. Baker). A solução obtida foi colocada em agitação a 70°C por 10 minutos. Transcorrido esse tempo e após a solução atingir a temperatura ambiente, foi adicionado NaOH (1M) para manter a solução com o pH entre 7,1 e 7,2 para que ocorra a dissolução. Posteriormente a solução foi filtrada em filtro de 0,22 µm em capela de fluxo laminar e deixada em tubos do tipo Falcons de 50 ml, em temperatura ambiente para a cristalização. Após alguns dias, a solução com os cristais foi coletada e centrifugada (7.000 rpm, 10 minutos, 4°C) e o sobrenadante descartado. Posteriormente, duas lavagens do precipitado com álcool absoluto foram realizadas para a retirada de umidade remanescente. Além disso, a solução foi submetida ao processo de sonicação (Banho de Limpeza Ultrassom, Modelo: Q335D, Fabricante: QUIMIS) para padronizar e diminuir o tamanho dos cristais e posteriormente foi deixada secando em temperatura ambiente em condições estéreis. Após secar, os cristais foram autoclavados e, então, ressuspensos em solução salina na concentração desejada, foram novamente submetidos ao processo de sonicação e mantidos congelados a -20°C até utilização.

5.3 Indução da gota por injeção intra-articular de cristais de MSU

Os cristais de MSU obtidos foram diluídos em solução salina para a injeção intra-articular de 10 µl contendo 100 µg do cristal. Para a indução da gota, os animais foram anestesiados com uma solução de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (15 mg/kg) diluídos em solução salina tamponada (PBS - *phosphate buffered saline*), via intraperitoneal. Em seguida, os pelos da região tíbio-femoral foram removidos para administração da injeção de 10 µl do cristal (100 µg/cavidade).

5.4 Isolamento de macrófagos da medula óssea

Macrófagos derivados da medula óssea de camundongos foram isolados como descrito anteriormente por Gonçalves et al (2023). Sucintamente, a medula óssea foi isolada do fêmur e da tíbia de camundongos C57BL/6, saudáveis e com idade entre 6 e 8 semanas. A extração ocorreu em capela de fluxo laminar e as células foram lavadas com PBS, suplementado com 50 UI/ml de penicilina (United States Biological) e 50 µg/ml de estreptomicina (United States Biological). As células foram centrifugadas a 300 G por 10 minutos a 4°C e ressuspensas em meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium - F12 (DMEM/F12, Gibco), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) inativado (Cultilab), 50 IU/ml de penicilina e 50 µg/ml de estreptomicina e 20% de sobrenadante de cultura de fibroblastos L929 contendo fator estimulador de colônia (M-CSF – *Macrophage Colony Stimulating Factor*), necessário para diferenciação das células precursoras da medula óssea em macrófagos. As células foram dispostas em placas de Petri (Corning, EUA) e mantidas em incubadora a 37°C, CO₂ a 5% e umidade a 75%, entre 7 e 10 dias (**Figura 1**). Após a diferenciação, as células foram removidas das placas de Petri com PBS e *cellstripper* (Corning, EUA), centrifugadas a 300 G por 10 minutos a 4°C e ressuspensas em meio DMEM/F12 suplementado com 10% de SFB inativado, 50 IU/ml de penicilina e 50 µg/ml de estreptomicina (DMEM completo). A contagem e a viabilidade das células foram avaliadas pelo azul de Tripán em câmara de Neubauer.

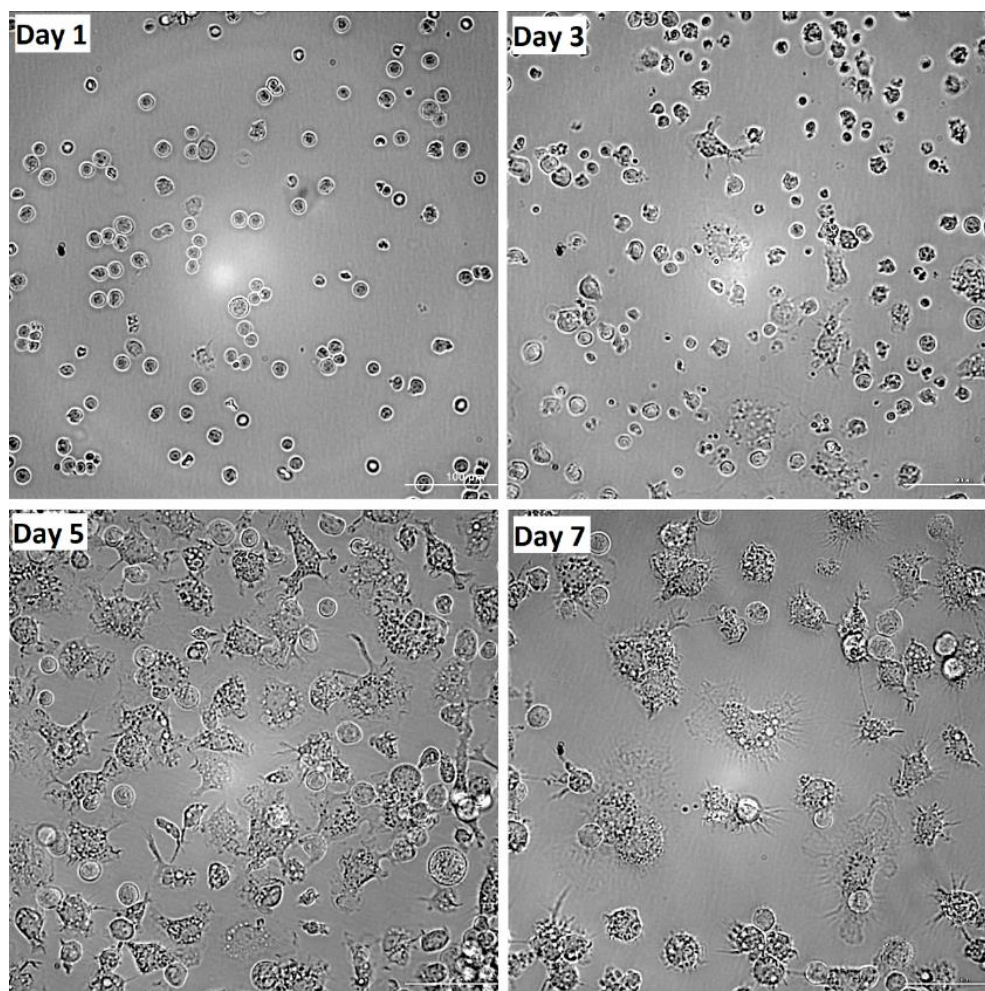


Figura 4 - Diferenciação das células da medula óssea em macrófagos.

Cinética de transformação de progenitores de medula óssea de camundongos para macrófagos nos dias 1, 3, 5 e 7. O brilho e o contraste foram ajustados após a aquisição de imagens usando filtro DIC 20X. Barra = 100 µm. Os dados foram obtidos por microscopia de fluorescência e contraste de fase no Centro de Aquisição e Processamento de Imagens (CAPI-ICB/UFMG) (Fonte: GONÇALVES et al., 2023).

5.5 Estímulo de macrófagos

Após contagem em câmara de Neubauer, os macrófagos foram estimulados para ativação em diferentes perfis de acordo com o protocolo descrito por Mosser e Gonçalves (2015). Sucintamente, 1×10^6 macrófagos foram distribuídos em um volume final de 1 ml de DMEM completo. Aos macrófagos sem estímulos foram adicionados somente DMEM completo. Aos macrófagos classicamente ativados (M1) foi adicionado LPS na concentração de 10 a 20 ng/ml (Ultrapure LPS, E. coli 0111:B4; InvivoGen). Os macrófagos alternativamente ativados (M2) foram obtidos através da

indução com IL-4 na concentração de 20 ng/ml (Recombinant Murine IL-4; PeproTech Inc.). Para polarizar os macrófagos para um perfil regulatório, foram testados cinco diferentes imunocomplexos em combinação com LPS (MOSSER; GONÇALVES, 2015). O objetivo era identificar o estímulo mais eficaz na produção de IL-10 e na diminuição de IL-12. Os seguintes imunocomplexos foram produzidos e avaliados: Beads de poliestireno adsorvidas a IgG de coelho (DALBY et al., 2020), Adenosina (ADO) (FLEMING et al., 2015), Eritrócitos de ovelha opsonizados com IgG (E-IgG) (SUTTERWALA et al., 1998; GALLO; GONÇALVES; MOSSER, 2010), IgG de coelho/Anti-IgG de coelho e Prostaglandina E2 (PGE2) (FLEMING et al., 2015).

5.6 Produção de macrófagos regulatórios utilizando Beads/IgG de coelho

A ligação entre as Beads de poliestireno e o anticorpo IgG de coelho (10 mg/ml) foi empregada para induzir a polarização de macrófagos regulatórios, seguindo o protocolo descrito por Dalby et al. (2020). Em resumo, 100 µl de Beads de poliestireno (Sigma Aldrich, EUA - 10 mg/ml), com tamanho de 1,1 µm, foram pipetados para um tubo Eppendorf de 1,5 ml e submetidos a três lavagens com 1 ml de tampão de 2-Morpholinoethanesulfonic acid monohydrate (MES) a 25 mM e pH 6,1, obtendo uma concentração final de 1 mg/ml. Após cada lavagem, as Beads foram centrifugadas a 680 G por 5 minutos a 4°C. Após o preparo das Beads, 40 µl destas foram adicionadas a IgG de coelho (Innovative Research, EUA; Rheabiotech, Brasil; IgG purificada a partir de soro normal total por cromatografia de afinidade à proteína A ou pela precipitação por sulfato de amônio) em diferentes concentrações (0,05 mg/ml; 0,1 mg/ml; 0,2 mg/ml; 0,4 mg/ml; 0,8 mg/ml; 1,6 mg/ml; 3,0 mg/ml; 4,0 mg/ml), assim como ao tampão MES em um volume final de 400 µl. A mistura resultante foi mantida em rotação a 4°C overnight. No dia seguinte, antes de sua utilização, o imunocomplexo preparado foi centrifugado a 2.700 G por 5 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspenso em 0,4 ml de MES. Para a ativação dos macrófagos in vitro, foram utilizados 50 µL do imunocomplexo em combinação com 10 ng de LPS por ml.

5.7 Produção de macrófagos regulatórios utilizando Prostaglandina (PGE2) ou Adenosina (ADO)

A ativação dos macrófagos regulatórios foi realizada utilizando 200 nM de

PGE2 (Cayman Chemical, EUA) ou 200 μ M de ADO (Sigma Aldrich, EUA), ambos em combinação com 10 ng/ml de LPS, para a ativação dos macrófagos *in vitro*. Resumidamente, uma porção de PGE2 previamente congelada e armazenada em álcool etílico absoluto, na concentração de 10 mM, foi diluída no meio de cultura DMEM, a fim de ser utilizada na concentração final de 200 nM por ml. Inicialmente, a PGE2 foi adicionada ao tubo contendo 1×10^6 macrófagos, seguida pela adição do LPS (10 ng/ml). Por sua vez, para a ADO, uma amostra da substância na concentração de 100 mM foi diluída no meio de cultura DMEM, a fim de obter a concentração final de 200 μ M por ml. No início do procedimento, a ADO foi introduzida ao tubo contendo 1×10^6 macrófagos, seguida pela adição do LPS (10 ng/ml).

5.8 Produção de macrófagos regulatórios utilizando IgG de coelho e anticorpo anti-IgG de coelho

Foram empregados anticorpos IgG de coelho (Innovative Research, EUA; Rheabiotech, Brasil; IgG purificado a partir de soro normal total por cromatografia de afinidade à proteína A ou pela precipitação por sulfato de amônio) e anticorpo de cabra Anti-IgG de coelho (Rheabiotech, Brasil) na proporção de 1 parte de anticorpo Anti-IgG de coelho para 30 partes de IgG de coelho, com ou sem 10 μ l de *beads* de poliestireno e tampão MES, resultando em um volume final de 100 μ L. A mistura obtida foi mantida em rotação a 4°C overnight. No dia seguinte, antes do uso, o imunocomplexo preparado foi submetido a centrifugação a 2.700 G por 5 minutos a 4°C, descartando-se o sobrenadante e ressuspendendo o *pellet* em 100 μ L de tampão MES. Para a ativação dos macrófagos *in vitro*, 100 μ L do imunocomplexo foram combinados com 10 ng de LPS por ml.

5.9 Produção de macrófagos regulatórios utilizando hemácias de ovelha e anticorpo anti-hemácias de ovelha

Eritrócitos de ovelha opsonizados com IgG (E-IgG) foram produzidos de acordo com descrições anteriores (SUTTERWALA et al., 1998; GALLO; GONÇALVES; MOSSER, 2010), utilizando um anticorpo de coelho anti-eritrócitos de ovelha (Cappel MP Biomedicals, EUA - 14,4 mg/ml). Os eritrócitos de ovelha (SRBC) foram mantidos a 4°C por uma semana para permitir a inativação dos leucócitos. Posteriormente, foram lavados três vezes com PBS. Após cada lavagem, as SRBC foram centrifugadas

a 300 G por 10 minutos a 4°C. Foi retirada uma alíquota de 1 ml, e a contagem de hemácias nessa alíquota foi realizada na câmara de Neubauer. Para a formação do imunocomplexo, 2×10^8 SRBC foram incubados com IgG anti-SRBC de coelho em títulos que não causassem aglutinação (10 µg/ml), juntamente com PBS, totalizando 500 µL, que foi mantido em rotação por 40 minutos à temperatura ambiente. Os E-IgG foram então centrifugados a 300 G por 10 minutos a 4°C e suspensos em PBS antes de serem adicionados aos macrófagos. Os eritrócitos foram incorporados aos macrófagos na proporção de 20:1 ou 10:1, juntamente com 20 ng de LPS por ml, para a obtenção de macrófagos regulatórios.

5.10 Cinética da inflamação articular

Para o desenvolvimento desta etapa foram utilizados 26 camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 com aproximadamente 8 semanas.

Os animais foram divididos em quatro grupos: Grupo T6 (animais que receberam injeção intra-articular tíbio-femoral com 10 µl de solução de cristais de MSU (100 µg/cavidade) na articulação tíbio-femoral direita e injeção do veículo (solução salina) na articulação tíbio-femoral contralateral e foram eutanasiados 6 horas após a indução), (n=6); Grupo T12 (animais que receberam injeção intra-articular tíbio-femoral com 10 µl de solução de cristais de MSU (100 µg/cavidade) na articulação tíbio-femoral direita e foram eutanasiados 12 horas após a indução), (n=7); Grupo T24 (animais que receberam injeção intra-articular tíbio-femoral com 10 µl de solução de cristais de MSU (100 µg/cavidade) na articulação tíbio-femoral direita e foram eutanasiados 24 horas após a indução), (n=7); Grupo T48 (animais que receberam injeção intra-articular tíbio-femoral com 10 µl de solução de cristais de MSU (100 µg/cavidade) na articulação tíbio-femoral direita e foram eutanasiados 48 horas após a indução), (n=6).

5.11 Cinética de liberação de citocinas pelos MΦs após a polarização

Os BMDM foram gerados conforme descrito previamente. Após a contagem em câmara de Neubauer, os macrófagos foram distribuídos em placas de 24 poços (Biofil, Brasil) para a realização dos diversos estímulos propostos para ativar essas células. Dessa forma, 1×10^6 BMDM foram mantidos sem estímulo, estimulados com 10 ng/ml de LPS, 10 ng/ml de LPS e imunocomplexos, ou 20 ng/ml de IL-4 por 4 h, 8 h, 12 h,

16 h, 24 h, 36 h e 48 h, respectivamente. Após cada período, o sobrenadante foi coletado para ensaio de ELISA, e as células aderidas foram tratadas com Trizol (TRIzol™ Reagent - Invitrogen™) para a análise por qRT-PCR, sendo então armazenadas a -20°C.

5.12 Estimulação in vitro de BMDM e desafio com cristais de MSU ou ATP

Os BMDM foram gerados conforme previamente descrito. Após a contagem na câmara de Neubauer, os macrófagos sem estímulos foram distribuídos em placas de 24 poços (Biofil, Brasil) e em tubos de poliestireno (Corning, EUA) para a realização dos diversos estímulos propostos para ativar essas células.

Para cada grupo de 1×10^6 BMDM que foram colocados nos tubos de poliestireno, eles foram mantidos sem estímulo, estimulados com 20 ng/ml de LPS, 20 ng/ml de LPS e imunocomplexos formados a partir da E-IgG, ou 20 ng/ml de IL-4 por 8 h.

Quanto aos macrófagos da placa, estes foram divididos em sete grupos por poço:

Grupo 1: 1×10^6 MΦs sem estímulos por 10 h, desafiados com 300 µg/ml de MSU por 6 h ou 5 mM de ATP (Sigma, EUA) por 30 minutos;

Grupo 2: 1×10^6 MΦs sem estímulos por 7 h, foram primados com 1 µg/ml de LPS por 1 h, e após 2 h foram desafiados com 300 µg/ml de MSU por 6 h ou 5 mM de ATP por 30 minutos;

Grupo 3: 1×10^6 MΦs sem estímulos por 7 h, foram primados com 1 µg/ml de LPS e E-IgG na proporção 10:1 por 1 h, e após 2 h foram desafiados com 300 µg/ml de MSU por 6 h ou 5 mM de ATP por 30 minutos;

Grupo 4: 5×10^5 MΦs sem estímulos por 7 h, foram primados com 1 µg/ml de LPS por 1 h, e em seguida foi retirado o sobrenadante e adicionados 5×10^5 MΦs sem estímulos que estavam nos tubos de poliestireno. Após 2 h, o total de 1×10^6 MΦs foram desafiados com 300 µg/ml de MSU por 6 h ou 5 mM de ATP por 30 minutos;

Grupo 5: 5×10^5 MΦs sem estímulos por 7 h, foram primados com 1 µg/ml de LPS por

1 h, e em seguida foi retirado o sobrenadante e adicionados 5×10^5 MΦs MReg que estavam nos tubos de poliestireno. Após 2 h, o total de 1×10^6 MΦs foram desafiados com 300 µg/ml de MSU por 6 h ou 5mM de ATP por 30 minutos;

Grupo 6: 1×10^6 MΦs sem estímulos por 7 h, foram primados com 1µg/ml de LPS por 1 h, e após 8 h, o sobrenadante foi coletado.

Grupo 7: 1×10^6 MΦs não foram estimulados e permaneceram no poço por 16 h. O sobrenadante foi trocado conforme realizado nos outros grupos, mas nenhuma substância estimulante foi adicionada e nenhum desafio com MSU ou ATP foi realizado. O sobrenadante foi coletado ao final do período de incubação.

Em todos os grupos, os sobrenadantes foram coletados após o período de desafio e armazenados a -20°C , aguardando a sua utilização para o ensaio de ELISA (Figura 6).

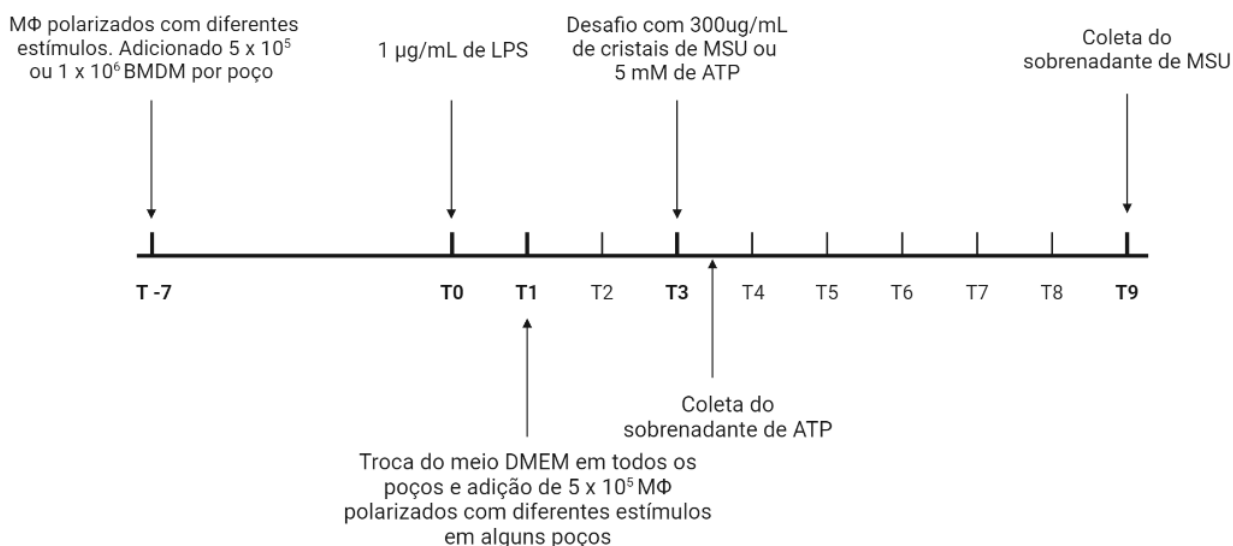


Figura 5 - Experimento in vitro com cristais de MSU e ATP

Foram gerados BMDMs e distribuídos em placas de 24 poços e tubos de poliestireno. Os macrófagos foram expostos a diferentes estímulos: LPS, LPS com imunocomplexos E-IgG, MSU e ATP. Os macrófagos das placas foram divididos em sete grupos, cada um com condições de priming e desafio distintas. Os sobrenadantes coletados após os desafios foram armazenados a -20°C para o ensaio de ELISA. Criado em: Biorender.com

5.13 Ativação do inflamassoma NLRP3 por injeção peritoneal de cristais de MSU e terapia com macrófagos com diferentes estímulos

Os BMDMs foram gerados de acordo com a descrição anterior. Após a contagem na câmara de Neubauer, os macrófagos sem estímulos foram distribuídos em tubos de poliestireno para a realização dos diversos estímulos propostos com o intuito de ativar essas células. Para cada grupo de 1×10^6 BMDM colocados nos tubos de poliestireno, eles foram mantidos sem estímulo ou estimulados com 20 ng/ml de LPS e imunocomplexos formados a partir da E-IgG por 8 h. Para a realização desta etapa, utilizamos 36 camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6, com idade aproximada de 8 semanas. Os animais foram divididos em seis grupos, contendo seis animais em cada um:

Grupo 1: Camundongos que receberam 500 μ l de salina no peritônio 6 h antes da eutanásia, servindo como controle negativo;

Grupo 2: Camundongos desafiados com 500 μ l de salina contendo 3 mg de cristais de MSU no peritônio 6 h antes da eutanásia, representando o controle positivo;

Grupo 3: Camundongos que receberam 500 μ l de solução contendo 1×10^6 M Φ s sem estímulos no peritônio 8 h antes da eutanásia;

Grupo 4: Camundongos que receberam 500 μ l de solução contendo 1×10^6 M Φ s regulatórios no peritônio 8 h antes da eutanásia;

Grupo 5: Camundongos que receberam 500 μ l de solução contendo 1×10^6 M Φ s sem estímulos no peritônio. Após 2 h, os animais foram desafiados com 3 mg de MSU em 500 μ l de salina por 6 h.

