

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

NATHÁLIA VIEIRA BATISTA

Participação das moléculas pentraxina 3 e
microRNA-135b na inflamação articular induzida
por cristais de ácido úrico

Belo Horizonte

2017

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

NATHÁLIA VIEIRA BATISTA

Participação das moléculas pentraxina 3 e microRNA-135b na inflamação articular induzida por cristais de ácido úrico

Tese apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Bioquímica e Imunologia do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para obtenção do título de Doutor em Imunologia.

Orientadores: Prof. Dr. Mauro Martins Teixeira e
Prof. Dr. Flávio Almeida Amaral

Belo Horizonte

2017

“Se as coisas são inatingíveis...

ora!

Não é motivo para não querê-las...

Que tristes os caminhos, se não fora

A presença das estrelas.”

Mário Quintana

Agradecimentos

Ao meu orientador, Dr. Mauro Martins Teixeira, pela confiança e oportunidade de participar do seu grupo de pesquisa. Pelo exemplo de pesquisador e pelos incentivos.

Ao meu orientador, Dr. Flávio Almeida Amaral, pela confiança, pela dedicação, pelo apoio, conselhos e entusiasmo.

Aos meus dois orientadores, obrigada pelas discussões que contribuíram bastante para meu crescimento científico ao longo desses anos de pesquisa. Obrigada por fazerem parte da minha formação!

Aos meus orientadores e colaboradores do Doutorado Sanduíche, Dr. Massimo Locati e Dr. Cecilia Garlanda (do Istituto Clinico Humanitas – Milão, Itália), pela confiança, apoio e pela grande oportunidade.

Aos professores que aceitaram participar da banca, que com certeza irão contribuir muito com as discussões.

Aos professores do grupo Imunofarmacologia pelo companheirismo e apoio.

Aos amigos e colegas da “família” Imunofar, pela convivência e troca de experiências. Pela companhia nos cafés, pelos caretas, pelos congressos e momentos de descontração. Em especial aos amigos do Laboratório de Imunofarmacologia: Aninha, Adriano, Carols, Bruno, Bráulio, Daiane, Calango, Flávia, Bela, Ju, Lívia, Lu, Marina, Beca, Baiano, Rosália, Rodrigo IC, Rodrigo e Vivis. Também aos ex-alunos Elisão e Pedrelas.

Aos amigos e colegas do Istituto Clinico Humanitas com quem aprendi muito e vivenciei diversas experiências, principalmente à Naths Grazia Sukubo e Marialuisa Barbagallo pela ajuda nos experimentos.

À Frank e Ilma, por serem tão solícitas e por fazerem o laboratório funcionar.

Aos técnicos bioteristas pelos cuidados dedicados aos animais de laboratório utilizados nesse estudo.

À Tânia, ao Orlando e ao demais secretários do Departamento de Bioquímica e Imunologia pela valiosa ajuda com os aspectos burocráticos da vida acadêmica.

Ao programa de pós-graduação em Bioquímica e Imunologia e à CAPES, CNPq e Fapemig pelo suporte financeiro.

Aos meus amigos da Biologia (família Deboacea) e ao Felipe pela amizade, carinho e apoio em meio à complexidade e desespero da vida acadêmica.

Especialmente aos meus pais, Vanda e Gilberto e ao meu irmão Thales, pelo amor e incentivo. Obrigada pelo apoio de sempre!

Lista de abreviaturas e siglas

°C: graus Celcius

µg: micrograma

µL: microlitro

ANOVA: análise de variância.

ASC: “*apoptosis-associated Speck-like protein containing CARD*”

BSA: soro albumina bovina

CARD: “*Caspase-Associated Recruitment domain*”

C57/BL6: linhagem de camundongos

CETEA: Comitê de Ética em Experimentação Animal

cDNA: DNA complementar

cm: centímetro

CXCL1 – C-X-C *chemokine ligand* 1, quimiocina C-X-C ligante 1

dNTP: desoxirribonucleotídeos fosfatados

DNA: ácido desoxirribonucleico

ELISA: “*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*” – Ensaio imunoenzimático

Ig: imunoglobolinas

IL(-): interleucina(-)