Grupo 6: Camundongos que receberam 500 μ l de solução contendo 1×10^6 M Φ s regulatórios no peritônio. Após 2 h, os animais foram desafiados com 3 mg de MSU em 500 μ l de salina por 6 h.

Após o desafio com cristais de MSU, aguardamos 6 h e procedemos à eutanásia dos animais de acordo com as normas vigentes, conforme delineado no esquema apresentado na **Figura 7**. Realizamos o lavado peritoneal em todos os animais com 5 ml de PBS gelado. Anotamos o volume coletado em cada lavado e contamos as células na câmara de Neubauer. Após esse procedimento, o lavado foi centrifugado a 300 G por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi armazenado a -20°C, aguardando sua utilização no ensaio de ELISA, e as células foram ressuspensas e

preparadas em lâminas por citocentrifugação para diferenciar os tipos celulares, utilizando os critérios morfológicos padrões.

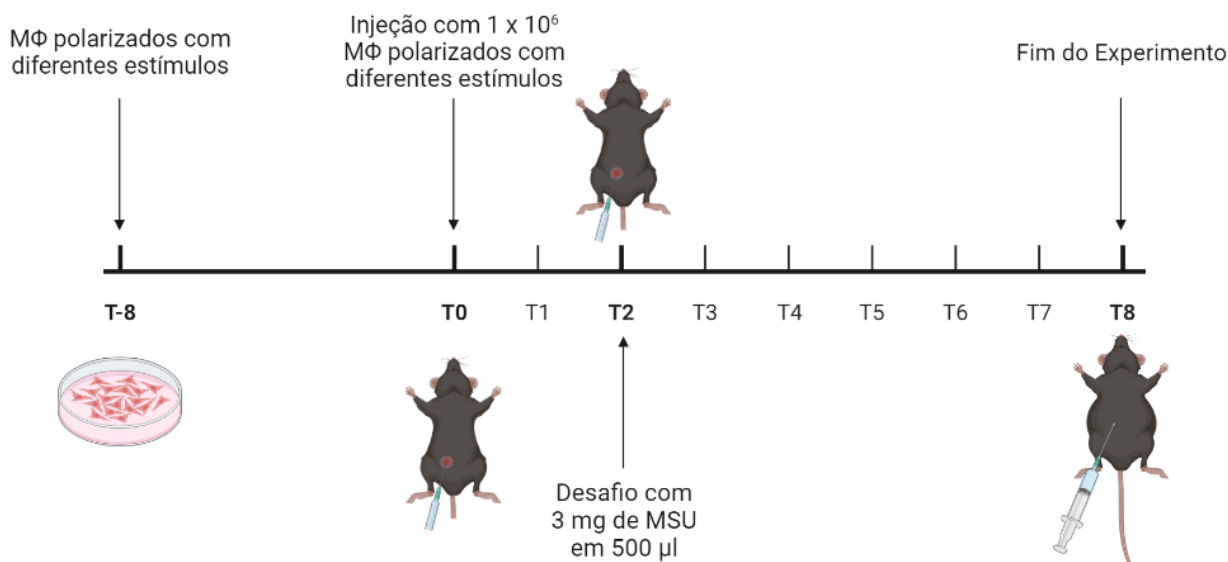


Figura 6 - Experimento Peritônio com cristais de MSU

BMDM foram gerados conforme a descrição anterior. Os macrófagos sem estímulo ou estimulados com LPS e imunocomplexos foram introduzidos nos camundongos. Utilizaram-se camundongos C57BL/6, divididos em seis grupos para diferentes tratamentos. Após o desafio com MSU, a eutanásia ocorreu 6 horas depois, seguida pela coleta do lavado peritoneal para contagem total e diferencial de células, além do armazenamento do sobrenadante para o ensaio de ELISA. Criado em: Biorender.com

5.14 Terapia com macrófagos com diferentes estímulos na artrite gotosa murina

Os BMDM foram gerados conforme descrito anteriormente. Após a contagem na câmara de Neubauer, os macrófagos não estimulados foram distribuídos em tubos de poliestireno. Cada grupo de 1×10^6 BMDM nos tubos de poliestireno foi mantido sem estímulo ou estimulado com 20 ng/ml de LPS e imunocomplexos formados a partir da E-IgG por 8 h.

Para o desenvolvimento desta etapa, foram empregados 24 camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6, com uma idade aproximada de 8 semanas.

Após a conclusão do primeiro experimento com cristais de MSU na articulação, no qual observamos uma média de $1,4 \times 10^4$ macrófagos residentes no lavado articular de camundongos ($n=6$) que não receberam a administração dos cristais de MSU,

decidimos aumentar o número de macrófagos produzidos *in vitro* para o tratamento. Para isso, anestesiámos os animais e, em seguida, administramos uma injeção intra-articular tíbio-femoral contendo 10 µl (3×10^4 MΦs/cavidade) de uma solução contendo macrófagos não estimulados e macrófagos regulatórios. Isso foi feito 2 h antes do desafio intra-articular, utilizando uma solução contendo 10 µl de cristais de MSU (100 µg/cavidade).

Os animais foram distribuídos em quatro grupos distintos:

Grupo 1: Composto por animais que receberam solução salina (10 µl/cavidade) na articulação tíbio-femoral direita e esquerda (n=6).

Grupo 2: Composto por animais que receberam 10 µl de cristais de MSU (100 µg/cavidade) na articulação tíbio-femoral direita e esquerda (n=6).

Grupo 3: Compreendendo os animais que receberam 10 µl de macrófagos sem estímulo (3×10^4 MΦs/cavidade) 2 h antes do desafio com cristais de MSU na articulação tíbio-femoral direita e esquerda (n=6).

Grupo 4: Compreendendo os animais que receberam 10 µl de macrófagos regulatórios (3×10^4 MΦs/cavidade) 2 h antes do desafio com cristais de MSU na articulação tíbio-femoral direita e esquerda (n=6).

Após 12 horas do desafio, realizou-se o procedimento de eutanásia. Em seguida, procedeu-se o lavado da articulação tíbio-femoral direita para contagem global e diferencial. Além disso, o tecido periarticular da articulação tíbio-femoral direita foi retirado para análises de citocinas por ELISA. A articulação tíbio-femoral esquerda foi separada para análise histológica.

5.15 Eutanásia

Os animais foram eutanasiados por sobredose de anestésico (240 mg/Kg de Cetamina e 45 mg/Kg de xilazina) seguido de deslocamento cervical, nos tempos necessários para análise. Ao final dos experimentos, as carcaças dos animais foram acondicionadas em sacos plásticos brancos com simbologia infectante, destinadas ao armazenamento intermediário em freezer, recolhida pela equipe de limpeza do ICB e sua destinação foi feita de acordo com o regimento vigente no ICB.

5.16 Contagem total dos leucócitos

Alíquotas de 10 µL do lavado articular e do lavado peritoneal foram diluídas em 10 µL de solução Turck (Newprov), sendo a contagem total dos leucócitos realizada em câmara de Neubauer, com o auxílio de microscópio óptico (objetiva de 40x) e contador manual. Os resultados foram expressos como número de células coletadas da cavidade articular ou peritoneal. O número total de leucócitos foi utilizado para cálculo da porcentagem dos diferentes leucócitos encontrados no lavado articular ou peritoneal a partir da contagem/discriminação por análise morfológica das células nas lâminas preparadas por citocentrifugação utilizando o microscópio óptico.

5.17 Contagem diferencial dos leucócitos

As lâminas para contagem diferencial foram preparadas por citocentrifugação de uma alíquota de 90 µL do lavado articular contendo todas as células que estavam no lavado e 100 µL do lavado peritoneal contendo 5×10^5 de células (citospin; Shandon Lipshaw Inc., Pittsburgh, Pennsylvania, USA). As lâminas foram coradas utilizando o Kit panótico rápido (Laborclin, Paraná) e examinadas sob microscópio óptico, objetiva de imersão em óleo (objetiva de 100x), utilizando os critérios morfológicos padrões para diferenciar os tipos celulares. Foi feita uma análise da porcentagem de células polimorfonucleares e mononucleares de cada amostra e os resultados foram expressos como número relativo de cada população baseando-se na contagem total de leucócitos.

5.18 Processamento do tecido periarticular para dosagem de citocinas

O tecido periarticular removido foi pesado e processado com o homogeneizador de tecidos (Power Gen 125 - Fisher Scientific Pennsylvania, EUA) com solução de extração de citocinas (NaCl 0,4M, 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 2 ml por 100 mg de tecido. Após homogeneização e centrifugação (15.000 rpm 15 minutos a 4 °C), o sobrenadante foi coletado e estocado a -20°C para quantificação de citocinas por ELISA.

5.19 PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)

Macrófagos murinos receberam diferentes estímulos por 4 horas e o mRNA para qRT-PCR foi extraído usando Trizol (TRIzol™ Reagent - Invitrogen™). O cDNA foi sintetizado usando o High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor (Applied Biosystems™). A quantificação relativa de RNA foi feita usando PCR em tempo real baseado em SYBR-Green (Power SYBR™ Green PCR Master Mix - Applied Biosystems™). As amostras foram processadas no QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System. As diferenças relativas foram calculadas usando o método $\Delta\Delta C_t$ com macrófagos sem estímulo como controle. As sequências dos primers utilizados nesse trabalho estão descritas no Quadro 1.

Quadro 1 - Sequência dos primers.

Gene	Forward	Reverse
GAPDH	5'– ACA GCA ACT CCC ACT CTT – 3'	5' – CTG TTG CTG TAG CCG TAT TC – 3'
iNOS	5' – CTC CCT TCC GAA GTT TCT GG – 3'	5' – CAA ACA CCA AGC TCA TGC G – 3'
IL-10	5'– TGG GTG AGA AGC TGA AGA – 3'	5' – TCC ACT GCC TTG CTC TTA – 3'
Arginase I	5' – GAA TGG AAG AGT CAG TGT GG – 3'	5' – CCA CCC AAA TGA CAC ATA GG – 3'
FIZZ-1	5' – CGT GGA GAA TAA GGT CAA GG – 3'	5' – GAC ACT AGT GCA AGA GAG AG – 3'
YM-1	5' – AGC CCT CCT AAG GAC AAA – 3'	5'– GCA GCC TTG GAA TGT CTT – 3'
IL-12	5' – GCA CGG CAG CAG AAT AAA – 3'	5' – CCT GTG AGT TCT TCA AAG GC – 3'

5.20 Dosagem de citocinas por ELISA

A dosagem de citocinas do tecido periarticular, do lavado peritoneal e do sobrenadante da cultura de BMDMs foi realizada através do ensaio imunoenzimático (ELISA). Para a análise das citocinas do tecido periarticular, o sobrenadante obtido após o processamento do tecido foi utilizado para o ensaio. Para a análise das citocinas do lavado peritoneal, lavou-se o peritônio dos camundongos com 5 ml de PBS gelado e, posteriormente, esse lavado foi centrifugado a 300 G por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e armazenado a -20°C até sua utilização no ensaio. Para o experimento in vitro com os BMDMs, o sobrenadante foi coletado após 16 horas e armazenado a -20°C até sua utilização no ensaio. Os kits para ELISA de

camundongo para IL-1 β , IL-10, IL-12, TNF e CXCL1 foram utilizados de acordo com os procedimentos sugeridos pelos fabricantes (R&D Systems e BD Biosciences).

5.21 Análises estatísticas

Os dados foram avaliados quanto à distribuição das variáveis utilizando os algoritmos disponíveis no software GraphPad Prism 8.0.2. Os dados que passarem no teste de normalidade foram analisados pelo teste T de Student ou pelo One Way ANOVA seguido pelo pós- teste de Tukey e expressos em média \pm desvio padrão. Os dados que não passarem no teste de normalidade foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn e expressos pela mediana, valor máximo e valor mínimo. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 Reprogramação de macrófagos *in vitro*

Como já descrito na literatura, as populações de macrófagos podem mudar seu fenótipo durante a progressão de uma doença, sendo capazes de contribuir para a progressão ou resolução da mesma (MOSSER; EDWARDS, 2008; CHANDRASEKARAN et al., 2019; DALBY et al., 2020; MOSSER; HAMIDZADEH; GONCALVES, 2020; LOPES et al., 2021). Desta forma, diferentes estímulos foram utilizados para verificar a mudança de fenótipo dos macrófagos (**Figura 7**). Por exemplo, o fenótipo M1 é caracterizado pela liberação de grandes quantidades de IL-12 e poucas quantidades de IL-10. Em contraste, o fenótipo Mreg é representado pelos estímulos que aumentam significativamente a produção de IL-10 e reduzem a de IL-12, sendo conhecido por sua capacidade de regular a resposta imune. Macrófagos sem estímulos foram usados como grupo controle, e macrófagos M2 (alternativamente ativados) foram utilizados para demonstrar que apresentam um estado de ativação diferente dos chamados Mreg.

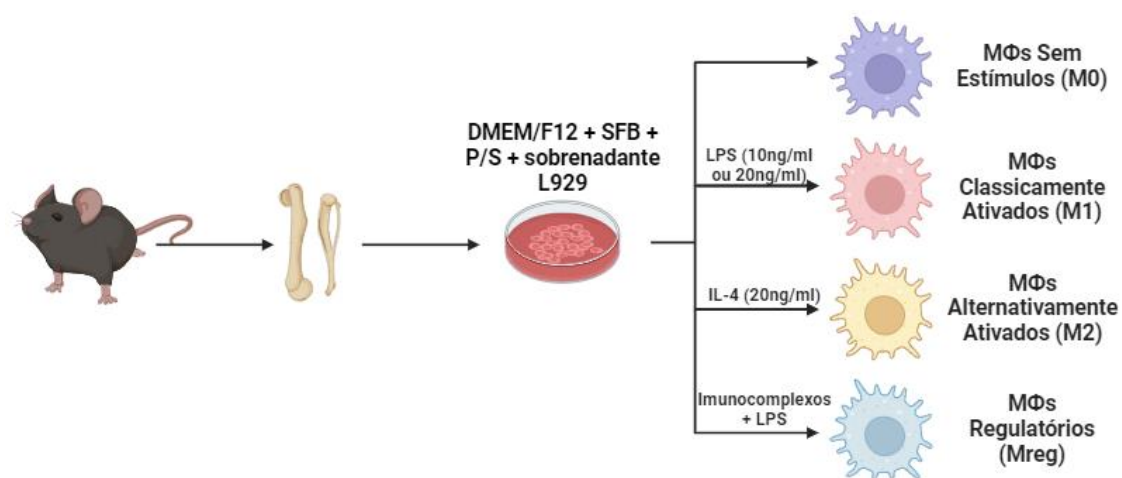


Figura 7 - Isolamento e estímulo de macrófagos da medula óssea.

Macrófagos derivados da medula óssea de camundongos foram isolados conforme descrito anteriormente por Gonçalves et al (2023). Em seguida, esses macrófagos foram estimulados para ativação em diferentes perfis. Aos macrófagos sem estímulos, não foi adicionado nada. Para os macrófagos classicamente ativados (M1), foi adicionado LPS na concentração de 10 ng/ml ou 20 ng/ml. Já os macrófagos alternativamente ativados (M2) foram obtidos adicionando IL-4 na concentração de 20ng/ml. Para a ativação dos macrófagos em um perfil regulatório, utilizou-se diversos imunocomplexos e LPS (10 ng/mL ou 20 ng/ml). LPS: lipopolissacarídeo; MΦs: macrófagos; Criado em: Biorender.com

Para evitar equívocos, agrupou-se os macrófagos estimulados com diferentes sinais de reprogramação mais LPS (10-20 ng/ml) sob a designação Mreg. Implementou-se a atribuição de nomes específicos a cada subtipo de macrófago com base nos estímulos usados, a fim de evitar mal-entendidos (**QUADRO 2**).

Quadro 2 - Classificação de subtipos de macrófagos com base nos estímulos utilizados.

Mreg	Estímulo
M(e-IgG)	Hemácias de Ovelha e Anti-Hemácias de Ovelha
M(<i>beads</i> -IgG)	<i>Beads</i> de Poliestireno e IgG de Coelho da Rheabiotech
M(<i>beads</i> -IgGA)	<i>Beads</i> de poliestireno e IgG de coelho purificado a partir de soro normal total por cromatografia de afinidade à proteína A
M(<i>beads</i> -IgGP)	<i>Beads</i> de poliestireno e IgG de coelho purificado a partir de soro normal total pela precipitação por sulfato de amônio
M(ADO)	Adenosina
M(PGE2)	Prostaglandina
M(IgG-IgG)	IgG de coelho Rheabiotech e anti-IgG de coelho
M(<i>beads</i> -IgG-IgG)	<i>Beads</i> de poliestireno, IgG de coelho da Rheabiotech e anti-IgG de coelho

Para comprovar a polarização dos macrófagos em diferentes perfis e determinar a concentração ideal de anticorpo IgG de coelho para a polarização dos macrófagos regulatórios, macrófagos murinos foram submetidos a diferentes estímulos durante 4 horas. Para os macrófagos M0, nenhum estímulo foi adicionado. Os macrófagos M1 receberam LPS (10 ng/ml) como estímulo, enquanto os macrófagos M2 foram estimulados com IL-4 (20 ng/ml). Para polarizar os macrófagos Mreg, utilizamos 50 µL da ligação entre as *Beads* de poliestireno adsorvidas com anticorpo IgG de coelho (em diferentes concentrações), em combinação com 1 µL de LPS (10 ng/ml). Em seguida, o mRNA foi isolado e quantificado por meio de qRT-PCR (**Figura 8A**). Para corroborar os dados obtidos com a qRT-PCR, foi realizada a dosagem da citocina IL-10 no sobrenadante da cultura de macrófagos 16 horas após a polarização (**Figura 8B**). A polarização dos macrófagos regulatórios foi conduzida

em diferentes concentrações de anticorpos IgG de coelho, com o objetivo de identificar a concentração ideal para induzir a máxima produção de IL-10. Em seguida, as duas concentrações que apresentaram a melhor resposta aos estímulos foram selecionadas e comparadas quanto a expressam de mRNA dos macrófagos estimulados para os perfis M0, M1 e M2 (**Figura 9**).

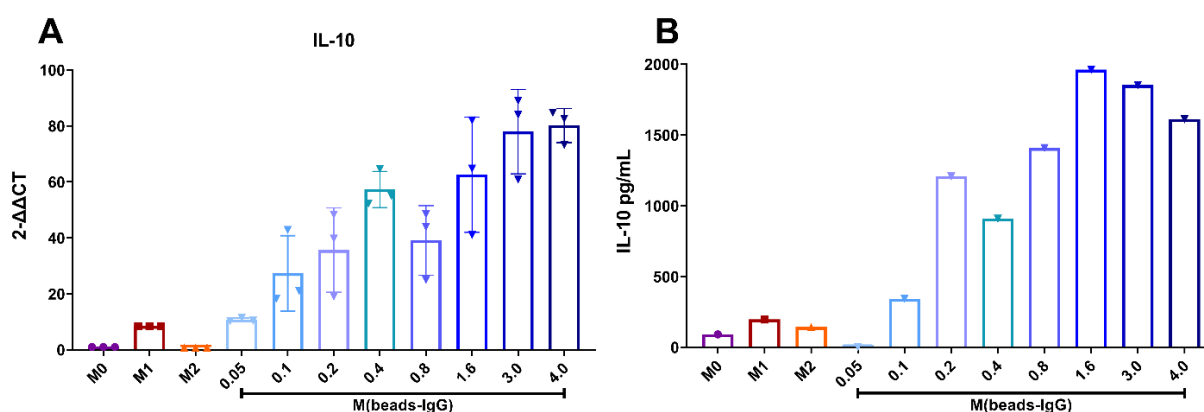


Figura 8 - O aumento da concentração de anticorpos IgG de coelho desencadeia maior liberação de IL-10.

BMDM (1×10^6 células/poço) foram submetidos a diferentes estímulos por 4 horas, seguido pelo isolamento e quantificação do mRNA usando qRT-PCR. Além disso, a dosagem da citocina IL-10 no sobrenadante da cultura de macrófagos foi realizada 16 horas após a polarização por ELISA. M0: macrófagos sem estímulo; M1: macrófagos classicamente ativados; M2: macrófagos alternativamente ativados; M(beads-IgG): macrófagos regulatórios com diferentes concentrações de anticorpos IgG de coelho da Rheabiotech. Os resultados são representativos de um experimento N=3 para a PCR e N=1 para ELISA.

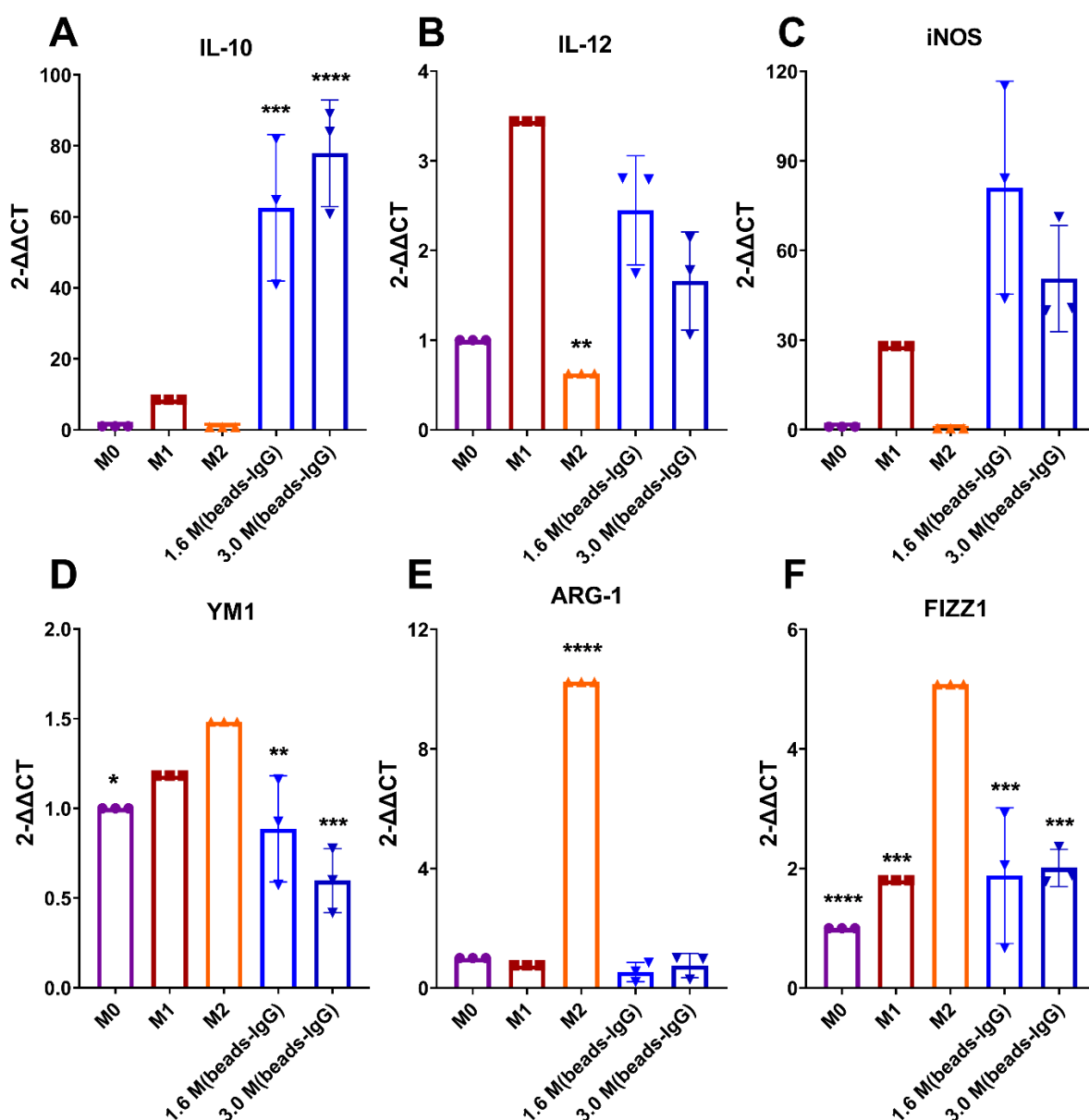


Figura 9 - Quantificação relativa de mRNA por qRT-PCR.