LPS: lipopolissacarídeo

mL: mililitro

mRNA: RNA mensageiro

MSU: *Monossodium urate* – urato monossódico

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

n: número de animais por grupo

N.D: não detectável

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

ng: nanograma

nm: nanômetro

NLR: “*NOD-Like Receptor*” – receptores do tipo NOD

NLRP: receptores do tipo NOD contendo o domínio PYD 3

OD: densidade óptica

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

PCR: “*Polymerase Chain Reaction*” - reação em cadeia da polimerase

pH: potencial hidrogeniônico

PI3K: “*Phosphatidylinositol-3-Kinase*” - fosfaditilinositol 3-cinase

PMA: “*Phorbol 12-myristate 13-acetate*”

PTX3: pentraxina 3

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

qPCR: PCR quantitativa

RPMI – Meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute*

RT-qPCR – Reverse Transcriptase quantitative PCR, PCR quantitativa após transcrição reversa

RNA: ácido ribonucleico

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

SFB: soro fetal bovino

Syk: “*spleen tyrosine kinase*” – tirosina cinase do baço

TLR: “*Toll Like Receptor*” – receptores do tipo Toll

WT – camundongo do tipo selvagem

Resumo

A gota é uma doença causada pela deposição de cristais de urato monossódico (MSU) nas articulações. A IL-1 β é a citocina chave da gota, que é produzida e liberada através da ativação do inflamassoma NLRP3 que ocorre após células residentes fagocitarem os cristais de MSU. Apesar de ser uma doença conhecida há vários séculos, os mecanismos envolvidos tanto no reconhecimento dos cristais de MSU pelos fagócitos, os quais são responsáveis pela ativação da cascata inflamatória, quanto no controle da resposta inflamatória induzida por esses cristais ainda não estão totalmente esclarecidos. No presente estudo foram identificadas duas moléculas regulatórias importantes nesse contexto: pentraxin 3 (PTX3) e microRNA-135b. Pentraxinas são consideradas como sendo o braço humoral do sistema imune inato enquanto microRNAs são pequenos RNAs responsáveis pela regulação pós-transcricional da expressão gênica. Os resultados apresentados neste estudo mostram que a produção de PTX3 está aumentada tanto em amostras de camundongos submetidos a um protocolo experimental de gota, quanto em amostras de pacientes com gota aguda. Além disso, foi possível demonstrar que PTX3 é importante para a fagocitose de cristais de MSU tanto em células humanas quanto em células de camundongos. Mecanicamente, foi demonstrado que isto ocorre, em camundongos, por meio de receptores do tipo Fc γ , principalmente Fc γ RIII. Esses dados sugerem que PTX3 é um importante mediador para o desencadeamento da inflamação causada por cristais de MSU. Com relação ao microRNA-135b, sua expressão foi encontrada aumentada no contexto da gota experimental e foi demonstrado que a expressão deste microRNA é regulada por IL-1 β em macrófagos. Além disso, foi possível identificar o microRNA-135b como sendo um regulador negativo da via de sinalização de IL-1, tendo como alvos MyD88 e IL-1RAcP. Esses dados sugerem que o microRNA-135b é uma molécula importante no controle da inflamação articular na gota aguda. Dessa forma, a identificação dessas duas moléculas regulatórias da inflamação induzida por cristais de MSU ajuda a entender melhor a natureza da artrite gotosa assim como abrir novas perspectivas de diagnóstico e terapia.

Abstract

Gout is a disease caused by the deposition of monosodium urate crystals (MSU) into the joints. IL-1 β is the key cytokine in gout, which is produced and released through NLRP3 inflammasome activation that occurs after MSU crystal phagocytosis by resident cells. Although this disease is known many centuries ago, the mechanisms involved in both recognition of MSU crystals by phagocytes, which are responsible for activating the inflammatory process, and also in the control of the inflammatory response induced by these crystals are still not completely elucidated. In this study, it was identified two important regulatory molecules in the context of gout: pentraxin 3 (PTX3) and microRNA-135b. Pentraxins are considered the humoral arm of innate immunity and microRNAs are small RNAs responsible for post-transcriptional regulation in the gene expression. The results of this study showed that PTX3 production is increased in both samples from mice submitted to an experimental model of gout and also in samples from patients with acute gout. Moreover, it was demonstrated that PTX3 is important for the phagocytosis of MSU crystals in both murine and human cells. Mechanistically, this occurs in mice through Fc γ receptors, mainly Fc γ RIII. These data suggests that PTX3 is an important mediator for triggering the inflammation caused by MSU crystals. Regarding to microRNA-135b, its expression was significantly increased in the context of experimental gout and it was showed that the expression of this microRNA is regulated by IL-1 β in macrophages. In addition, it was possible to identify the microRNA-135b as a negative regulator of IL-1 signalling pathway, targeting MyD88 e IL-1RAcP. These data suggest that microRNA-135b is an important molecule in the control of articular inflammation in acute gout. In this way, the identification of these two regulatory molecules of the inflammation induced by MSU crystals help to understand better the nature of gouty arthritis and also open new perspectives of diagnostic and therapy.