BMDM (1×10^6 células/poço) foram polarizados em diferentes perfis e após 4h foi mensurada a expressão gênica de IL-10 (A), IL-12 (B), iNOS (C), YM1 (D), Arginase-1 (E) e FIZZ1 (F) por PCR em tempo real. Os resultados são representativos de um experimento N=3. (A) Os dados foram avaliados pelo teste One-way ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey, e são expressos em média \pm desvio padrão. Diferenças significativas em relação aos grupos M0, M1 e M2 são representadas pelos asteriscos "****" quando $p < 0,001$ e pelos asteriscos "****" quando $p < 0,0001$. (B) Os dados foram avaliados pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn. Os resultados representam a mediana, valor máximo e valor mínimo. Diferenças significativas em relação ao grupo M1 são representadas pelos asteriscos "***" quando $p < 0,01$. (C) Os dados foram avaliados pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn. Os resultados representam a mediana, valor máximo e valor

mínimo. (D) Os dados foram avaliados pelo teste One-way ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey, e são expressos em média \pm desvio padrão. Diferenças significativas em relação ao grupo M2 são representadas pelos asteriscos “**” quando $p < 0,05$, “***” quando $p < 0,01$ e “****” quando $p < 0,001$. (E) Os dados foram avaliados pelo teste One-way ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey, e são expressos em média \pm desvio padrão. Diferenças significativas em relação aos grupos M0, M1, 1.6 M(beads-IgG) e 3.0 M(beads-IgG) são representadas pelos asteriscos “****” quando $p < 0,0001$. (F) Os dados foram avaliados pelo teste One-way ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey, e são expressos em média \pm desvio padrão. Diferenças significativas em relação ao grupo M0 são representadas pelos asteriscos “****” quando $p < 0,0001$. E aos grupos M1, 1.6 M(beads-IgG) e 3.0 M(beads-IgG) são representadas pelos asteriscos “***” quando $p < 0,001$. MO: macrófagos sem estímulo; M1: macrófagos classicamente ativados; M2: macrófagos alternativamente ativados; M(beads-IgG): macrófagos regulatórios com diferentes concentrações de anticorpos IgG de coelho da Rheabiotech.

Dado que o modelo murino de artrite gotosa aguda se desenvolve rapidamente em questão de horas, tornou-se crucial compreender a cinética de expressão de mRNA em macrófagos polarizados em diferentes perfis, bem como a cinética de liberação de citocinas (**Figura 10**). Usando qRT-PCR, foi detectada a expressão de mRNA em macrófagos polarizados após apenas 4 horas. Além disso, por meio de ELISA, foi observado um aumento nas citocinas no sobrenadante das células após 8 horas. Esses achados foram fundamentais para determinar a análise por PCR em 4 horas e para desenvolver os experimentos, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, utilizando macrófagos com 8 horas de polarização. Dessa forma, foi possível garantir que essas células já estivessem liberando grandes quantidades de citocinas, permitindo-nos observar a atuação dessas células no tecido dos animais.

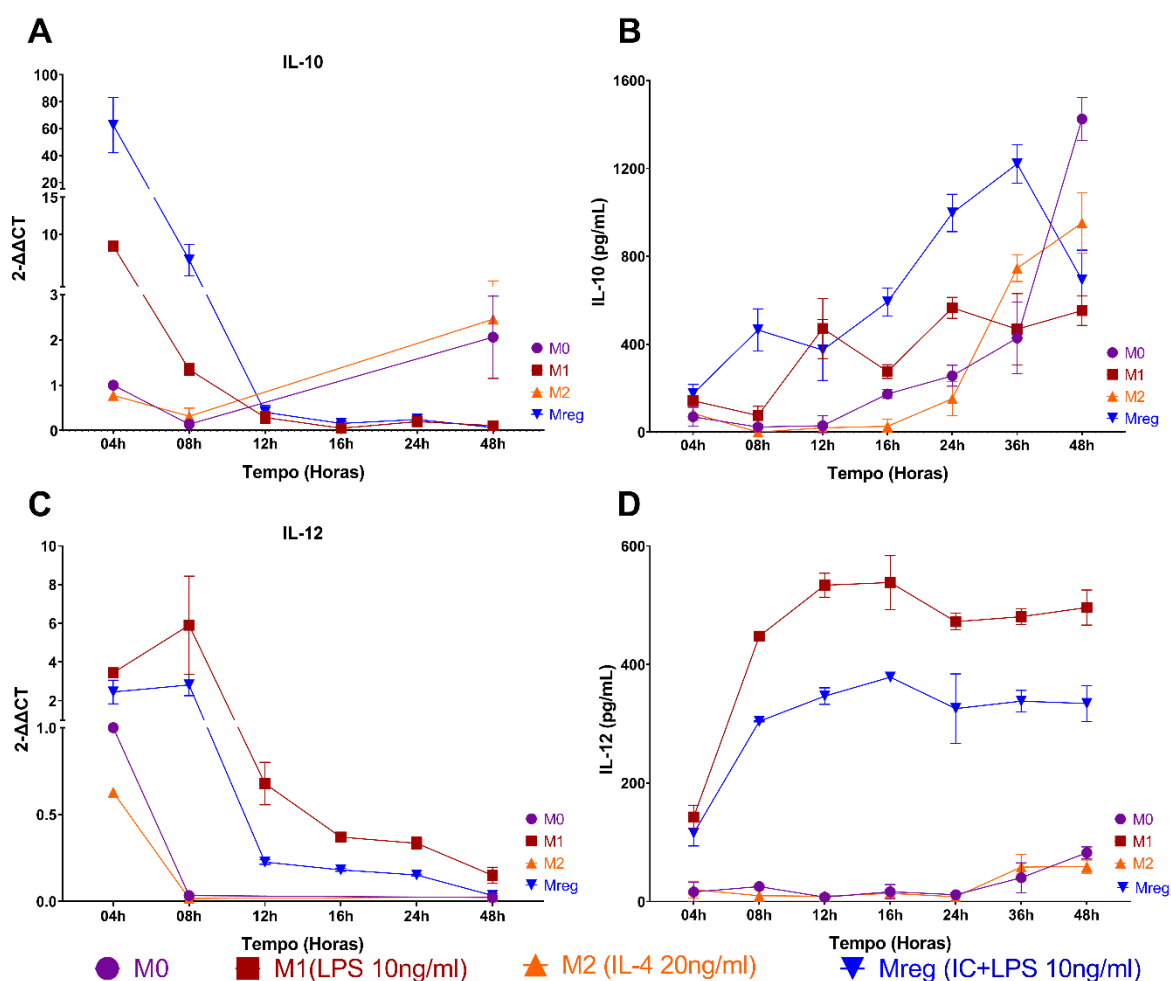


Figura 10 - Cinética da expressão de mRNA e da liberação de citocinas por macrófagos ativados em diferentes perfis.

BMDM (1×10^6 células/poço) foram polarizados em diferentes perfis, e a expressão de mRNA de IL-10 (A) e IL-12 (C) foi mensurada ao longo do tempo. A dosagem das citocinas IL-10 (B) e IL-12 (D) no sobrenadante da cultura de macrófagos polarizados foi realizada por meio de ELISA em intervalos regulares após a polarização, para avaliar a cinética. Os resultados são representativos de um experimento N=3. MO: macrófagos sem estímulo; M1: macrófagos classicamente ativados; M2: macrófagos alternativamente ativados; Mreg: Macrófagos regulatórios polarizados com LPS (10ng/ml) e o imunocomplexo formado a partir de IgG de coelho da Rheabiotech (1,6 mg/ml) e Beads de poliestireno.

De acordo com Mosser e Edwards (2008), os macrófagos regulatórios são gerados em resposta a diversos estímulos, que podem incluir imunocomplexos, prostaglandinas, adenosina, ligantes do receptor acoplado à proteína G (GPCR), glicocorticoides, células apoptóticas e IL-10 (MOSSER; EDWARDS, 2008).

Após determinar que as concentrações de anticorpo IgG de coelho de 1,6 mg/ml e 3,0 mg/ml foram as mais eficazes na formação do imunocomplexo com as *beads* de poliestireno e na subsequente liberação de citocinas anti-inflamatórias e redução de citocinas inflamatórias, foram realizados testes com outros tipos de imunocomplexos nestas concentrações de IgG de coelho, bem como com adenosina e prostaglandina (**QUADRO 2**). O objetivo era determinar qual estímulo seria mais eficaz em reduzir os níveis de mediadores inflamatórios e aumentar os níveis de citocinas anti-inflamatórias.

Foram selecionados os três melhores estímulos capazes de diminuir os níveis de IL-12 e aumentar os níveis de IL-10 (**Figura 11**). Nestes casos, os estímulos selecionados foram: M(IgG-IgG), M(*beads*-IgG-IgG) e M(*beads*-IgGA) na concentração de 3,0 mg/ml de IgG de coelho. Pode-se observar que essas três classes de macrófagos apresentaram uma relação IL-10/IL-12 perto de 1,5. Isso significa que a quantidade de IL-10 é 1,5 vezes maior do que a quantidade de IL-12 neste contexto. Enquanto o M1 ficou abaixo de 0,5, demonstrando que a quantidade de IL-10 é 0,5 vezes menor do que a quantidade de IL-12 no ambiente ou contexto em que os macrófagos M1 estão presentes. O fenótipo Mreg está associado a uma maior produção de IL-10 em relação à IL-12, enquanto o fenótipo M1 mostra o oposto, com uma maior produção de IL-12 em relação à IL-10.

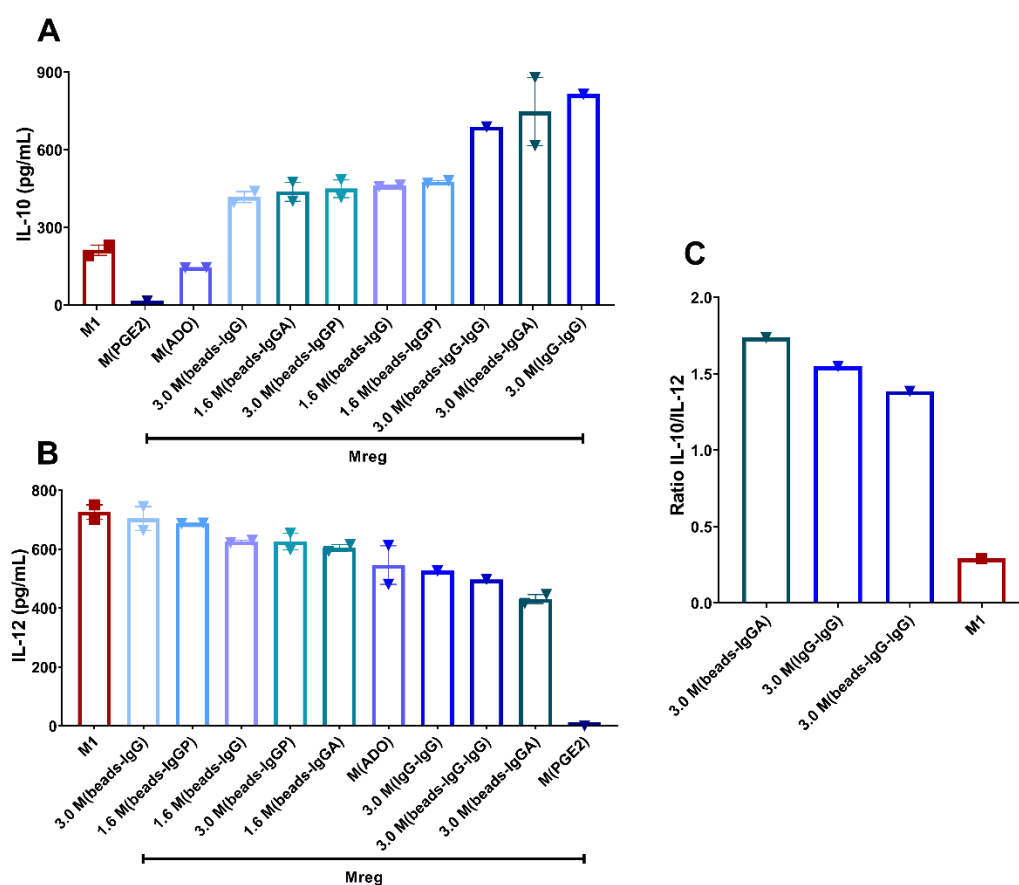


Figura 11 - M(IgG-IgG), M(beads-IgG-IgG) e M(beads-IgGA) na concentração de 3,0 mg/ml de IgG de coelho diminuem os níveis de IL-12 e aumentam os níveis de IL-10.

(A)(B) A dosagem das citocinas no sobrenadante da cultura de macrófagos (1×10^6 células/poço) polarizados foi realizada por meio de ELISA 16 horas após a polarização. Para a análise das citocinas no sobrenadante da cultura de macrófagos, macrófagos murinos receberam diferentes estímulos por 16 horas, transcorrido esse tempo o sobrenadante foi coletado, armazenado a -20°C até sua utilização no ensaio. O kit para ELISA de camundongo para IL-10 foi utilizado de acordo com os procedimentos sugeridos pelo fabricante. M1: macrófagos classicamente ativados; Mreg: macrófagos regulatórios com diferentes estímulos. Os resultados são representativos de um experimento $N=2$. (C) Razão IL-10/IL-12 dos três melhores estímulos capazes de diminuir os níveis de IL-12 e aumentar os níveis de IL-10.

Na tentativa de melhorar ainda mais a resposta dos macrófagos regulatórios na relação IL-10/IL-12, foram realizados testes adicionais com um novo imunocomplexo composto por hemácias de ovelha e anticorpos anti-hemácias de ovelha (GALLO; GONÇALVES; MOSSER, 2010). Esse imunocomplexo foi comparado com M(beads-IgG-IgG), bem como com macrófagos não polarizados (M0), macrófagos M2(IL-4 – 20 ng/ml) e M1(LPS – 20 ng/ml). Observou-se que o imunocomplexo com hemácias de ovelha não produziu IL-12 detectável e produziu maior quantidade de IL-10 em

comparação com os outros grupos. Verificou-se ainda, uma liberação significativamente menor de TNF- α pelos macrófagos regulatórios, quando comparados aos estímulos com beads ou com M1 (**Figura 12**). Portanto, decidiu-se analisar a expressão de mRNA associada a essa polarização e percebeu-se que também expressava mais IL-10 do que IL-12. Em comparação com os macrófagos do grupo M2, que expressam FIZZ1, ARG-1 e YM1, os resultados mostram que as células do grupo Mreg são completamente distintas (**Figura 13**). Como resultado, os experimentos subsequentes foram realizados com M(e-IgG).

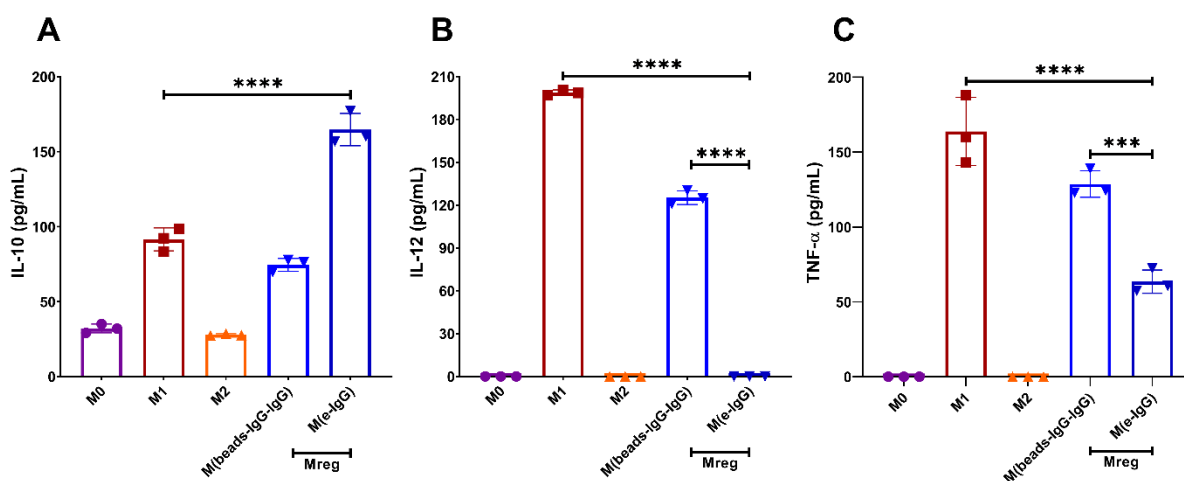


Figura 12 - Imunocomplexos com hemácias de ovelha aumentaram a liberação de IL-10 e não produziram IL-12.

(A)(B)(C) A dosagem das citocinas no sobrenadante da cultura de macrófagos (1×10^6 células/poço) polarizados foi realizada por meio de ELISA 16 horas após a polarização. Para a análise das citocinas no sobrenadante da cultura de macrófagos, macrófagos murinos receberam diferentes estímulos por 16 horas, transcorrido esse tempo o sobrenadante foi coletado, armazenado a -20°C até sua utilização no ensaio. O kit para ELISA de camundongo foi utilizado de acordo com os procedimentos sugeridos pelo fabricante. Resultados revelam que o imunocomplexo com hemácias de ovelha induz maior liberação de IL-10 em macrófagos e diminui consideravelmente a liberação de IL-12, indicando a polarização do tipo Mreg. Os dados foram avaliados pelo teste One-way ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey, e são expressos em média \pm desvio padrão. Diferenças significativas são representadas pelos asteriscos “****” quando $p < 0,001$ e “*****” quando $p < 0,0001$. Os resultados são representativos de um experimento $N=3$. Os eritrócitos foram incorporados aos macrófagos na proporção de 10:1, juntamente com 10 ng de LPS por ml, para a obtenção de macrófagos M(e-IgG). Uma parte de anticorpo Anti-IgG de coelho foi adicionada a 30 partes de IgG de coelho, com 10 μl de beads de poliestireno, para a obtenção de macrófagos M(Beads-IgG-IgG). M0: macrófagos sem estímulos; M1: macrófagos classicamente ativados; M2: macrófagos alternativamente ativados; Mreg: macrófagos regulatórios com diferentes estímulos.

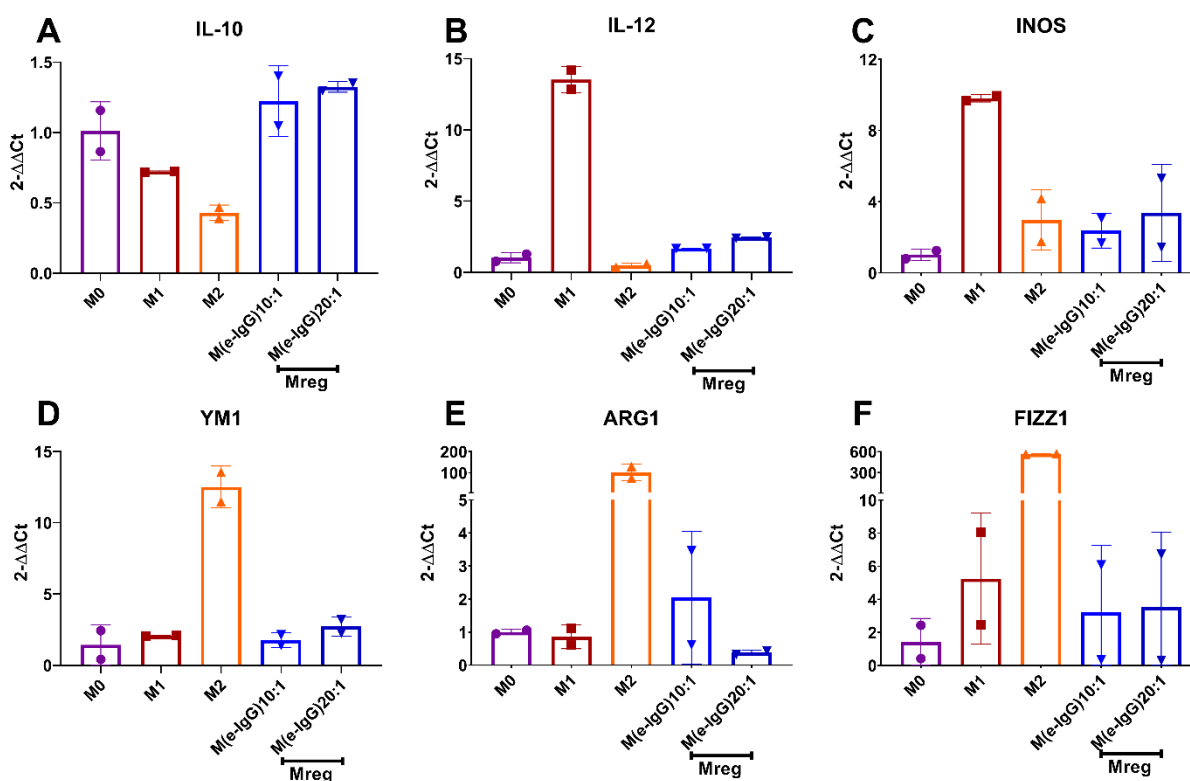


Figura 13 - Quantificação relativa de mRNA dos M(e-IgG) por qRT-PCR.

BMDM (1×10^6 células/poço) foram polarizados em diferentes perfis e após 4h foi mensurada a expressão de IL-10 (A), IL-12 (B), iNOS (C), YM1 (D), Arginase-1 (E) e FIZZ1 (F) por PCR em tempo real. Os resultados são representativos de um experimento N=2. Os eritrócitos foram incorporados aos macrófagos na proporção de 10:1 e 20:1, juntamente com 20 ng de LPS por ml, para a obtenção de macrófagos M(e-IgG).

6.2 Macrófagos Mreg reduzem a produção de IL-1 β *in vitro*

Após a seleção do imunocomplexo ideal, realizou-se experimentos *in vitro* para determinar o impacto na liberação da citocina IL-1 β por macrófagos.

O primeiro passo consistiu em verificar se a polarização dos macrófagos havia ocorrido. Para isso, realizou-se o ELISA no sobrenadante coletado 16 horas após a polarização das células que foram co-cultivadas com os BMDM que foram desafiados com cristais de MSU e ATP (**Figura 14**).

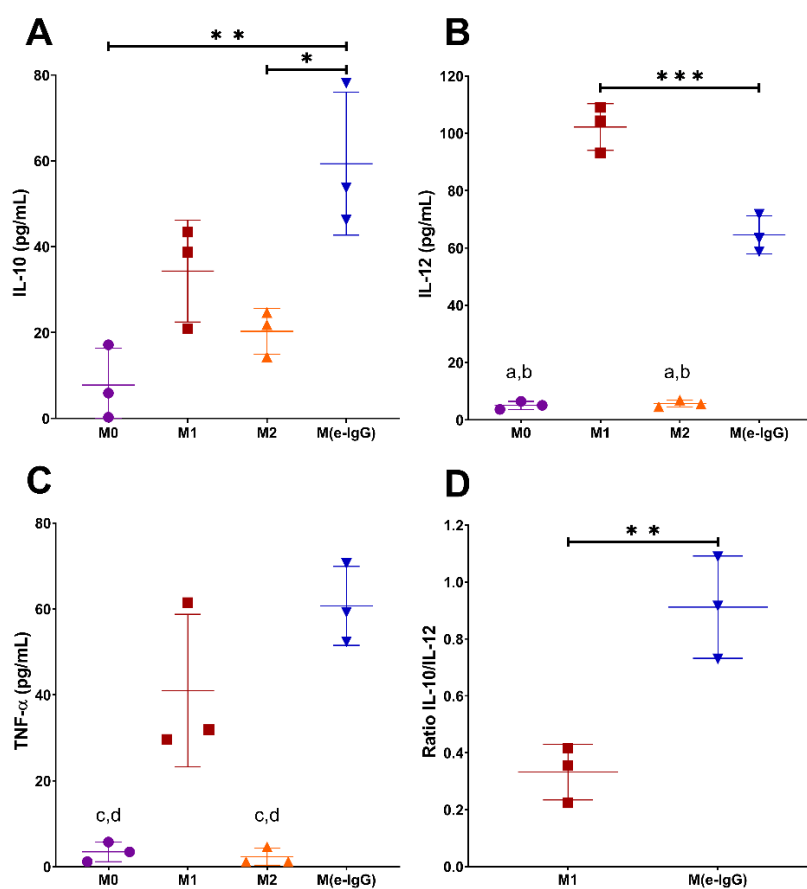


Figura 14 – Avaliação da Polarização dos Macrófagos por ELISA.

BMDM (1×10^6 células/poço) foram polarizados em diferentes perfis e após 16 h mensurado a liberação de IL-10 (A), IL-12 (B) e TNF- α (C) por ELISA. (A) Os dados foram avaliados pelo teste One-way ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey, e são expressos em média \pm desvio padrão. Diferenças significativas entre o grupo M(e-IgG) são representadas pelos asteriscos “**” quando $p < 0,05$ e pelo asterisco “***” quando $p < 0,01$. (B) Os dados foram avaliados pelo teste One-way ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey, e são expressos em média \pm desvio padrão. Diferenças significativas entre o grupo M1 são representadas pelos asteriscos “****” quando $p < 0,001$ e pela letra “a” quando $p < 0,0001$. Diferenças significativas entre o grupo M(e-IgG) são representados pela letra “b” quando $p < 0,0001$. (C) Os dados foram avaliados pelo teste One-way ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey, e são expressos em média \pm desvio padrão. Diferenças significativas entre o grupo M1 são representadas pela letra “a” quando $p < 0,01$. Diferenças significativas entre o grupo M(e-IgG) são representados pela letra “b” quando $p < 0,001$. (D) Razão IL-10/IL-12 entre os grupos M1 e M(e-IgG). Os dados foram avaliados pelo Teste T e são expressos em média \pm desvio padrão. Diferenças significativas entre o grupo M(e-IgG) são representadas pelos asteriscos “***” quando $p < 0,01$. Os resultados são representativos de três experimentos independentes $N=1$. M0: macrófagos sem estímulos; M1: macrófagos classicamente ativados; M2: macrófagos alternativamente ativados; M(e-IgG): macrófagos regulatórios.

Realizou-se dois experimentos *in vitro* simultaneamente. No primeiro, foi realizado o estímulo dos BMDMs com LPS, ao mesmo tempo em que foi adicionado o imunocomplexo E-IgG. Após uma hora de incubação, realizou-se a troca do sobrenadante e, duas horas depois, ocorreu o desafio dos macrófagos com cristais de MSU ou ATP (**Figura 15**). Observa-se que não houve uma diferença significativa na liberação de IL-1 β entre o grupo controle positivo e o grupo tratado com o imunocomplexo (**Figura 16**).

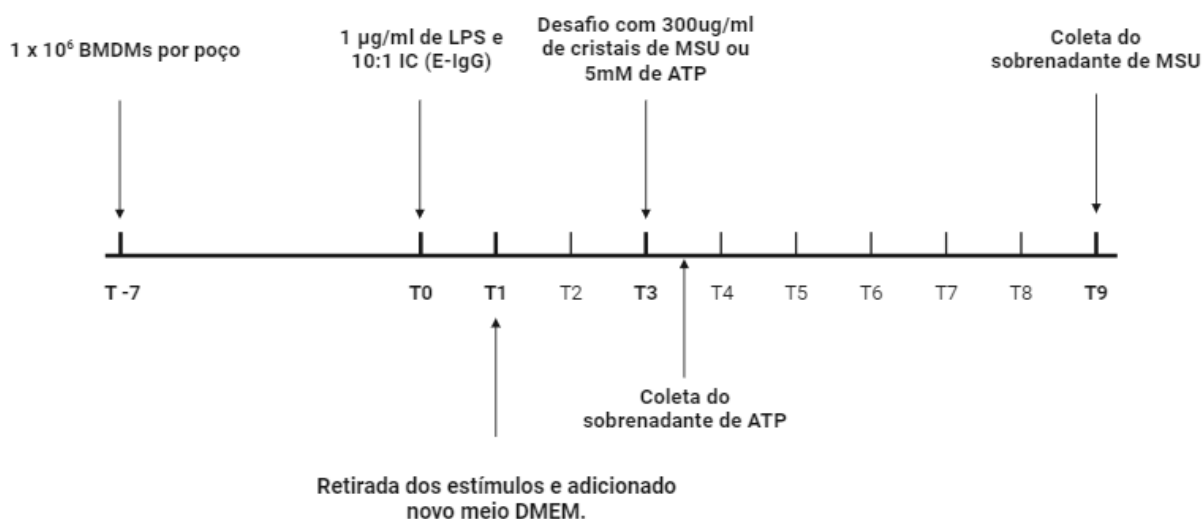


Figura 15 – Primeira estratégia experimental.

Os BMDMs (1x10⁶ células/poço) foram não estimulados, estimulados com LPS (20 ng/ml) ou LPS (20 ng/ml) mais imunocomplexo E-IgG (10:1). Após uma hora de incubação, o sobrenadante foi trocado e, duas horas depois, os macrófagos foram desafiados ou não com cristais de MSU ou ATP. O sobrenadante foi coletado e realizada a dosagem de citocinas por ELISA. BMDM: Macrófagos derivados da medula óssea; LPS: Lipopolissacarídeo; MSU: Urato Monossódico; IC: Imunocomplexo; ATP: Adenosina Trifosfato.

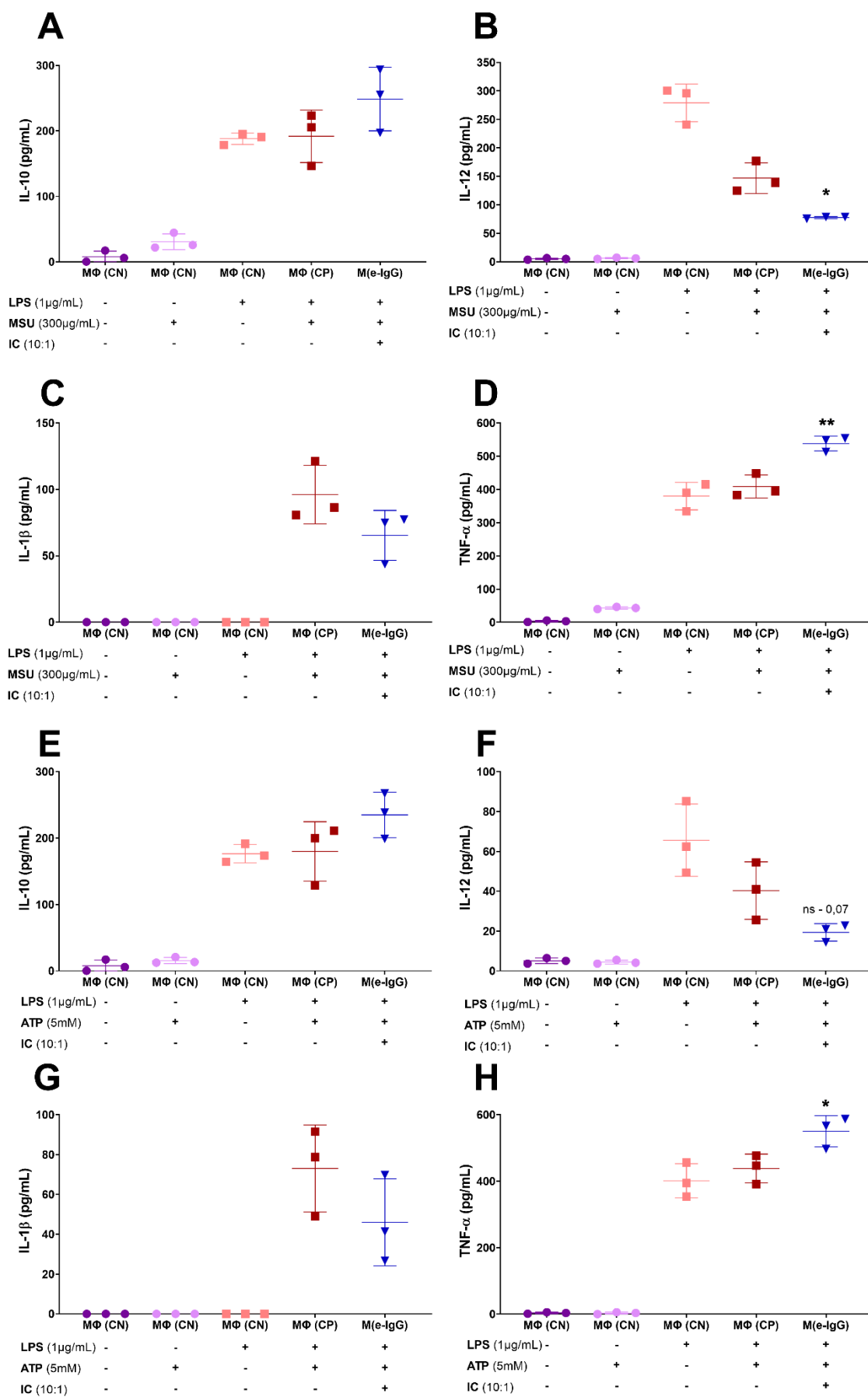


Figura 16 – O coestímulo de IC com LPS aumentou a liberação de IL-10 e diminuiu a liberação de IL-12 quando comparado ao controle positivo.

BMDM (1×10^6 células/poço) foram cultivados em placas de 24 poços. As células foram pré-estimuladas com LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) ou LPS e imunocomplexo (E-IgG) na proporção 10:1 por 1 h. Após a incubação, realizou-se a troca do sobrenadante e, 2 h depois, ocorreu o desafio dos macrófagos com cristais de MSU (300 $\mu\text{g/ml}$) por 6 h ou ATP (5mM) por 30 minutos. Transcorrido o tempo, o sobrenadante foi coletado e foi mensurado a liberação de IL-10 (A)(E), IL-12 (B)(F), IL-1 β (C)(G) e TNF (D)(H) por ELISA. Os dados foram avaliados pelo teste One-way ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey, e são expressos em média \pm desvio padrão. Diferenças significativas entre o grupo Controle Positivo (M Φ – CP) são representadas pelo asterisco “*” quando $p < 0,05$ e pelos asteriscos “***” quando o $p < 0,01$. Os resultados são representativos de três experimentos independentes $N=1$. M Φ : macrófagos; CN: Controle Negativo; CP: Controle Positivo; M(e-IgG): macrófagos regulatórios; LPS: Lipopolissacarídeo; MSU: Urato Monossódico; IC: Imunocomplexo; ATP: Adenosina Trifosfato; ns: não significativo.

Dado que o resultado anterior estava vinculado a três experimentos independentes, optou-se por conduzir um experimento adicional para verificar se a variação nos níveis de IL-1 β se devia ao fato de que a estimulação do IC em conjunto com o LPS não levou a polarização dos macrófagos para o perfil Mreg e assim não impediu a liberação de citocinas pró-inflamatória, ou se era devido ao tamanho da amostra. Portanto, ao realizar um experimento idêntico ao anterior, concentrando-se apenas na dosagem da IL-1 β , observou-se uma redução significativa em comparação com o controle positivo (**Figura 17**).

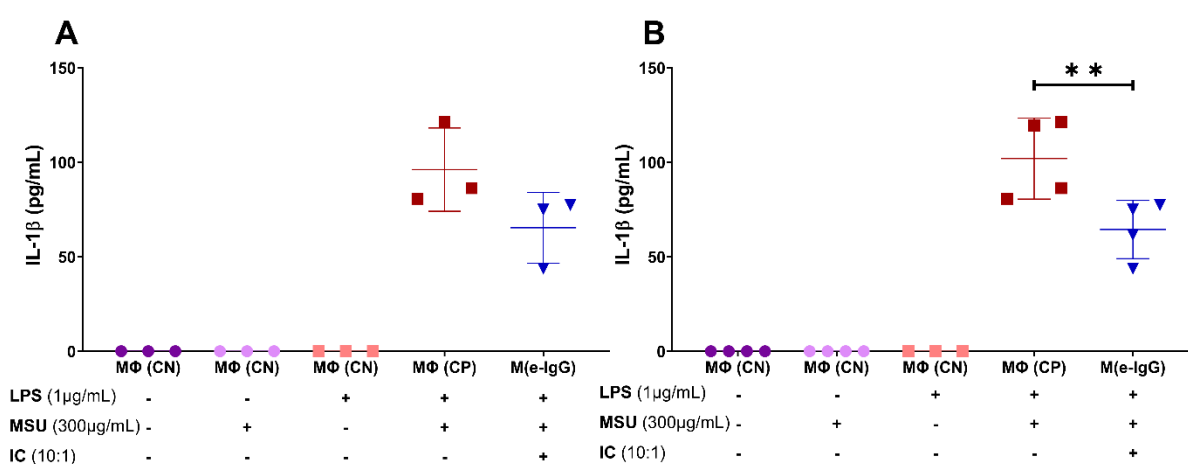


Figura 17 - O coestímulo de IC com LPS diminuiu a liberação de IL-1 β quando comparado ao controle positivo.

BMDM (1×10^6 células/poço) foram cultivados em placas de 24 poços. As células foram pré-estimuladas com LPS ($1 \mu\text{g/ml}$) ou LPS e imunocomplexo (E-IgG) na proporção 10:1 por 1 h. Após a incubação, realizou-se a troca do sobrenadante e, 2 h depois, ocorreu o desafio dos macrófagos com cristais de MSU ($300 \mu\text{g/ml}$) por 6 h. Transcorrido o tempo, o sobrenadante foi coletado e mensurada a liberação de IL- 1β por ELISA. Os dados foram avaliados pelo teste One-way ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey, e são expressos em média \pm desvio padrão. Diferenças significativas entre o grupo Controle Positivo (M Φ – CP) são representadas pelo asterisco “***” quando o $p < 0,01$. (A) Os resultados são representativos de três experimentos independentes $N=1$. (B) Os resultados são representativos de quatro experimentos independentes $N=1$. O quarto experimento foi conduzido em triplicata, e o valor adicionado foi a média dessas três repetições. M Φ : macrófagos; CN: Controle Negativo; CP: Controle Positivo; M(e-IgG): macrófagos regulatórios; LPS: Lipopolissacarídeo; MSU: Urato Monossódico; IC: Imunocomplexo.

No segundo experimento *in vitro*, optou-se por adicionar macrófagos que já haviam sido polarizados por oito horas com imunocomplexo (E-IgG 10:1) mais LPS (20 ng/ml) ou macrófagos que não foram estimulados (M0), mas deixados na mesma condição dos M(e-IgG), duas horas antes do desafio com MSU ou ATP, sobre os BMDMs que foram previamente primados com LPS por uma hora (**Figura 18**). Observa-se uma diminuição na liberação de IL- 1β e TNF no grupo que foi co-cultivado com M(e-IgG) (**Figura 19**).

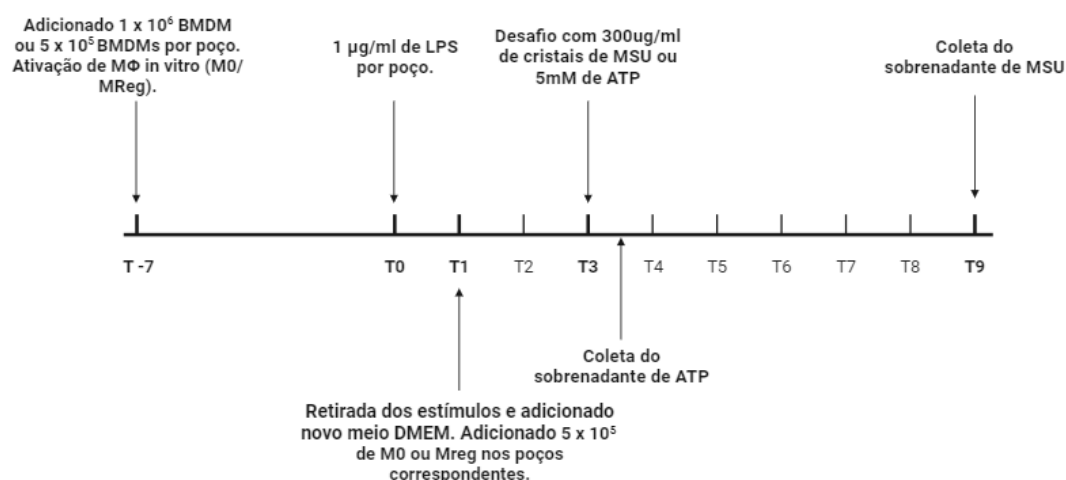


Figura 18 - Segunda estratégia experimental.

Incorporou-se macrófagos previamente polarizados por 8 h com imunocomplexo (E-IgG 10:1) e LPS (20 ng/ml), ou macrófagos não estimulados (M0), mantidos nas condições que os M(E-IgG), duas horas antes do desafio com MSU ou ATP, em cima dos BMDMs que foram inicialmente primados com LPS por 1 h. O sobrenadante foi coletado e realizada a dosagem de citocinas por ELISA. BMDM: Macrófagos derivados da medula óssea; LPS: Lipopolissacarídeo; MSU: Urato Monossódico; ATP: Adenosina Trifosfato.

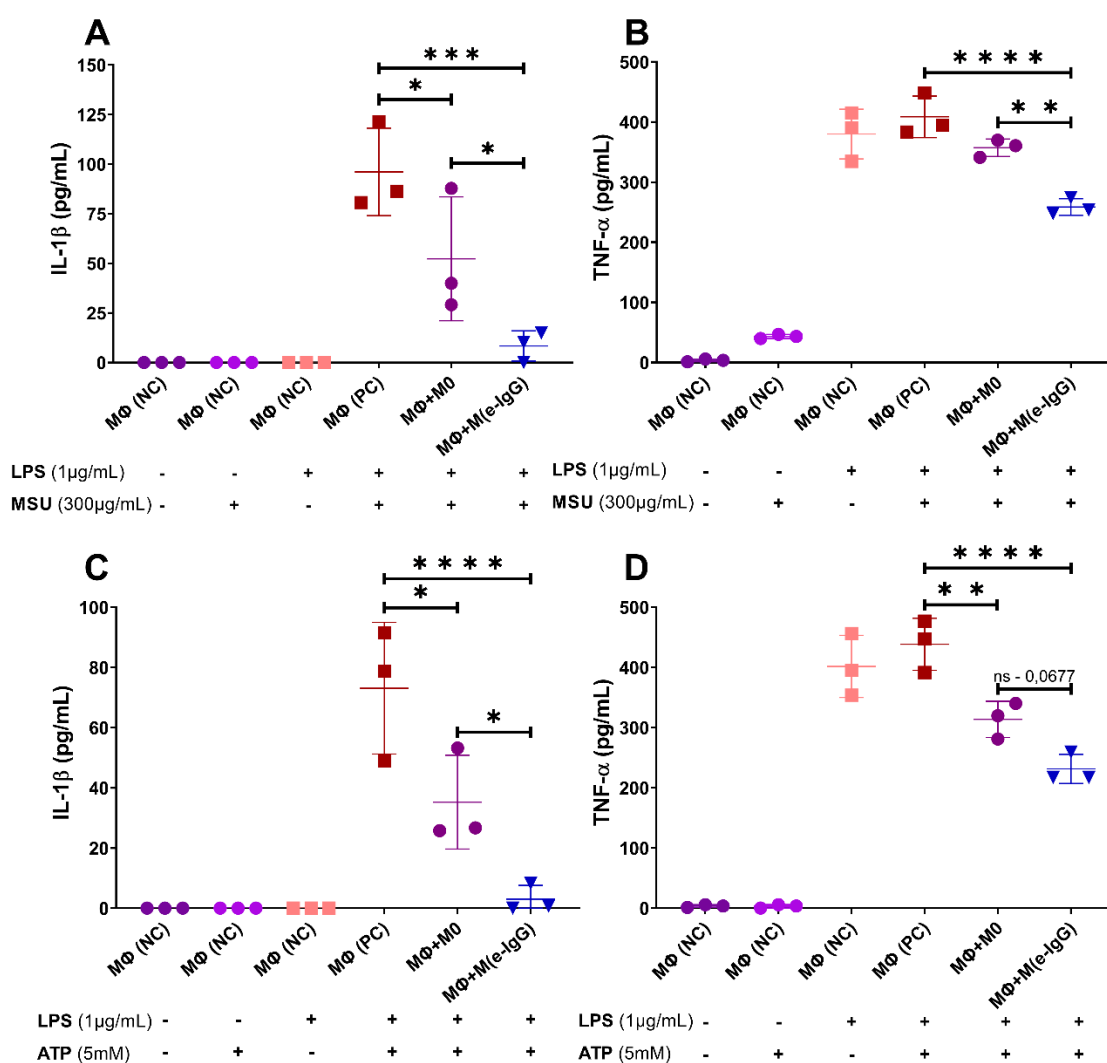


Figura 19 – Redução de citocinas inflamatórias em co-culturas de BMDM com M(e-IgG) desafiados com agonistas do inflamassoma NLRP3.

BMDM (1×10^6 células/poço para os controles e 5×10^5 células/poço para os que iriam receber MΦ polarizados) foram cultivados em placas de 24 poços. As células foram pré-estimuladas com LPS (1 µg/ml) por 1 h. Após uma hora de incubação, realizou-se a troca do sobrenadante e foi adicionado os macrófagos que já haviam sido polarizados por oito horas (5×10^5 M0 ou M(e-IgG)), duas horas depois, ocorreu o desafio com cristais de MSU (300 µg/ml) por 6 h ou ATP (5 mM) por 30 minutos. Transcorrido o tempo, o sobrenadante foi coletado e mensuramos a liberação de IL-1β (A)(C) e TNF (B)(D) por ELISA. Os dados foram avaliados pelo teste One-way ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey, e são expressos em média \pm desvio padrão. Diferenças significativas entre os grupos são representadas pelo asterisco “*” quando $p < 0,05$, pelos asteriscos “***” quando o $p < 0,01$, pelos asteriscos “****” quando o $p < 0,001$ e pelos asteriscos “*****” quando o $p < 0,0001$. Os resultados são representativos de três experimentos independentes $N=1$. MΦ: macrófagos; CN: Controle Negativo; CP: Controle Positivo; M0: macrófagos sem estímulos; M(e-IgG): macrófagos regulatórios; LPS: Lipopolissacarídeo; MSU: Urato Monossódico; IC: Imunocomplexo; ATP: Adenosina Trifosfato; ns: não significativo.

6.3 Ativação do inflamassoma NLRP3 por injeção peritoneal de cristais de MSU e terapia com macrófagos

Após os experimentos *in vitro*, realizou-se um estudo semelhante, mas utilizando um modelo de peritonite aguda induzida por MSU em camundongos (**Figura 20**). Os animais foram divididos em seis grupos distintos: um grupo controle negativo, um grupo controle positivo, um grupo no qual apenas adicionamos macrófagos sem estímulos, outro grupo no qual foram adicionados apenas macrófagos regulatórios, um grupo com macrófagos sem estímulos e posteriormente foram desafiados com MSU, e por último, um grupo no qual injetou-se macrófagos regulatórios e, em seguida, desafiados com cristais de MSU.

Observou-se que o grupo controle positivo e os grupos que receberam macrófagos com ou sem estímulos mais os cristais de MSU não apresentaram diferenças significativas em relação aos leucócitos totais, polimorfonucleares e mononucleares. No entanto, houve diferenças significativas entre o grupo controle positivo e o grupo controle negativo, bem como entre o grupo controle positivo e os grupos que receberam apenas macrófagos com ou sem estímulos.

Ao avaliar a dosagem de citocinas no lavado peritoneal, notou-se que os grupos que receberam macrófagos com ou sem estímulos mais cristais de MSU apresentaram uma redução na liberação de IL-1 β em comparação ao grupo controle positivo.

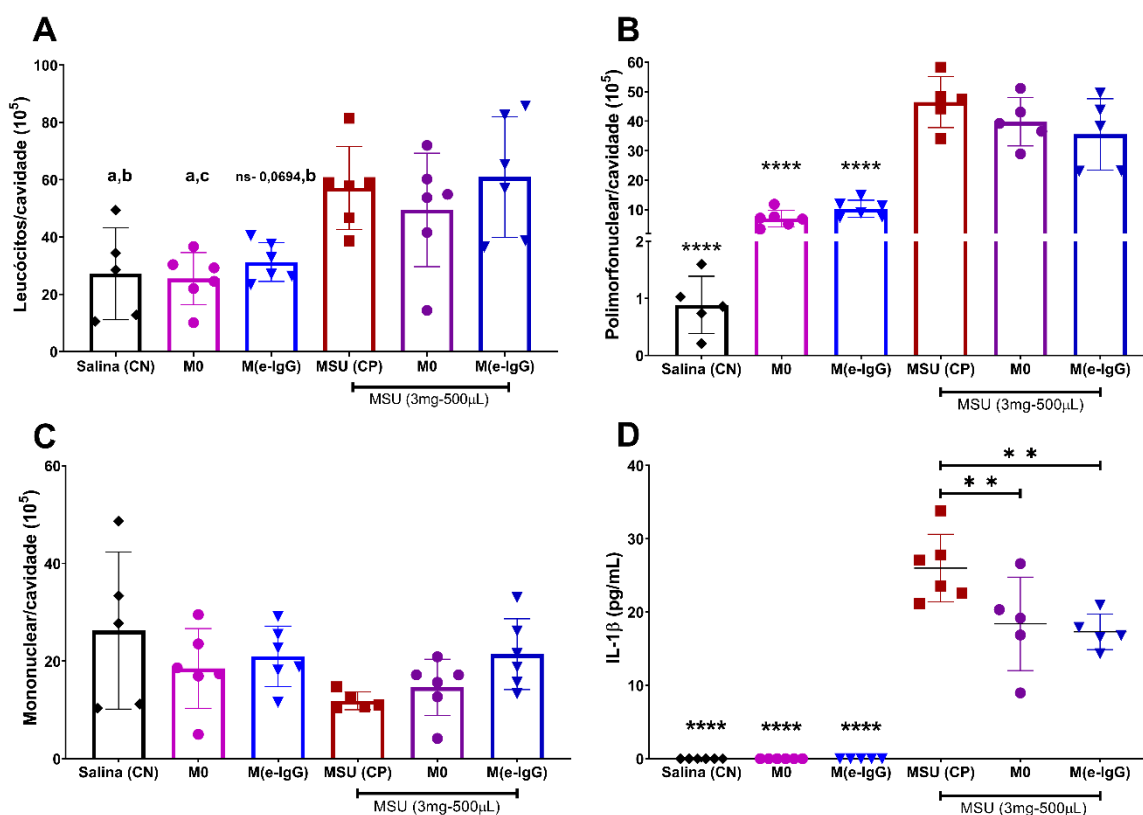


Figura 20 – Macrófagos regulatórios diminuem a liberação de IL-1 β em modelo de peritonite aguda induzida por cristais de MSU em camundongos.

BMDM (1×10^6 /ml) foram mantidos sem estímulo ou estimulados com 20 ng/ml de LPS e imunocomplexos formados a partir da E-IgG por 8 horas. Após isso, eles foram injetados nos camundongos de acordo com o grupo. Após duas horas os animais foram desafiados com cristais de MSU ou solução salina. Após o desafio com cristais de MSU, aguardou-se 6 h e procedeu-se à eutanásia dos animais de acordo com as normas vigentes. Realizou-se o lavado peritoneal em todos os animais com 5 ml de PBS gelado. O volume coletado em cada lavado foi anotado e as células na câmara de Neubauer foram contadas para a contagem total (A). Após esse procedimento, o lavado foi centrifugado a 300G por 10 minutos a 4°C. As células foram ressuspensas e preparadas em lâminas por citocentrifugação para diferenciar os tipos celulares, utilizando os critérios morfológicos padrões (B)(C) e o sobrenadante foi armazenado a -20°C, aguardando sua utilização no ensaio de ELISA (D). (A) Os dados foram avaliados pelo teste One-way ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey, e são expressos em média \pm desvio padrão. Diferenças significativas entre o grupo Controle Positivo (MSU) são representadas pela letra “a” quando $p < 0,05$, e ao grupo M(e-IgG) + MSU são representadas pela letra “b” quando $p < 0,05$ e pela letra “c” quando o $p < 0,01$. (B) Os dados foram avaliados pelo teste One-way ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey, e são expressos em média \pm desvio padrão. Diferenças significativas entre o grupo Controle Positivo (MSU), M0 + MSU e M(e-IgG) + MSU e os demais grupos são representadas pelos asteriscos “****” quando o $P < 0,0001$. (D) Os dados foram avaliados pelo teste One-way ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey, e são expressos em média \pm desvio padrão.

Diferenças significativas entre o grupo Controle Positivo (MSU), M0 + MSU e M(e-IgG) + MSU e os demais grupos são representadas pelos asteriscos “****” quando o $P < 0,0001$. Diferenças significativas entre o grupo Controle Positivo (MSU) e os grupos M0 + MSU e M(e-IgG) + MSU são representadas pelos asteriscos “***” quando o $P < 0,01$. Os resultados são representativos de um experimento $N=6$. MΦ: macrófagos; CN: Controle Negativo; CP: Controle Positivo; M0: macrófagos sem estímulos; M(e-IgG): macrófagos regulatórios; MSU: Urato Monossódico; ns: não significativo.

6.4 Perfil inflamatório da gota aguda em camundongos

Como demonstrado por Amaral et al. (2012) e Galvão et al. (2017), a injeção de cristais de MSU na articulação de camundongos induz uma inflamação intra-articular aguda. Essa inflamação aumenta o influxo de neutrófilos na região afetada, bem como da citocina IL-1 β e das quimiocinas CXCL1 e CCL2, sendo dependente da dose e do tempo (AMARAL et al., 2012; GALVÃO et al., 2017).

Cristais de MSU foram produzidos e preparados para a realização deste trabalho. No entanto, diferentes lotes do produto apresentam respostas distintas no organismo do modelo animal. Portanto, o primeiro passo consistiu em determinar a cinética da resposta inflamatória articular após a injeção de cristais de MSU, de acordo com os cristais obtidos. Para a avaliação da cinética da inflamação, procedemos o lavado articular dos animais em diferentes momentos após a indução da inflamação (**Figura 21**). Foi realizada a contagem global e diferencial dos leucócitos presentes no lavado, bem como o processamento do tecido periarticular e a dosagem das citocinas presentes.

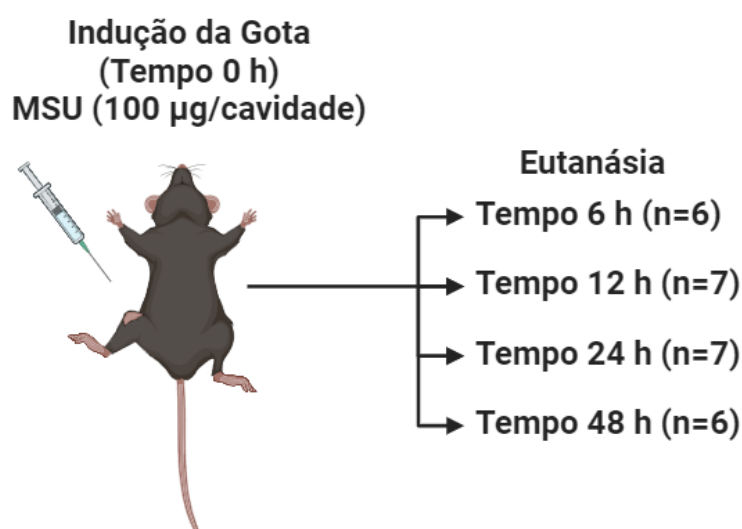


Figura 21 - Indução da gota e cinética da inflamação.

Os animais foram divididos em quatro grupos: Grupo T6 (eutanasiados após 6 horas), Grupo T12 (eutanasiados após 12 horas), Grupo T24 (eutanasiados após 24 horas) e Grupo T48 (eutanasiados após 48 horas). Cada grupo recebeu uma injeção intra-articular tíbio-femoral com 10 µl de solução de cristais de MSU (100 µg/cavidade) na articulação tíbio-femoral direita, enquanto na articulação tíbio-femoral contralateral do grupo T6 também receberam uma injeção do veículo (solução salina). O número de animais em cada grupo foi de n=6 para o Grupo T6, n=7 para os Grupos T12 e T24, e n=6 para o Grupo T48. H: hora; n= número; MSU: urato monossódico. Criado em: Biorender.com

O pico da inflamação foi determinado a partir do acúmulo de células na cavidade articular e da quantidade de citocinas encontradas no processamento do tecido periarticular. Após a injeção dos cristais de MSU, observou-se o pico global de células em 12 horas (**Figura 22A**), coincidindo com o pico de neutrófilos (**Figura 22B**). O pico de mononucleares (monócitos/macrófagos) surgiu junto com a queda de neutrófilos, ou seja, em 24 horas (**Figura 22C**), enquanto o pico da liberação da citocina IL-1β também ocorreu em 12 horas após o desafio (**Figura 23**).

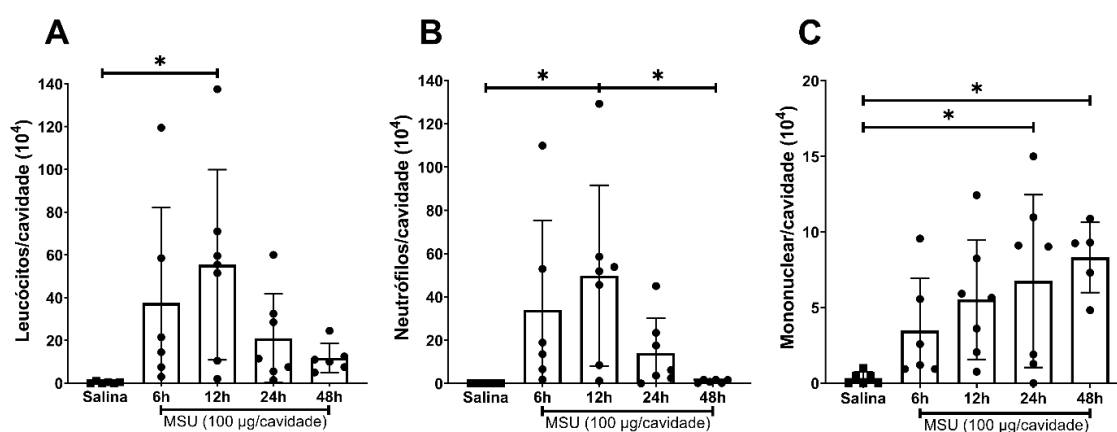


Figura 22 - Cinética da inflamação articular através da contagem de leucócitos totais, neutrófilos e mononucleares.

Os animais foram desafiados com injeção intra-articular de cristais de MSU (100 µg/cavidade), e as análises foram realizadas nos tempos de 6, 12, 24 e 48 horas após o desafio. Foi realizado o lavado articular para a recuperação e contagem de células totais e células diferenciais (Neutrófilos/Mononucleares). (A)(B) Os dados foram avaliados pelo teste One-way ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey, e são expressos como média ± desvio padrão. Diferenças significativas em relação ao grupo Gota 12 horas são representadas pelo asterisco “*” quando p < 0,05. (C) Os dados foram avaliados pelo teste One-way ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey, e são expressos como média ± desvio padrão. Diferenças significativas em relação ao grupo Gota 24 horas e ao grupo Gota 48 horas são representadas pelo asterisco “*” quando p < 0,05. MSU: urato monossódico.

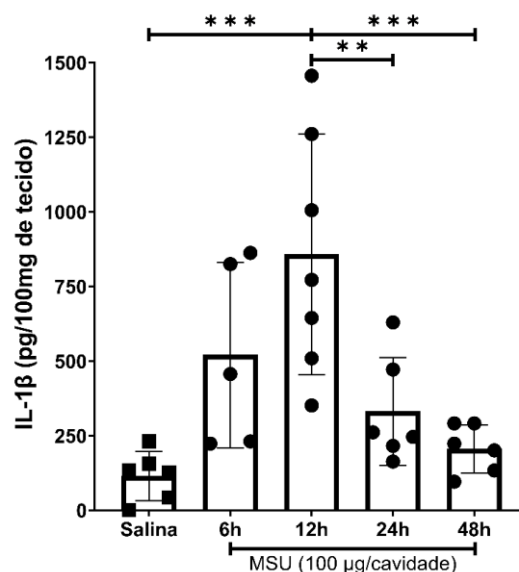


Figura 23 - Cinética da inflamação articular através da dosagem de IL-1β.

Os animais foram desafiados com injeção intra-articular de cristais de MSU (100 µg/cavidade), e as análises foram realizadas nos tempos de 6, 12, 24 e 48 horas após o desafio. Após o processamento do tecido periarticular para a recuperação de citocinas, a dosagem de IL-1β foi realizada por ELISA. Os dados foram avaliados pelo teste One-way ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey, e são expressos em média ± desvio padrão. Diferenças significativas em relação ao grupo Gota 12 horas são representadas pelos asteriscos “***” quando $p < 0,01$ e pelos asteriscos “****” quando $p < 0,001$. MSU: urato monossódico.

6.5 Terapia com macrófagos com diferentes estímulos na artrite gotosa murina

Após uma série de testes com o objetivo de determinar o momento mais apropriado para a injeção dos macrófagos e dos cristais de MSU, verificou-se que a estratégia de injetar os macrófagos polarizados durante duas horas na articulação, seguida do desafio com os cristais de MSU uma hora depois, não produziu resultados favoráveis. Além disso, foi explorada outra abordagem, na qual os macrófagos foram polarizados por oito horas e, em seguida, injetados duas horas após o desafio com os cristais, mas essa abordagem também se revelou subótima.

Com base na cinética de liberação de citocinas pelos macrófagos e na revisão dos dados da literatura, que indicam que os estímulos nos macrófagos devem ser aplicados antes do desafio com os cristais (JANCZY et al., 2014), decidiu-se optar pela injeção intra-articular dos macrófagos que foram polarizados por oito horas. Duas

horas após, foram injetados os cristais de MSU na mesma articulação (**Figura 24**). Os animais foram divididos em quatro grupos distintos: um grupo controle negativo, um grupo controle positivo, um grupo no qual foram injetados macrófagos sem estímulos e posteriormente desafiados com cristais de MSU, e por último, um grupo no qual foram injetados macrófagos regulatórios e, em seguida, desafiados com cristais de MSU.

Observou-se que o grupo controle positivo e os grupos que receberam macrófagos com ou sem estímulos mais os cristais de MSU apresentaram diferenças significativas em relação aos leucócitos totais e polimorfonucleares. Assim como houve diferenças significativas entre o grupo controle positivo e o grupo controle negativo em todos os parâmetros.

Ao avaliar a dosagem de citocinas do tecido periarticular, notou-se que os grupos que receberam macrófagos com ou sem estímulos mais os cristais de MSU apresentaram uma redução na liberação de CXCL1 em comparação ao grupo controle positivo, corroborando com os resultados da infiltração de neutrófilos na cavidade articular, mas não reduziram a liberação de IL-1 β .

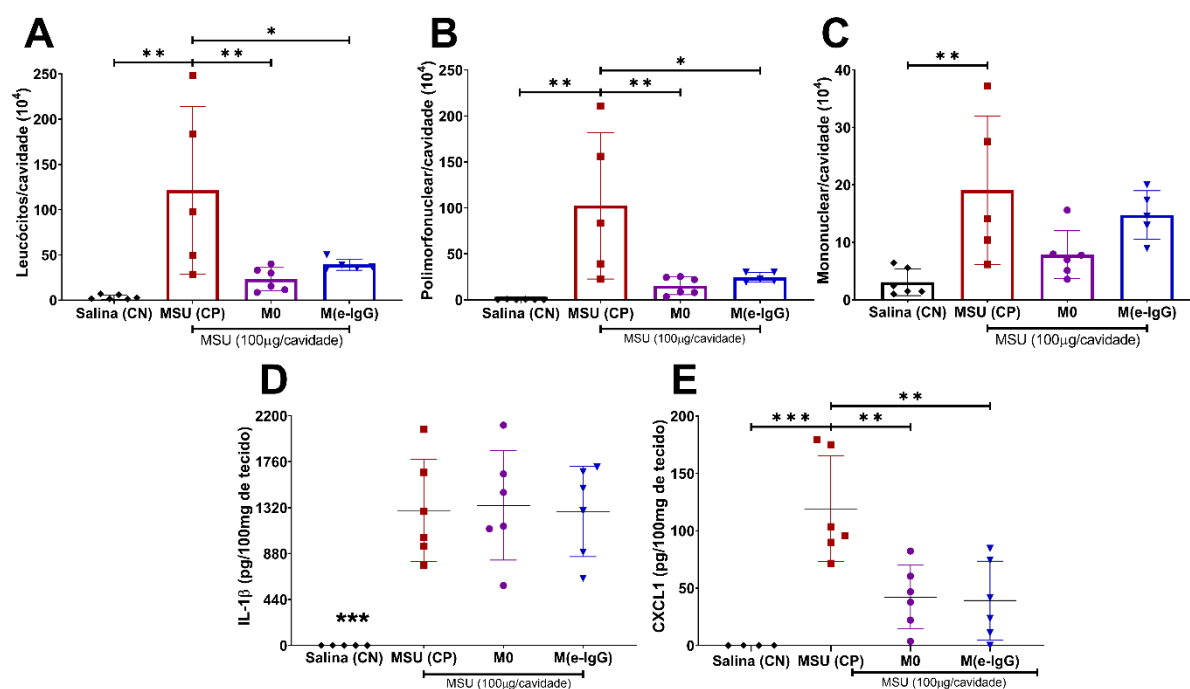


Figura 24 - Macrófagos regulatórios diminuem o influxo de neutrófilos e da quimiocina CXCL1 em modelo de artrite gotosa aguda induzida por cristais de MSU em camundongos.

BMDM (1×10^6 /ml) foram mantidos sem estímulo ou estimulados com 20 ng/ml de LPS e imunocomplexos formados a partir da E-IgG por 8 horas. Após isso, foram injetados 10 μ L de macrófagos (3×10^4 M Φ s/cavidade) sem estímulos ou macrófagos regulatórios de acordo com o grupo. Após duas horas os animais foram desafiados com 10 μ L de cristais de MSU (100 μ g/cavidade) ou solução salina. Após o desafio com cristais de MSU, aguardou-se um período de 12 horas, baseando-nos no experimento anterior que demonstrou ser esse o ponto de pico inflamatório dos cristais de MSU. Posteriormente, ocorreu a eutanásia dos animais de acordo com as normas vigentes. O lavado articular foi realizado para obtenção das células para a contagem total (A) e diferencial de células (B)(C) e o tecido periarticular foi separado para processamento e dosagem de citocinas por ELISA (D)(E). (A)(B)(C)(D)(E) Os dados foram avaliados pelo teste One-way ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey, e são expressos em média \pm desvio padrão. Diferenças significativas entre os grupos são representados pelos asteriscos “*” quando o $P < 0,05$; “***” quando o $P < 0,01$ e “****” quando o $P < 0,001$. Os resultados são representativos de um experimento $N=6$. M Φ : macrófagos; CN: Controle Negativo; CP: Controle Positivo; M0: macrófagos sem estímulos; M(e-IgG): macrófagos regulatórios; MSU: Urato Monossódico.

7 DISCUSSÃO

7.1 Reprogramação de macrófagos *in vitro*

Fleming e Mosser (2011) já descreveram o potencial da manipulação dos macrófagos no controle de doenças. Os macrófagos regulatórios demonstraram eficácia em modelos de endotoxemia letal aguda (GERBER; MOSSER, 2001), no controle da doença inflamatória intestinal experimental (LOPES et al., 2021) e no controle da encefalomielite autoimune experimental (FLEMING; MOSSER, 2011). Recentemente, foi descrita uma nova função dos macrófagos regulatórios, que é inibir a ativação alternativa dos macrófagos e, assim, controlar a resposta pró-fibrótica dessas células (CHANDRASEKARAN et al., 2019). Esses estudos injetaram macrófagos em grandes quantidades e por um período mais longo, no entanto, não era o nosso caso, pois tínhamos limitações quanto ao local de injeção e ao tempo de atuação dos macrófagos já polarizados.

Desta forma, a primeira etapa consistiu em realizar a análise da reprogramação dos macrófagos para diferentes perfis de ativação. Após quatro horas, avaliamos a expressão de mRNA de interesse. Para corroborar os dados, também analisamos a liberação de algumas citocinas por ELISA após 16 horas de polarização. Essa escolha se baseia na flexibilidade dos macrófagos, que podem alterar seu perfil em resposta ao ambiente. A falta de marcadores de superfície confiáveis para cada população de

macrófagos torna complexa a determinação da polarização por meio de proteínas de superfície (MURRAY et al., 2014). Portanto, adotamos a liberação de citocinas e outros marcadores como critério para diferenciar essas células durante seu perfil transitório de ativação (LOPES; MOSSER; GONÇALVES, 2020). Macrófagos polarizados para um perfil pró-inflamatório tendem a liberar mais IL-12 e menos IL-10, enquanto o perfil regulatório mostra o oposto. Calculamos a razão de liberação dessas citocinas para distinguir esses perfis. Por outro lado, macrófagos alternativamente ativados e macrófagos não estimulados não liberam essas citocinas *in vitro*, o que torna necessário analisar a expressão de marcadores de M2, como YM1, ARG1 e FIZZ1, por qRT-PCR.

Este primeiro experimento também serviu como teste para determinar a concentração de anticorpos utilizada na formação do imunocomplexo com as beads de poliestireno. A literatura cita que, para ocorrer a ligação através dos receptores FcγR, os anticorpos IgG precisam estar em maior quantidade do que os antígenos (no caso, as *beads* de poliestireno) (ANDERSON; MOSSER, 2002). Isso promoveria a ligação de duas moléculas de IgG ao mesmo antígeno, que se ligariam a dois receptores FcγR distintos, potencializando a sinalização a jusante (BOURNAZOS; GUPTA; RAVETCH, 2020). Esse protocolo mimetiza a formação de imunocomplexos para induzir nos macrófagos o chamado *crosslinking* com os receptores FcγR. O *crosslinking* é necessário para atuar como segundo sinal na ativação dessas células (SUTTERWALA et al., 1998; GERBER; MOSSER, 2001; ANDERSON; MOSSER, 2002).

Após confirmar a polarização de cada perfil de macrófago e determinar que as concentrações de anticorpos em torno de 1,6 a 3,0 mg/ml são ideais para a formação do imunocomplexo (**Figura 9**), conduzimos uma análise cinética da liberação de citocinas. Observamos um aumento na expressão das citocinas de interesse, como IL-10 e IL-12, já após 4 horas, e um aumento na liberação dessas citocinas em 8 horas (**Figura 10**).

Essa análise foi fundamental para determinar o momento adequado para a injeção dos macrófagos polarizados no modelo com MSU. Os macrófagos regulatórios produzem a citocina IL-10, no entanto, as funções da IL-10 são influenciadas por diversas variáveis, incluindo sua origem, as células-alvo em que age, bem como o

local e o momento da sua liberação (CARLINI et al., 2023). Certificamo-nos de que essas células fossem injetadas quando fossem capazes de liberar citocinas em quantidades significativas, o que poderia reverter a inflamação aguda e a liberação de citocinas pró-inflamatórias. Janczy et al. (2014) demonstraram *in vitro* que a inibição da secreção de IL-1 β ocorre quando os imunocomplexos são adicionados até 3 horas após o LPS, mas não se forem adicionados simultaneamente com o agonista do inflamassoma NLRP3, indicando que os imunocomplexos afetam o sinal de iniciação, mas não a montagem e clivagem do complexo do inflamassoma (JANCZY et al., 2014).

Testamos outras formas de obter os imunocomplexos, bem como a ação da prostaglandina e adenosina, que promovem o perfil regulatório (MOSSER; EDWARDS, 2008). Com base na liberação e no cálculo da razão entre as concentrações de IL-10 e IL-12 para determinar o perfil de liberação dessas citocinas pelos macrófagos, selecionamos os três melhores formadores de imunocomplexos capazes de reduzir a liberação de IL-12 e aumentar a IL-10 (**Figura 11**). Insatisfeitos com os resultados, buscamos um estímulo que praticamente eliminasse a IL-12. Testamos um novo estímulo e, ao analisar a liberação de citocinas (**Figura 12**) e a expressão de mRNA (**Figura 13**), observamos que o imunocomplexo com hemácias de ovelha era eficaz na expressão de IL-10 e na significativa redução da IL-12. Essas células eram distintas dos chamados M2 e M0, o que foi determinante para a escolha desse estímulo nos experimentos subsequentes.

7.2 Vias purinérgica e a imunomodulação de macrófagos na gota aguda.

Os macrófagos estão presentes em praticamente todos os tecidos do corpo, onde mantêm o funcionamento adequado dos órgãos. São células que respondem ao microambiente em que estão inseridos com diferentes perfis de ativação para atender as necessidades fisiológicas daquele momento, ou seja, os macrófagos atuam de diversas formas para atingir a homeostase (MOSSER; EDWARDS, 2008; LOPES; MOSSER; GONÇALVES, 2020). Essa característica marcante de plasticidade pode explicar os papéis completamente antagônicos dos macrófagos observados no curso da inflamação autorregulada da gota.

O ácido úrico é um produto da metabolização dos nucleotídeos de purina em

humanos. Seu aumento pode ser causado por fatores dietéticos, metabólicos e de síntese (MAIUOLO et al., 2016; DANVE; SEHRA; NEOGI, 2021). A formação do ácido úrico circulante e a hiperuricemia estão associadas a níveis aumentados de purinas no organismo. Além dos cristais de MSU, outros fatores, como DAMPs e PAMPs extracelulares (incluindo vírus e ATP), desempenham um papel na ativação do inflamassoma NLRP3 (SWANSON; DENG; TING, 2019; LI; GAO; TAO, 2021). Sendo assim, as vias de sinalização purinérgica estão envolvidas na regulação de todo o processo de exacerbação e resolução da gota.

É interessante notar que o ATP e o AMP podem induzir uma resposta inflamatória nos macrófagos. O MSU, por si só, não é suficiente para desencadear um surto de gota; estudos sugerem um efeito sinérgico com níveis elevados de ATP extracelular (LI; GAO; TAO, 2021). Isso leva os macrófagos a assumir um perfil do tipo M1, caracterizado pela liberação de citocinas inflamatórias e quimiocinas para atrair células para a área afetada. Macrófagos M1 exibem uma redução na expressão de CD39 e CD73, enzimas que convertem ATP em adenosina, enquanto os M2 apresentam níveis mais elevados dessas enzimas (ZANIN et al., 2012).

As mudanças na expressão de CD39 e CD73 podem afetar o nível de nucleotídeos e o estado inflamatório na gota. O ATP extracelular pode ser convertido em adenosina pelos macrófagos M1, possibilitando a transição dessas células de um estado inflamatório para um estado regulatório. Portanto, as mudanças metabólicas que permitem aos macrófagos M1 desencadear respostas inflamatórias também podem atuar como um mecanismo de controle, evitando a progressão da inflamação por essas células (HAMIDZADEH; MOSSER, 2016). Sabe-se que o aumento de ATP desencadeia uma resposta inflamatória. No entanto, a conversão das purinas resulta na produção de adenosina e subsequente produção de ácido úrico, levando à hiperuricemia e à formação de cristais de MSU. Isso pode explicar por que alguns indivíduos com depósitos de cristais não desenvolvem inflamação, possivelmente devido à ativação de macrófagos em um perfil regulatório, devido ao aumento de adenosina no ambiente.

A adenosina sinaliza por meio de receptores P1 para induzir um estado regulatório, resultando na redução das citocinas inflamatórias e na promoção das citocinas anti-inflamatórias (HASKÓ; CRONSTEIN, 2004; KOSCSÓ et al., 2012;

LINDEN; CEKIC, 2012; HAMIDZADEH; MOSSER, 2016; LI; GAO; TAO, 2021). Isso sugere que a sinalização purinérgica pode desempenhar um papel na resolução da gota, modificando o perfil dos macrófagos de inflamatório para anti-inflamatório (HAMIDZADEH; MOSSER, 2016; KLAVER; THURNHER, 2021; LI; GAO; TAO, 2021). Estudos anteriores já haviam indicado que a adenosina, quando combinada com agonistas de TLR em macrófagos, pode alterar o perfil dessas células para um estado regulatório (MOSSER; EDWARDS, 2008; FLEMING et al., 2015; CHANDRASEKARAN et al., 2019). Essa modulação é fundamental para prevenir e/ou resolver a inflamação aguda.

7.3 Ensaios *in vitro* com macrófagos e MSU

No primeiro experimento *in vitro* (**Figura 16**), analisamos a resposta dos BMDM aos estímulos e observamos que os BMDM, quando não estimulados ou quando estimulados com LPS, MSU ou ATP, não apresentaram ativação do inflamassoma e não liberavam IL-1 β . Esses resultados confirmam as informações que indicam a necessidade de dois sinais para a ativação do inflamassoma e a subsequente liberação de IL-1 β (SWANSON; DENG; TING, 2019).

Optamos por utilizar os agonistas do inflamassoma, como MSU e ATP, com o objetivo de demonstrar que a redução das citocinas inflamatórias ocorria devido à polarização dos macrófagos para um perfil anti-inflamatório, e não devido à diminuição da fagocitose. É importante notar que, no caso dos cristais de MSU, a ativação do inflamassoma requer que eles sejam fagocitados, enquanto no caso do ATP, a ativação do inflamassoma ocorre por meio da ligação aos receptores P2, que desencadeiam o fluxo de íons e, assim, ativam o inflamassoma (SWANSON; DENG; TING, 2019).

Nossos resultados demonstraram que BMDMs estimulados com IC junto com LPS tiveram um aumento não significativo na produção de IL-10 e uma diminuição na produção de IL-12, bem como uma redução na liberação de IL-1 β quando comparados ao controle positivo (*priming* com LPS seguido de estímulo com MSU ou ATP) (**Figura 16**). Chegamos à conclusão de que a falta de dados consolidados pode ser atribuída à limitação do tamanho da amostra. Portanto, conduzimos um experimento adicional em triplicata para confirmar a hipótese de que a adição de IC juntamente com o *priming*

de LPS seria suficiente para reduzir a liberação da IL-1 β (**Figura 17**).

Nossos resultados estão em concordância com dados da literatura que demonstram que a inibição da secreção de IL-1 β foi observada quando os imunocomplexos foram adicionados até 3 horas após a introdução do LPS, mas não ocorreu quando os imunocomplexos foram adicionados simultaneamente com o agonista de NLRP3 (JANCZY et al., 2014). Esses resultados sugerem que os imunocomplexos podem interferir no sinal inicial necessário para a ativação do inflamassoma

No segundo experimento *in vitro*, optamos por introduzir macrófagos que já haviam passado por um processo de polarização de oito horas. Neste experimento, nosso objetivo era observar como os macrófagos previamente polarizados responderiam em comparação com aqueles que não tinham passado pelo processo de polarização, mas já haviam recebido o primeiro sinal de ativação do inflamassoma. Essa abordagem simulou a situação *in vivo*, em que adicionaríamos macrófagos polarizados, em vez de induzir a polarização no tecido.

Pudemos observar uma redução na liberação de IL-1 β e TNF no grupo que foi co-cultivado com M(e-IgG) em comparação com o controle positivo e o grupo co-cultivado com macrófagos não estimulados (**Figura 19**). Ao analisarmos os dados, podemos supor que os macrófagos não estimulados não produziram IL-1 β , uma vez que não foram previamente ativados com o LPS. Além disso, eles não contribuíram para a diminuição da liberação de IL-1 β pelos BMDMs que haviam sido primados com LPS antes de entrarem em contato com os macrófagos não estimulados e o agonista do inflamassoma. No entanto, no caso do co-cultivo com os M(e-IgG), observou-se uma redução na liberação tanto de IL-1 β quanto de TNF.

Neste contexto, demonstramos a relevância dos Mregs e da IL-10 no controle da ativação do inflamassoma NLRP3 experimental. Os poços que receberam Mregs ou o IC conseguiram efetivamente regular negativamente a liberação de IL-1 β . A IL-10, como uma potente citocina anti-inflamatória, tem a capacidade de inibir a produção de várias citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-18 e TNF (WU et al., 2020). Durante a inflamação aguda da gota, a IL-10 pode inibir a transcrição dos genes correspondentes a essas citocinas pró-inflamatórias, como TNF e IL-1 β , e

bloquear sua síntese (WU et al., 2020). Todos esses achados sugerem que a imunomodulação de macrófagos e o aumento da IL-10 pode desempenhar um papel fundamental na autorregulação da resposta imune inflamatória aguda em pacientes com gota. São necessárias mais análises para confirmar de que forma e em que momento os macrófagos estão influenciando a diminuição da liberação das citocinas pró-inflamatórias *in vitro*.

7.4 Perfil inflamatório da gota aguda em camundongos

A injeção de cristais de MSU na articulação do joelho de camundongos induziu um recrutamento acentuado de neutrófilos (**Figura 22B**). Nossos resultados corroboram com os achados da literatura que mostram um aumento de leucócitos, principalmente neutrófilos, com pico em 12 horas após a injeção de cristais de MSU (**Figura 22**) (AMARAL et al., 2012; GALVÃO et al., 2017). O influxo de neutrófilos é considerado a marca da gota aguda, e admite-se que essas células contribuam de forma relevante para a patogênese da doença (PHELPS; MCCARTY, 1967; TERKELTAUB et al., 1998; POPA-NITA; NACCACHE, 2010; MITROULIS; KAMBAS; RITIS, 2013; SO; MARTINON, 2017; DALBETH et al., 2021). De fato, ao migrarem para o tecido inflamado, os neutrófilos se deparam com um ambiente rico em citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e TNF- α , além de detritos celulares. Essa interação desencadeia uma resposta dessas células, resultando no ataque ao tecido por meio da liberação de ROS, proteases e na formação de NETs, as quais desempenham um papel crucial na amplificação e manutenção da resposta inflamatória (WEISS, 1989; POPA-NITA; NACCACHE, 2010; MITROULIS; KAMBAS; RITIS, 2013). Essa migração massiva de neutrófilos nos momentos iniciais da doença tem relação direta com os níveis da quimiocina CXCL1 e a citocina IL-1 β que ativam e atraem estas células para o espaço articular. Desta forma, estes fatores, são considerados marcadores da fase aguda no modelo da doença experimental em camundongos (AMARAL et al., 2012; GALVÃO et al., 2017). No trabalho em questão, a análise da citocina IL-1 β (**Figura 23**), mostrou pico de concentração em 12 horas, corroborando com o pico de leucócitos totais e de neutrófilos em 12 horas encontrados na contagem diferencial do lavado articular.

Após o pico de neutrófilos em 12 horas, ocorreu uma queda acentuada destes, e em 48 horas após a injeção de cristais de MSU, essas células estavam praticamente

ausentes (**Figura 22C**). Houve um aumento significativo de monócitos/macrófagos 24 horas após a indução da gota, conferindo características de resolução da inflamação. Em 48 horas, as células mononucleares (monócitos/macrófagos) foram os principais leucócitos encontrados na articulação (**Figura 22C**).

A resolução da artrite gotosa é um processo espontâneo que geralmente leva cerca de uma semana em humanos (WALLACE et al., 1977; STEIGER; HARPER, 2013a; DALBETH et al., 2019) e apenas 24 horas em camundongos, devido à presença da enzima uricase nesses animais (ÁLVAREZ-LARIO; MACARRÓN-VICENTE, 2010; AMARAL et al., 2012; GALVÃO et al., 2017). Durante o processo de resolução, os neutrófilos recrutados para as articulações inflamadas passam por apoptose e são subsequentemente reconhecidos e fagocitados por macrófagos (ALESSANDRI et al., 2013; STEIGER; HARPER, 2013a; DALBETH et al., 2021).

7.5 Terapia com Macrófagos sem Estímulo ou Regulatórios em Modelos murinos de Peritonite e Artrite Gotosa Induzidos por Cristais de MSU

Janczy et al. (2014) demonstraram que a inibição da secreção de IL-1 β , mediada pelos imunocomplexos, dependia tanto do número de imunocomplexos utilizados quanto da concentração do anticorpo empregado para opsonizar o alvo (JANCZY et al., 2014). Em consequência, os experimentos *in vivo* foram conduzidos com uma proporção de elgG:BMDM de 20:1. No entanto, a quantidade do anticorpo Anti-SRBC não foi modificada, uma vez que estudos anteriores, como os de Gallo et al. (2010), demonstraram que concentrações aglutinantes não deveriam ser utilizadas para a formação do imunocomplexo, e sugeriram que 10 μ g/ml era uma concentração adequada para trabalhar (GALLO; GONÇALVES; MOSSER, 2010).

Observou-se que não houve diferença significativa entre o controle positivo e a terapia com macrófagos não estimulados e macrófagos regulatórios no que diz respeito ao total de células e ao influxo de neutrófilos na cavidade peritoneal (**Figura 20 A/B/C**). Uma observação importante é que, diferentemente da cavidade articular, onde não encontramos células no líquido sinovial saudável, no peritônio é possível encontrar macrófagos, mastócitos, linfócitos B1, entre outros, devido à presença de células imunes peritoneais livres no líquido peritoneal na homeostase (TERRI et al., 2021; VEGA-PÉREZ et al., 2021). Estudos que analisaram a composição das células

imunológicas no fluido peritoneal de humanos mostraram que os fagócitos peritoneais estão presentes na cavidade peritoneal, mesmo na ausência de infecção, representando cerca de 50% de todos os leucócitos (BAIN; JENKINS, 2018). Portanto, ao realizarmos a contagem global, esse valor já é considerado elevado no controle negativo, embora estatisticamente diferente do controle positivo. Quanto à contagem de polimorfonucleares, nenhuma terapia com macrófagos reduziu a atração de neutrófilos, mas observamos que a mera presença de macrófagos na região levou ao influxo dessas células. Portanto, é necessário conduzir análises adicionais para compreender o que pode ocorrer ao injetar apenas macrófagos na região, considerando a resposta imunológica das demais células presentes.

Ao analisarmos a liberação da citocina IL-1 β no peritônio, observamos que tanto os macrófagos não estimulados quanto os macrófagos regulatórios diminuíram a liberação dessa citocina quando comparados com o controle positivo. Esse dado está em consonância com os resultados obtidos *in vitro*, nos quais houve uma redução na liberação da citocina pelos macrófagos regulatórios. Surpreendentemente, os macrófagos não estimulados foram capazes de diminuir a liberação de IL-1 β (**Figura 20D**) quando comparados aos animais que receberam apenas cristais de MSU (Controle Positivo).

Estudos *in vitro* demonstraram que os monócitos menos diferenciados mostram uma resposta pró-inflamatória mais acentuada em relação aos cristais de MSU (LANDIS et al., 2002; MARTIN et al., 2011). Quando esses monócitos, originários do sangue, passam pelo processo de diferenciação em macrófagos *in vitro*, parece que sua resposta aos cristais de MSU diminui. Isso ocorre porque eles perdem a capacidade de sintetizar citocinas pró-inflamatórias, de ativar células endoteliais e de recrutar neutrófilos para o local inflamado. No entanto, ainda mantêm a capacidade de fagocitar os cristais (YAGNIK et al., 2000; LANDIS et al., 2002). Outra pesquisa mostrou que esses monócitos diferenciados em macrófagos alteram sua produção de citocinas pró-inflamatórias para a produção de TGF- β 1 em resposta à estimulação com cristais de MSU (YAGNIK et al., 2004). Esses estudos podem explicar como os macrófagos não estimulados diminuíram a liberação de IL-1 β no peritônio (**Figura 20D**) das células totais na artrite gotosa murina (**Figura 24A**), do influxo de neutrófilos (**Figura 24B**) e da quimiocina CXCL1 na articulação (**Figura 24E**). No entanto, estes dados foram questionados por estudos adicionais que demonstraram a liberação de

IL-1 β por macrófagos murinos após estimulação com cristais de MSU (MARTIN; WALTON; HARPER, 2009; MITROULIS; KAMBAS; RITIS, 2013). Dessa forma, são necessários mais estudos para verificar como esses macrófagos sem estímulos, podem atuar na redução da inflamação e na inibição da liberação de citocinas pró-inflamatórias.

Com os resultados do experimento *in vitro* e do peritônio, imaginávamos que os macrófagos regulatórios poderiam inibir a montagem e ativação do inflamassoma NLRP3, embora seja necessária uma análise mais detalhada para uma conclusão mais precisa. É interessante ressaltar que, ao contrário do experimento *in vitro* e do experimento no peritônio, na artrite gotosa murina, não houve diminuição da citocina IL-1 β na análise do tecido periarticular (**Figura 24D**). No entanto, tanto os macrófagos sem estímulos quanto os Mregs reduziram o influxo de leucócitos totais (**Figura 24A**), de neutrófilos (**Figura 24B**) e da quimiocina CXCL1 (**Figura 24E**). Portanto, é necessário entender o que pode ter ocorrido, uma vez que pode haver inibição do influxo de neutrófilos através da inibição da sinalização das quimiocinas.

Em um modelo murino de inflamação induzida por cristais de MSU, Murakami et al. (2002) demonstraram que a regulação positiva da expressão da IL-10 parece inibir o recrutamento de neutrófilos, ao suprimir a produção de CXCL1. Isso limita a inflamação experimental, o que é consistente com nossos resultados, onde na artrite gotosa murina houve redução dessa quimiocina (**Figura 24E**).

Embora não explorado em nosso estudo, levantamos a hipótese de que a IL-10 liberada pelos Mreg pode inibir a montagem e a ativação do inflamassoma NLRP3, bem como a liberação de quimiocinas que atraem células inflamatórias para o local. Essa hipótese, embora especulativa, é uma perspectiva para futuras investigações. Nossa próxima abordagem pode envolver a análise dos componentes do inflamassoma, como a clivagem da caspase-1 por western blotting e a ligação da proteína adaptadora ASC. Após a ativação do inflamassoma, a proteína adaptadora ASC forma agregados citosólicos, ou manchas, que co-localizam com a caspase-1 e podem ser visualizados por microscopia confocal.

Esses resultados, de uma forma geral sugerem que a imunomodulação de macrófagos para um perfil regulatório liberador de IL-10 poderia ser uma estratégia

útil para inibir a inflamação gotosa, no entanto, são necessários mais estudos para entendermos exatamente como ocorre a diminuição da inflamação.

8 CONCLUSÃO

Nosso estudo destaca os macrófagos como potenciais alvos terapêuticos na artrite gotosa. A reprogramação dos macrófagos em direção a um perfil anti-inflamatório pode ser uma abordagem eficaz no controle da doença. Essas descobertas têm o potencial de contribuir para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas inovadoras para a artrite gotosa.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, D. O.; HAMILTON, T. A. The cell biology of macrophage activation. **Ann. Rev. Immunol.**, v. 2, p. 283–318, 1984.
- ALESSANDRI, A. L. et al. Resolution of inflammation: Mechanisms and opportunity for drug development. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 139, n. 2, p. 189–212, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.04.006>>.
- ALIVERNINI, S. et al. Distinct synovial tissue macrophage subsets regulate inflammation and remission in rheumatoid arthritis. **Nature Medicine**, v. 26, n. August, p. 1295–1306, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41591-020-0939-8>>.
- ÁLVAREZ-LARIO, B.; MACARRÓN-VICENTE, J. Uric acid and evolution. **Rheumatology**, v. 49, p. 2010–2015, 2010.
- AMARAL, F. A. et al. NLRP3 inflammasome-mediated neutrophil recruitment and hypernociception depend on leukotriene B4 in a murine model of gout. **Arthritis and Rheumatism**, v. 64, n. 2, p. 474–484, 2012.
- AMES, B. N. et al. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: A hypothesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 78, n. 11 II, p. 6858–6862, 1981.
- AMULIC, B. et al. Neutrophil Function : From Mechanisms to Disease. **Annu. Rev. Immunol.** 2012., v. 30, p. 459–489, 2012.
- AN, L. et al. Complement C5a potentiates uric acid crystal-induced IL-1 β production. **Eur. J. Immunol.**, v. 44, n. 12, p. 3669–3679, 2014.
- ANDERSON, C. F.; MOSSER, D. M. Cutting Edge: Biasing Immune Responses by Directing Antigen to Macrophage Fc γ Receptors. **J Immunol**, v. 168, n. 8, p. 3697–3701, 2002.
- ARIEL, A.; SERHAN, C. N. New lives given by cell death : macrophage differentiation following their encounter with apoptotic leukocytes during the resolution of inflammation. **Front Immunol.**, v. 3, n. 4, p. 1–6, 2012.
- ASADULLAH, K.; STERRY, W.; VOLK, H. D. Interleukin-10 therapy - Review of a new approach. **Pharmacological Reviews**, v. 55, n. 2, p. 241–269, 2003.
- BACH, M. H.; SIMKIN, P. A. Uricosuric drugs: The once and future therapy for hyperuricemia? **Current Opinion in Rheumatology**, v. 26, n. 2, p. 169–175, 2014.
- BAIN, C. C. et al. Constant replenishment from circulating monocytes maintains the macrophage pool in the intestine of adult mice. **Nature Immunology**, v. 15, n. 10, p. 929–937, 2014.
- BAIN, C. C.; JENKINS, S. J. The biology of serous cavity macrophages. **Cellular Immunology**, v. 330, n. November 2017, p. 126–135, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2018.01.003>>.
- BARBARA, G. et al. Interleukin 10 gene transfer prevents experimental colitis in rats. **Gut**, v. 46, n. 3, p. 344–349, 2000.
- BARDEN, A. E. et al. Specialised pro-resolving mediators of inflammation in inflammatory arthritis. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 107, p. 24–29, 2016.
- BARDIN, T.; RICHETTE, P. Definition of hyperuricemia and gouty conditions. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 26, n. 2, p. 186–191, 2014.

- BERGERON, M.; OLIVIER, M. Trypanosoma cruzi-mediated IFN-gamma-inducible nitric oxide output in macrophages is regulated by iNOS mRNA stability. **The Journal of Immunology**, v. 177, n. 9, p. 6271–80, 2006.
- BOURNAZOS, S.; GUPTA, A.; RAVETCH, J. V. The role of IgG Fc receptors in antibody- dependent enhancement. **Nature Reviews Immunology**, v. 20, n. October, p. 633–643, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41577-020-00410-0>>.
- BRINKMANN, V. et al. Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. **Science**, v. 303, n. 5663, p. 1532–1535, 2004.
- BROZ, P.; DIXIT, V. M. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. **Nat Rev Immunol**, v. 16, n. july, p. 407–420, 2016.
- BURNS, K.; MARTINON, F. New insights into the mechanism of IL-1beta maturation. **Current opinion in immunology**, v. 15, n. 1, p. 26–30, 2003.
- BURT, H. M.; DUTT, Y. C. Growth of monosodium urate monohydrate crystals : effect of cartilage and synovial fluid components on in vitro growth rates. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 45, p. 858–864, 1986.
- CARLINI, V. et al. The multifaceted nature of IL-10 : regulation , role in immunological homeostasis and its relevance to cancer , COVID-19 and post-COVID conditions. **Front. Immunol.**, v. 14, n. 1161067, p. 1–19, 2023.
- CAVAILLON, J. The historical milestones in the understanding of leukocyte biology initiated by Elie Metchnikoff. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 90, n. September, p. 413–424, 2011.
- CHANDRASEKARAN, P. et al. Regulatory Macrophages Inhibit Alternative Macrophage Activation and Attenuate Pathology Associated with Fibrosis. **The Journal of Immunology**, v. 203, n. 8, p. 2130–2140, 2019.
- CHEN-XU, M. et al. Contemporary Prevalence of Gout and Hyperuricemia in the United States and Decadal Trends: The National Health and Nutrition Examination Survey, 2007–2016. **Arthritis and Rheumatology**, v. 71, n. 6, p. 991–999, 2019.
- CHEN, L.-C.; ASHCROFT, D. M. Risk of myocardial infarction associated with selective COX-2 inhibitors: Meta-analysis of randomised controlled trials. **Pharmacoepidemiology and drug safety**, v. 16, n. 7, p. 762–772, 2007.
- CHEN, T. et al. M2 macrophages in kidney disease: biology, therapies, and perspectives. **Kidney International**, v. 95, n. 4, p. 760–773, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.kint.2018.10.041>>.
- CHEN, Y. H. et al. Spontaneous resolution of acute gouty arthritis is associated with rapid induction of the anti-inflammatory factors TGFβ1, IL-10 and soluble TNF receptors and the intracellular cytokine negative regulators CIS and SOCS3. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 70, n. 9, p. 1655–1663, 2011.
- CHERIAN, P. V.; SCHUMACHER, H. R. Immunochemical and Ultrastructural Characterization of Serum Proteins Associated with Monosodium Urate Crystals (MSU) i n Synovial Fluid Cells from Patients with Gout. **Ultrastructural Pathology**, v. 10, n. 3, p. 209–219, 1986.
- CULEMANN, S. et al. Locally renewing resident synovial macrophages provide a protective barrier for the joint. **Nature**, v. 572, p. 670–675, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41586-019-1471-1>>.
- DALBETH, N. et al. Gout. **Nat Rev Dis Primers**, v. 5, n. 69, p. 1–17, 2019.
- DALBETH, N. et al. Gout. **The Lancet**, v. 397, n. 10287, p. 1843–1855, 2021.

DALBETH, N.; MERRIMAN, T. R.; STAMP, L. K. Gout. **The Lancet Journal**, v. 6736, n. 16, p. 1–14, 2016.

DALBETH, N.; STAMP, L. Hyperuricaemia and gout: Time for a new staging system? **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 73, n. 9, p. 1598–1600, 2014.

DALBY, E. et al. Immune Complex–Driven Generation of Human Macrophages with Anti-Inflammatory and Growth-Promoting Activity. **The Journal of Immunology**, v. 205, n. 1, p. 102–112, 2020.

DANVE, A.; SEHRA, S. T.; NEOGI, T. Role of diet in hyperuricemia and gout. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, v. 35, n. 4, p. 101723, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.berh.2021.101723>>.

DE SCHEPPER, S. et al. Self-Maintaining Gut Macrophages Are Essential for Intestinal Homeostasis. **Cell**, v. 175, n. 2, p. 400–415.e13, 2018.

DEHLIN, M.; JACOBSSON, L.; RODDY, E. Global epidemiology of gout: prevalence, incidence, treatment patterns and risk factors. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 16, n. 7, p. 380–390, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41584-020-0441-1>>.

DINARELLO, C. A. Interleukin-1beta, Interleukin-18, and the Interleukin-1beta Converting Enzyme. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 856, n. 1, p. 1–11, 1998.

DINARELLO, C. A. Immunological and Inflammatory Functions of the Interleukin-1 Family. **Annual Review of Immunology**, v. 27, n. 1, p. 519–550, 2009.

DINARELLO, C. A.; GATTI, S.; BARTFAI, T. Fever : Links with an ancient receptor. **Current Biology**, v. 9, n. 4, p. 147–150, 1999.

DOHERTY, M. et al. Gout : why is this curable disease so seldom cured ? **Ann Rheum Dis**, v. 71, n. 11, p. 1765–1770, 2012.

DOYLE, A. G. et al. Interleukin-13 alters the activation state of murine macrophages in vitro: comparison with interleukin-4 and interferon- γ . **Eur. J. Immunol.**, v. 24, n. 6, p. 1441–1445, 1994.

EDWARDS, J. P. et al. Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 80, n. 6, p. 1298–1307, 2006.

ELLIOTT, M. R.; KOSTER, K. M.; MURPHY, P. S. Efferocytosis signaling in the regulation of macrophage inflammatory responses. **J Immunol.**, v. 198, n. 4, p. 1387–1394, 2017.

EMMERSON, B. T. The management of gout. **New England Journal of Medicine**, v. 334, n. 7, p. 445–451, 1996.

EPELMAN, S. et al. Embryonic and adult-derived resident cardiac macrophages are maintained through distinct mechanisms at steady state and during inflammation. **Immunity**, v. 40, n. 1, p. 91–104, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2013.11.019>>.

FADOK, V. A. et al. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF- β , PGE2, and PAF. **J Clin Invest.**, v. 101, n. 4, p. 890–898, 1998.

FAIRES, J. S.; MCCARTY, D. J. Acute arthritis in man and dog after intrasynovial injection of sodium urate crystals. **The Lancet Journal**, p. 682–685, 1962.

FEIG, D. I.; SOLETSKY, B.; JOHNSON, R. J. Effect of Allopurinol on Blood Pressure of Adolescents With Newly Diagnosed Essential Hypertension: A Randomized Trial. **JAMA**, v. 300, n. 8, p. 924–932, 2008.

FIORENTINO, D. F.; BOND, M. W.; MOSMANN, T. R. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2

clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. **Journal of Experimental Medicine**, v. 170, n. 6, p. 2081–95, 1989. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2189521&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

FITZGERALD, J. D. et al. 2020 American College of Rheumatology Guideline for the Management of Gout. **Arthritis Care & Research**, v. 72, n. 6, p. 744–760, 2020.

FLEMING, B. D. et al. The generation of macrophages with anti-inflammatory activity in the absence of STAT6 signaling. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 98, n. 3, p. 395–407, 2015.

FLEMING, B. D.; MOSSER, D. M. Regulatory macrophages: Setting the threshold for therapy. **European Journal of Immunology**, v. 41, n. 9, p. 2498–2502, 2011.

FLORES, N. M. et al. The economic burden of uncontrolled gout : how controlling gout reduces cost. **Journal of Medical Economics**, v. 22, n. 1, p. 1–6, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/13696998.2018.1532904>>.

GABAY, C.; LAMACCHIA, C.; PALMER, G. IL-1 pathways in inflammation and human diseases. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 6, n. 4, p. 232–241, 2010.

GALLO, P.; GONÇALVES, R.; MOSSER, D. M. The influence of IgG Density and Macrophage Fc (gamma) Receptor Cross-linking on Phagocytosis and IL-10 Production. **Immunol Lett**, v. 133, n. 2, p. 70–77, 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>>.

GALOZZI, P. et al. Autoinflammatory Features in Gouty Arthritis. **Journal of Clinical Medicine**, v. 10, n. 1880, p. 1–15, 2021.

GALVÃO, I. et al. Annexin A1 promotes timely resolution of inflammation in murine gout. **European Journal of Immunology**, v. 47, n. 3, p. 585–596, 2017.

GANSON, N. J. et al. Control of hyperuricemia in subjects with refractory gout, and induction of antibody against poly(ethylene glycol) (PEG), in a phase I trial of subcutaneous PEGylated urate oxidase. **Arthritis Research and Therapy**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2006.

GERARD, C. et al. Interleukin 10 reduces the release of tumor necrosis factor and prevents lethality in experimental endotoxemia. **J. Exp. Med**, v. 177, n. February, p. 547–550, 1993.

GERBER, J. S.; MOSSER, D. M. Reversing Lipopolysaccharide Toxicity by Ligating the Macrophage Fcγ Receptors. **The Journal of Immunology**, v. 166, n. 11, p. 6861–6868, 2001.

GIAMARELLOS-BOURBOULIS, E. J. et al. Crystals of monosodium urate monohydrate enhance lipopolysaccharide-induced release of interleukin 1 beta by mononuclear cells through a caspase 1-mediated process. **Ann Rheum Dis.**, v. 68, n. 2, p. 273–278, 2009.

GINHOUX, F. et al. New insights into the multidimensional concept of macrophage ontogeny, activation and function. **Nature Immunology**, v. 17, n. 1, p. 34–40, 2016.

GINHOUX, F.; GUILLIAMS, M. Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. **Immunity**, v. 44, n. 3, p. 439–449, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.024>>.

GINHOUX, F.; JUNG, S. Monocytes and macrophages: Developmental pathways and tissue homeostasis. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 6, p. 392–404, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nri3671>>.

GONÇALVES, R. et al. Isolation and Culture of Bone Marrow-Derived Macrophages from Mice. **Journal of Visualized Experiments**, n. 196, p. 1–12, 2023.

GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 1, p. 23–

35, 2003.

GORDON, S.; TAYLOR, P. R. Monocyte and macrophage heterogeneity. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, n. 12, p. 953–964, 2005.

GREENHILL, C. J. et al. Interleukin-10 regulates the inflammasome-driven augmentation of inflammatory arthritis and joint destruction. **Arthritis Research and Therapy**, v. 16, n. 4, p. 1–10, 2014.

HAK, A. E. et al. Menopause, postmenopausal hormone use and risk of incident gout. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 69, p. 1305–1309, 2010.

HAMIDZADEH, K. et al. Macrophages and the Recovery from Acute and Chronic Inflammation. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 79, p. 567–92, 2017.

HAMIDZADEH, K.; MOSSER, D. M. Purinergic Signaling to Terminate TLR Responses in Macrophages. **Front. Immunol.**, v. 7, n. 74, p. 1–6, 2016.

HASHIMOTO, D. et al. Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. **Immunity**, v. 38, n. 4, p. 792–804, 2013.

HASKÓ, G.; CRONSTEIN, B. N. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. **Trends in Immunology**, v. 25, n. 1, p. 33–39, 2004.

HE, W. et al. Gasdermin D is an executor of pyroptosis and required for interleukin-1 β secretion. **Cell Research**, v. 25, n. 12, p. 1–14, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/cr.2015.139>>.

HESSE, M. et al. Differential Regulation of Nitric Oxide Synthase-2 and Arginase-1 by Type 1/Type 2 Cytokines In Vivo: Granulomatous Pathology Is Shaped by the Pattern of L-Arginine Metabolism. **The Journal of Immunology**, v. 167, n. 11, p. 6533–6544, 2001.

HOEFFEL, G.; GINHOUX, F. Fetal monocytes and the origins of tissue-resident macrophages. **Cellular Immunology**, v. 330, n. December 2017, p. 5–15, 2018.

HORNUNG, V. et al. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. **Nature Immunology**, v. 9, n. 8, p. 847–856, 2008.

HU, X.; IVASHKIV, L. B. Cross-regulation of Signaling Pathways by Interferon- γ : Implications for Immune Responses and Autoimmune Diseases. **Immunity**, v. 31, n. 4, p. 539–550, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2009.09.002>>.

HULSMANS, M. et al. Macrophages Facilitate Electrical Conduction in the Heart. **Cell**, v. 169, n. 3, p. 510–522.e20, 2017.

JANCZY, J. et al. Immune complexes inhibit IL-1 secretion and inflammasome activation. **J Immunol**, v. 193, n. 10, p. 5190–5198, 2014.

JENKINS, S. J. et al. Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of TH2 inflammation. **Science**, v. 332, p. 1284–1288, 2011.

JOOSTEN, L. 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 Rheum.**, v. 62, n. 11, p. 3237–3248, 2010.

KASHFI, K.; KANNIKAL, J.; NATH, N. Macrophage Reprogramming and Cancer Therapeutics: Role of iNOS-Derived NO. **Cells**, v. 10, n. 3194, p. 1–22, 2021.

KIM, K. Y. et al. A Literature Review of the Epidemiology and Treatment of Acute Gout. **CLINICAL THERAPEUTICS**, v. 25, p. 1593–1617, 2003.

- KINGSBURY, S. R.; CONAGHAN, P. G.; MCDERMOTT, M. F. The role of the NLRP3 inflammasome in gout. **Journal of Inflammation Research**, v. 4, p. 39–49, 2011.
- KIPPEN, I. et al. Factors affecting urate solubility in vitro. **Ann. rheum. Dis.**, v. 33, p. 313–317, 1974.
- KLAVER, D.; THURNHER, M. Control of Macrophage Inflammation by P2Y Purinergic Receptors. **Cells**, v. 10, n. 1098, p. 1–21, 2021.
- KOSCSÓ, B. et al. Adenosine Augments IL-10 Production by Microglial Cells Through an A2B Adenosine Receptor-Mediated Process. **J Immunol.**, v. 188, n. 1, p. 445–453, 2012.
- KREIDER, T. et al. Alternatively activated macrophages in helminth infections. **Current Opinion in Immunology**, v. 19, n. 4, p. 448–453, 2007.
- KUO, C. F. et al. Global epidemiology of gout: Prevalence, incidence and risk factors. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 11, n. 11, p. 649–662, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrrheum.2015.91>>.
- KUROWSKA-STOLARSKA, M.; ALIVERNINI, S. Synovial tissue macrophages: friend or foe? **RMD Open**, v. 3, n. 2, p. e000527, 2017.
- KUROWSKA-STOLARSKA, M.; ALIVERNINI, S. Synovial tissue macrophages in joint homeostasis, rheumatoid arthritis and disease remission. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 18, n. July, p. 384–397, 2022.
- KUTZING, M. K.; FIRESTEIN, B. L. Altered Uric Acid Levels and Disease States. **THE JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS**, v. 324, n. 1, p. 1–7, 2008.
- LANDIS, R. C. et al. Safe disposal of inflammatory monosodium urate monohydrate crystals by differentiated macrophages. **Arthritis and Rheumatism**, v. 46, n. 11, p. 3026–3033, 2002.
- LATZ, E.; XIAO, T. S.; STUTZ, A. Activation and regulation of the inflammasomes. **NATURE REVIEWS | IMMUNOLOGY**, v. 13, p. 397–411, 2013.
- LEE, M. H. H. et al. A benefit-risk assessment of benzbromarone in the treatment of gout: Was its withdrawal from the market in the best interest of patients? **Drug Safety**, v. 31, n. 8, p. 643–665, 2008.
- LI, X.; GAO, J.; TAO, J. Purinergic Signaling in the Regulation of Gout Flare and Resolution. **Front. Immunol.**, v. 12, n. December, p. 1–10, 2021.
- LI, Y. et al. Neutrophil extracellular traps formation and aggregation orchestrate induction and resolution of sterile crystal-mediated inflammation. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. JUL, p. 1–6, 2018.
- LINDEN, J.; CEKIC, C. Regulation of Lymphocyte Function by Adenosine. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v. 32, n. 9, p. 2097–2103, 2012.
- LIU-BRYAN, R. et al. Innate immunity conferred by Toll-like receptors 2 and 4 and myeloid differentiation factor 88 expression is pivotal to monosodium urate monohydrate crystal-induced inflammation. **Arthritis and Rheumatism**, v. 52, n. 9, p. 2936–2946, 2005.
- LIU, L. et al. Interleukin 37 limits monosodium urate crystal-induced innate immune responses in human and murine models of gout. **Arthritis Research & Therapy**, v. 18, n. 268, p. 1–14, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s13075-016-1167-y>>.
- LIU, L. et al. Recent Insights Into the Role of Macrophages in Acute Gout. **Front. Immunol.**, v. 13, n. 955806, p. 1–7, 2022.
- LOEB, J. N. The influence of temperature on the solubility of monosodium urate. **Arthritis & Rheumatism**, v. 15, n. 2, p. 189–192, 1972.

- LOKE, P. et al. IL-4 dependent alternatively-activated macrophages have a distinctive in vivo gene expression phenotype. **BMC Immunology**, v. 3, n. 7, p. 1–11, 2002.
- LOPES, T. C. M. et al. High-Density-Immune-Complex Regulatory Macrophages Promote Recovery of Experimental Colitis in Mice. **Inflammation**, 2021.
- LOPES, T. C. M.; MOSSER, D. M.; GONÇALVES, R. Macrophage polarization in intestinal inflammation and gut homeostasis. **Inflammation Research**, v. 69, n. 12, p. 1163–1172, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00011-020-01398-y>>.
- LUCAS, M. et al. ERK Activation Following Macrophage FcγR Ligation Leads to Chromatin Modifications at the IL-10 Locus. **J Immunol**, v. 175, n. 1, p. 469–477, 2005.
- MACKANESS, G. B. Cellular resistance to infection. **J Exp Med**, v. 116, p. 381–406, 1962. Disponível em: <<https://sci-hub.tw/10.1002/iroh.19620470121>>.
- MAIMON, N. et al. The pro-apoptotic ARTS protein induces neutrophil apoptosis, efferocytosis, and macrophage reprogramming to promote resolution of inflammation. **Apoptosis**, v. 25, n. 7, p. 558–573, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10495-020-01615-3>>.
- MAIUOLO, J. et al. Regulation of uric acid metabolism and excretion. **International Journal of Cardiology**, v. 213, p. 8–14, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijcard.2015.08.109>>.
- MANGAN, M. S. J. et al. Targeting the NLRP3 inflammasome in inflammatory diseases. **Nat Rev Drug Discov**, v. 17, n. August, p. 588–606, 2018.
- MANTOVANI, A. et al. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. **Trends in Immunology**, v. 25, n. 12, p. 677–686, 2004.
- MARTILLO, M. A.; NAZZAL, L.; CRITTENDEN, D. B. The Crystallization of Monosodium Urate. **Curr Rheumatol Rep**, v. 16, n. 400, p. 1–8, 2014.
- MARTIN, W. J. et al. Monosodium urate monohydrate crystal-recruited noninflammatory monocytes differentiate into M1-like proinflammatory macrophages in a peritoneal murine model of gout. **Arthritis and Rheumatism**, v. 63, n. 5, p. 1322–1332, 2011.
- MARTIN, W. J.; WALTON, M.; HARPER, J. Resident macrophages initiating and driving inflammation in a monosodium urate monohydrate crystal-induced murine peritoneal model of acute gout. **Arthritis and Rheumatism**, v. 60, n. 1, p. 281–289, 2009.
- MARTINEZ, F. O.; GORDON, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: Time for reassessment. **F1000Prime Reports**, v. 6, n. 13, p. 1–13, 2014.
- MARTINON, F. et al. The Inflammasome: A Molecular Platform Triggering Activation of Inflammatory Caspases and Processing of proIL-1β. **Molecular Cell**, v. 10, p. 417–426, 2002.
- MARTINON, F. et al. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. **Nature**, v. 440, n. 7081, p. 237–241, 2006.
- MARTINON, F.; GLIMCHER, L. H. Gout: new insights into an old disease. **The journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 8, p. 2073–2075, 2006.
- MCCARTY, D. J. A historical note: leeuwenhoek's description of crystals from a gouty tophus. **Arthritis & Rheumatism**, v. 13, n. 4, p. 414–418, 1970.
- MCCARTY, D. J.; HOLLANDER, J. L. Identification of Urate Crystals in Gouty Synovial Fluid. **Ann Intern Med**, v. 54, n. 3, p. 452–460, 1961.
- MCGILL, N. W.; DIEPPE, P. A. Evidence for a promoter of urate crystal formation in gouty synovial fluid. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 50, p. 558–561, 1991.

MEAD, T.; ARABINDOO, K.; SMITH, B. Managing gout: There's more we can do. **Journal of Family Practice**, v. 63, n. 12, p. 707–713, 2014.

MILLS, C. D. et al. M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 12, p. 6166–6173, 2000.

MITROULIS, I. et al. Neutrophil extracellular trap formation is associated with IL-1 β and autophagy-related signaling in gout. **PLoS ONE**, v. 6, n. 12, p. 1–10, 2011.

MITROULIS, I.; KAMBAS, K.; RITIS, K. Neutrophils, IL-1 β , and gout: Is there a link? **Seminars in Immunopathology**, v. 35, n. 4, p. 501–512, 2013.

MOON, B. et al. After cell death : the molecular machinery of efferocytosis. **Exp Mol Med**, v. 55, n. June, p. 1644–1651, 2023.

MOSSER, D. M. The many faces of macrophage activation. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 73, n. 2, p. 209–212, 2003.

MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 12, p. 958–969, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nri2448>>.

MOSSER, D. M.; GONÇALVES, R. Activation of Murine Macrophages. **Current Protocols in Immunology**, v. 111, n. 1, p. 14.2.1-14.2.10, 2015.

MOSSER, D. M.; HAMIDZADEH, K.; GONCALVES, R. Macrophages and the maintenance of homeostasis. **Cellular and Molecular Immunology**, n. June, p. 1–9, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41423-020-00541-3>>.

MOSSER, D. M.; ZHANG, X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. **Immunological Reviews**, v. 226, n. 23, p. 205–218, 2008.

MÜLLER, E. et al. Both Type I and Type II Interferons Can Activate Antitumor M1 Macrophages When Combined With TLR Stimulation. **Front. Immunol.**, v. 9, n. 2520, p. 1–16, 2018.

MURAKAMI, Y. et al. Antiinflammatory effect of retrovirally transfected interleukin-10 on monosodium urate monohydrate crystal-induced acute inflammation in murine air pouches. **Arthritis and Rheumatism**, v. 46, n. 9, p. 2504–2513, 2002.

MURRAY, P. J. et al. Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. **Immunity**, v. 41, n. 1, p. 14–20, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.008>>.

NATHAN, C. Metchnikoff's legacy in 2008. **Nature Immunology**, v. 9, n. 7, p. 695–698, 2008.

NATHAN, C. F. et al. Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. **J Exp Med**, v. 158, n. 3, p. 670–689, 1983.

NUKI, G.; SIMKIN, P. A. A concise history of gout and hyperuricemia and their treatment. **Arthritis Research and Therapy**, v. 8, n. SUPPL. 1, p. 1–5, 2006.

ORECCHIONI, M. et al. Macrophage Polarization : Different Gene Signatures in M1 (LPS +) vs . Classically and M2 (LPS -) vs . Alternatively Activated Macrophages. **Front. Immunol.**, v. 10, n. 1084, p. 1–14, 2019.

OUYANG, W. et al. Regulation and Functions of the IL-10 Family of Cytokines in Inflammation and Disease. **Annual Review of Immunology**, v. 29, n. 1, p. 71–109, 2011.

OUYANG, W.; GARRA, A. O. IL-10 Family Cytokines IL-10 and IL-22 : from Basic Science to Clinical

Translation. **Immunity**, v. 50, n. 4, p. 871–891, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.020>>.

PENNLIN, K.; ROQUE-GAFFNEY, E.; MONAHAN, M. **Recombinant human IL-10 prevents the onset of diabetes.pdf***Clin Immunol Immunopathol*, 1994. .

PERSSON, S. et al. Interleukin-10 suppresses the development of collagen type II-induced arthritis and ameliorates sustained arthritis in rats. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 44, n. 6, p. 607–614, 1996.

PHELPS, P.; MCCARTY, D. J. Suppressive effects of indomethacin on crystal-induced inflammation in canine joints and on neutrophilic motility in vitro. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 158, n. 3, p. 546–53, 1967.

PILLINGER, M. H.; GOLDFARB, D. S.; KEENAN, R. T. Gout and its comorbidities. **Bulletin of the NYU Hospital for Joint Diseases**, v. 68, n. 3, p. 199–203, 2010.

POPA-NITA, O.; NACCACHE, P. H. Crystal-induced neutrophil activation. **Immunology and Cell Biology**, v. 88, n. 1, p. 32–40, 2010.

QASEEM, A. et al. Diagnosis of acute gout: a clinical practice guideline from the American College of Physicians. **Ann. Intern. Med**, v. 166, p. 52–57, 2017.

QIAO, Y. et al. Synergistic Activation of Inflammatory Cytokine Genes by Interferon- γ -Induced Chromatin Remodeling and Toll-like Receptor Signaling. **Immunity**, v. 39, n. 3, p. 454–469, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2013.08.009>>.

RAES, G. et al. FIZZ1 and Ym as Tools to Discriminate between Differentially Activated Macrophages. **Developmental Immunology**, v. 9, n. 3, p. 151–159, 2002.

RAGAB, G.; ELSHAHALY, M.; BARDIN, T. Gout: An old disease in new perspective – A review. **Journal of Advanced Research**, v. 8, n. 5, p. 495–511, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jare.2017.04.008>>.

REES, F.; HUI, M.; DOHERTY, M. Optimizing current treatment of gout. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 10, n. 5, p. 271–283, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrrheum.2014.32>>.

RENAUD, S. J.; GRAHAM, C. H. The role of macrophages in utero-placental interactions during normal and pathological pregnancy. **Immunological Investigations**, v. 37, n. 5–6, p. 535–564, 2008.

RICHETTE, P. et al. 2016 updated EULAR evidence-based recommendations for the management of gout. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 76, n. 1, p. 29–42, 2017.

RICHETTE, P. et al. 2018 updated European League against Rheumatism evidence-based recommendations for the diagnosis of gout. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 79, n. 1, p. 31–38, 2019.

ROBINSON, P. C.; HORSBURGH, S. Gout: Joints and beyond, epidemiology, clinical features, treatment and co-morbidities. **Maturitas**, v. 78, n. 4, p. 245–251, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.maturitas.2014.05.001>>.

ROCK, K. L. et al. Natural endogenous adjuvants. **Springer Seminars in Immunopathology**, v. 26, n. 3, p. 231–246, 2005.

ROCK, K. L.; KATAOKA, H.; LAI, J. J. Uric acid as a danger signal in gout and its comorbidities. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 9, n. 1, p. 13–23, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrrheum.2012.143>>.

ROTT, O.; FLEISCHER, B.; CASH, E. Interleukin-10 prevents experimental allergic encephalomyelitis

in rats. **European Journal of Immunology**, v. 24, n. 6, p. 1434–1440, 1994.

SCANU, A. et al. Cytokine levels in human synovial fluid during the different stages of acute gout : role of transforming growth factor β 1 in the resolution phase. **Ann Rheum Dis**, v. 71, p. 621–625, 2012.

SCHAUER, C. et al. Aggregated neutrophil extracellular traps limit inflammation by degrading cytokines and chemokines. **Nature Medicine**, v. 20, n. 5, p. 511–517, 2014.

SCHEEPERS, L. E. et al. Medication adherence among patients with gout : A systematic review and meta-analysis. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 47, n. 5, p. 689–702, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.semarthrit.2017.09.007>>.

SCHETT, G. et al. Why does the gout attack stop? A roadmap for the immune pathogenesis of gout. **RMD Open**, v. 1, n. Suppl 1, p. 1–5, 2015.

SCHIF-ZUCK, S. et al. Saturated-efferocytosis generates pro-resolving CD11b low macrophages : Modulation by resolvins and glucocorticoids. **Eur. J. Immunol**, v. 41, p. 366–379, 2011.

SCHLESINGER, N. et al. Local ice therapy during bouts of acute gouty arthritis. **Journal of Rheumatology**, v. 29, n. 2, p. 331–334, 2002.

SCHMID-BURGK, J. L. et al. A Genome-wide CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) Screen Identifies NEK7 as an Essential Component of NLRP3 Activation Inflammasome. **THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY**, v. 291, n. 1, p. 103–109, 2016.

SCHORN, C. et al. Bonding the foe – NETting neutrophils immobilize the pro-inflammatory monosodium urate crystals. **Front Immunol**, v. 3, p. 376, 2012.

SCOTT, G. S.; HOOPER, D. C. The role of uric acid in protection against peroxynitrite-mediated pathology. **Medical Hypotheses**, v. 56, n. 1, p. 95–100, 2001.

SEEGMILLER, J. E.; HOWELL, R. R.; MALAWISTA, S. E. The inflammatory reaction to sodium urate. **Jama**, v. 180, p. 469–475, 1962.

SHARIF, H. et al. Structural mechanism for NEK7-licensed activation of NLRP3 inflammasome. **Nature**, v. 570, p. 338–343, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41586-019-1295-z>>.

SHI, J. et al. Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS. **Nature**, v. 514, p. 187–192, 2014.

SHI, J. et al. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. **Nature**, v. 526, p. 660–665, 2015.

SHI, Y.; EVANS, J. E.; ROCK, K. L. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. **Nature**, v. 425, n. 6957, p. 516–521, 2003.

SHI, Y.; MUCSI, A. D.; NG, G. Monosodium urate crystals in inflammation and immunity. **Immunological Reviews**, v. 233, n. 1, p. 203–217, 2010.

SHIELDS, G. E.; BEARD, S. M. A Systematic Review of the Economic and Humanistic Burden of Gout. **PharmacoEconomics**, v. 33, n. 10, p. 1029–1047, 2015.

SICA, A. et al. Autocrine Production of IL-10 Mediates Defective IL-12 Production and NF- κ B Activation in Tumor-Associated Macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 2, p. 762–767, 2000.

SIL, P. et al. Macrophage-derived IL-1 β enhances monosodium urate crystal-triggered NET formation. **Inflammation Research**, v. 66, n. 3, p. 227–237, 2017.

SINGH, J. A. Quality of life and quality of care for patients with gout. **Current Rheumatology Reports**, v. 11, n. 2, p. 154–160, 2009.

SINGH, J. A. Are the days of missed or delayed diagnosis of gout over? **Nat Rev Rheumatol**, v. 15, p. 578–580, 2019.

SINGH, J. A.; GAFFO, A. Gout epidemiology and comorbidities. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 50, n. 3, p. S11–S16, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.semarthrit.2020.04.008>>.

SMITH, S. J.; MOHUN, T. J. Early cardiac morphogenesis defects caused by loss of embryonic macrophage function in *Xenopus*. **Mechanisms of Development**, v. 128, n. 5–6, p. 303–315, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mod.2011.04.002>>.

SO, A. K.; MARTINON, F. Inflammation in gout: Mechanisms and therapeutic targets. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 13, n. 11, p. 639–647, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrrheum.2017.155>>.

SPENCER, K.; CARR, A.; DOHERTY, M. Patient and provider barriers to effective management of gout in general practice: a qualitative study. **Ann Rheum Dis**, v. 71, p. 1490–1495, 2012.

STAMP, L. K.; CHAPMAN, P. T. Gout and its comorbidities: Implications for therapy. **Rheumatology (Oxford)**, v. 52, n. 1, p. 34–44, 2012.

STEIGER, S.; HARPER, J. L. Mechanisms of spontaneous resolution of acute gouty inflammation. **Current Rheumatology Reports**, v. 16, n. 1, 2013a.

STEIGER, S.; HARPER, J. L. Neutrophil cannibalism triggers transforming growth factor β 1 production and self regulation of neutrophil inflammatory function in monosodium urate monohydrate crystal-induced inflammation in mice. **Arthritis Rheum.**, v. 65, n. 3, p. 815–823, 2013b.

STEIN, M. et al. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: A marker of alternative immunologic macrophage activation. **Journal of Experimental Medicine**, v. 176, n. 1, p. 287–292, 1992.

SUTTERWALA, F. S. et al. Reversal of Proinflammatory Responses by Ligating the Macrophage Fc γ Receptor Type I. **Journal of Experimental Medicine**, v. 188, n. 1, p. 217–222, 1998.

SWANSON, K. V.; DENG, M.; TING, J. P.-Y. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. **Nature Reviews Immunology**, v. 19, n. August, p. 477–489, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41577-019-0165-0>>.

TAMOUTOUNOUR, S. et al. Origins and functional specialization of macrophages and of conventional and monocyte-derived dendritic cells in mouse skin. **Immunity**, v. 39, n. 5, p. 925–938, 2013.

TANAKA, Y. et al. Effect of IL-10 on collagen-induced arthritis in mice. **Inflammation Research**, v. 45, n. 6, p. 283–288, 1996.

TAUBER, A. I. Metchnikoff and the phagocytosis theory. **NATURE REVIEWS | MOLECULAR CELL BIOLOGY**, v. 4, n. November, p. 897–901, 2003.

TERKELTAUB, R. et al. Lipoproteins containing apoprotein B are a major regulator of neutrophil responses to monosodium urate crystals. **Journal of Clinical Investigation**, v. 73, n. 6, p. 1719–1730, 1984.

TERKELTAUB, R. et al. The murine homolog of the interleukin-8 receptor CXCR-2 is essential for the occurrence of neutrophilic inflammation in the air pouch model of acute urate crystal-induced gouty synovitis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 41, n. 5, p. 900–909, 1998.

TERKELTAUB, R. A. et al. Apolipoprotein (Apo) E inhibits the capacity of monosodium urate crystals

to stimulate neutrophils. Characterization of intraarticular Apo E and demonstration of Apo E binding to urate crystals in vivo. **Journal of Clinical Investigation**, v. 87, n. 1, p. 20–26, 1991.

TERRI, M. et al. Mechanisms of Peritoneal Fibrosis : Focus on Immune Cells – Peritoneal Stroma Interactions. **Front. Immunol.**, v. 12, n. March, p. 1–17, 2021.

URWANISCH, L.; LUCIANO, M.; HOREJS-HOECK, J. The NLRP3 Inflammasome and Its Role in the Pathogenicity of Leukemia. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 3, p. 1271, 2021.

VAN FURTH, R. et al. The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 46, n. 6, p. 845–852, 1972.

VAN LAETHEM, J. L. et al. Interleukin 10 prevents necrosis in murine experimental acute pancreatitis. **Gastroenterology**, v. 108, n. 6, p. 1917–1922, 1995.

VEGA-PÉREZ, A. et al. Resident macrophage-dependent immune cell scaffolds drive anti-bacterial defense in the peritoneal cavity. **Immunity**, v. 54, p. 2578–2594, 2021.

VIOLA, A. et al. The Metabolic Signature of Macrophage Responses. **Front. Immunol.**, v. 10, n. 1462, p. 1–16, 2019.

WALLACE, S. L. et al. Preliminary criteria for the classification of the acute arthritis of primary gout. **Arthritis & Rheumatism**, v. 20, n. 3, p. 895–900, 1977.

WANG, L. et al. M2b macrophage polarization and its roles in diseases. **J Leukoc Biol.**, v. 106, n. October 2018, p. 345–358, 2019a.

WANG, X. et al. Targeting IL-10 Family Cytokines for the Treatment of Human Diseases. **Cold Spring Harb Perspect Biol.**, v. 11, n. 2, p. 1–30, 2019b.

WATANABE, S. et al. Uric acid, hominoid evolution, and the pathogenesis of salt-sensitivity. **Hypertension**, v. 40, n. 3, p. 355–360, 2002.

WEI, H.; WANG, B.; LI, B. IL-10 and IL-22 in Mucosal Immunity : Driving Protection and Pathology. **Front. Immunol.**, v. 11, n. June, p. 1–11, 2020.

WEISS, S. J. Tissue destruction by neutrophils. **N Engl J Med**, v. 320, n. 6, p. 365–76, 1989.

WERTHEIMER, A.; MORLOCK, R.; BECKER, M. A. A revised estimate of the burden of illness of gout. **Current Therapeutic Research - Clinical and Experimental**, v. 75, p. 1–4, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.curtheres.2013.04.003>>.

WILCOX, W. R.; KHALAF, A. L. I. A. Nucleation of monosodium urate crystals. **Ann. rheum. Dis.**, v. 34, p. 332–340, 1975.

WU, M. et al. Gout : a disease involved with complicated immunoinflammatory responses : a narrative review. **Clinical Rheumatology**, v. 39, p. 2849–2859, 2020.

YAGNIK, D. R. et al. Noninflammatory phagocytosis of monosodium urate monohydrate crystals by mouse macrophages: Implications for the control of joint inflammation in gout. **Arthritis and Rheumatism**, v. 43, n. 8, p. 1779–1789, 2000.

YAGNIK, D. R. et al. Macrophage release of transforming growth factor β 1 during resolution of monosodium urate monohydrate crystal-induced inflammation. **Arthritis and Rheumatism**, v. 50, n. 7, p. 2273–2280, 2004.

YAMAMOTO, M. et al. Role of Adaptor TRIF in the MyD88-Independent Toll-Like Receptor Signaling Pathway. **Science**, v. 301, n. 5633, p. 640–643, 2003.

YONA, S.; GORDON, S. From the reticuloendothelial to mononuclear phagocyte system – the unaccounted years. **Front. Immunol**, v. 6, n. 328, p. 1–7, 2015.

ZANIN, R. F. et al. Differential Macrophage Activation Alters the Expression Profile of NTPDase and Ecto-5'9-Nucleotidase. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, 2012.

ZHANG, T. et al. Profile of serum cytokine concentrations in patients with gouty arthritis. **J Int Med Res.**, v. 49, n. 11, p. 1–7, 2021.

ZHANG, W. et al. EULAR evidence based recommendations for gout. Part I: Diagnosis. Report of a task force of the standing committee for international clinical studies including therapeutics (ESCSIT). **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 65, n. 10, p. 1301–1311, 2006.

ZHANG, X.; EDWARDS, J. P.; MOSSER, D. M. Dynamic and Transient Remodeling of the Macrophage IL-10 Promoter during Transcription. **J Immunol**, v. 177, n. 2, p. 1282–1288, 2006.

ZHANG, X.; MOSSER, D. M. Macrophage activation by endogenous danger signals. **Journal of Pathology**, v. 214, p. 161–178, 2008.

ZHANG, Y. et al. Gout and Diet: A Comprehensive Review of Mechanisms and Management. **Nutrients**, v. 14, n. 3525, p. 1–22, 2022.


ZHAO, N. et al. Recent advances in the NEK7-licensed NLRP3 in inflammasome activation : Mechanisms , role in diseases and related inhibitors. **Journal of Autoimmunity journal**, v. 113, n. July, p. 102515, 2020.

ZHENG, D.; LIWINSKI, T.; ELINAV, E. Inflammasome activation and regulation: toward a better understanding of complex mechanisms. **Cell Discovery**, v. 6, n. 36, p. 1–22, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41421-020-0167-x>>.

ZHENG, S. C. et al. Role of the NLRP3 inflammasome in the transient release of IL-1 β induced by monosodium urate crystals in human fibroblast-like synoviocytes. **Journal of Inflammation (United Kingdom)**, v. 12, n. 1, p. 4–12, 2015.

ZOBBE, K. et al. Secular trends in the incidence and prevalence of gout in Denmark from 1995 to 2015: a nationwide register-based study. n. December 2018, p. 836–839, 2019.

ANEXOS



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

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

Protocolo CEUA: 330/2019
Título do projeto: ESTUDO DE UMA TERAPIA PARA ARTRITE GOTOSA NA FASE AGUDA ATRAVÉS DA REPROGRAMAÇÃO DE MACRÓFAGOS
Finalidade: Pesquisa
Pesquisador responsável: Ricardo Goncalves
Unidade: Instituto de Ciências Biológicas
Departamento: Departamento de Patologia

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

Aprovado na reunião do dia 10/02/2020. Validade: 10/02/2020 à 09/02/2025

Belo Horizonte, 11/02/2020.

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@proq.ufmg.br