Índice

1. Introdução.....	13
1.1. Gota.....	13
1.1.1. Aspectos gerais.....	13
1.1.2. Formação de ácido úrico e hiperuricemia.....	15
Figura 1: Metabolismo do ácido úrico.....	16
1.1.3. Patogênese da gota.....	16
Figura 2: Mecanismo de formação do inflamassoma NLRP3.....	20
1.2. Pentraxinas.....	22
Figura 3: Estrutura proteica das pentraxinas.....	23
1.3. microRNAs.....	26
2. Justificativa.....	29
3. Objetivo geral.....	30
3.1. Objetivos específicos.....	30
4. Metodologia.....	31
4.1. Animais.....	31
4.2. Modelo de gota.....	32
4.2.1. Preparo dos cristais de ácido úrico (cristais de MSU).....	32
4.2.2. Indução da gota por injeção intra-articular de cristais de MSU.....	32
4.2.3. Peritonite induzida por cristais de MSU.....	33
4.2.4. Avaliação da migração de leucócitos para a cavidade articular.....	33
4.3. Processamento do tecido periarticular.....	34
4.4. Dosagem de PTX3 e citocinas: ensaio imunoenzimático (ELISA).....	34
4.5. Ensaio de fagocitose de cristais de MSU.....	35
Figura 4: Análise de fagocitose de cristais de MSU por fagócitos.....	36
4.6. Coleta e análise de líquido sinovial humano.....	36
4.7. Isolamento de neutrófilos e células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de sangue total periférico de humanos.....	37
4.8. Análise da ativação de caspase-1.....	38
4.9. Isolamento de neutrófilos de medula óssea.....	38
4.10. Obtenção de macrófagos peritoneais.....	39
4.11. Extração e cultura de macrófagos derivados de medula óssea (BMDM).....	39
4.12. Extração do RNA, reação da cadeia de polimerase por transcrição reversa e PCR quantitativo em tempo real.....	40

4.13. <i>Sorting</i> através de citometria de fluxo.....	41
4.14. Análise bioinformática	41
4.15. Ensaio da expressão de luciferase.....	41
4.16. Ensaio de superexpressão do microRNA-135b <i>in vitro</i>	42
4.17. Ensaio de inibição do microRNA-135b <i>in vivo</i>	43
4.18. Análises estatísticas.....	43
5. Resultados	44
5.1. Participação de PTX3 na inflamação induzida por cristais de MSU	44
5.1.1. PTX3 participa da inflamação induzida por cristais de MSU	44
Figura 5: Participação de PTX3 na inflamação induzida por cristais de MSU.	45
5.1.2. PTX3 facilita a fagocitose de cristais de MSU e ativação celular.....	46
Figura 6: Quantificação de PTX3 em amostras de pacientes com gota.....	47
Figura 7: Papel de PTX3 na fagocitose de cristais de MSU em células de camundongos.....	49
Figura 8: PTX3 facilita a fagocitose de cristais de MSU em células humanas.....	50
5.1.3. PTX3 contribui para a fagocitose de cristais de MSU em um mecanismo dependente de receptor Fcγ, principalmente FcγRIII em camundongos.....	51
Figura 9:	52
Figura 10:.....	53
Figura 11: Papel dos receptores FcRγ para a inflamação causada por cristais de MSU <i>in vivo</i>	54
5.2. Papel de microRNAs na inflamação induzida por cristais de MSU	55
Tabela 1: Expressão dos microRNAs.	55
5.2.1. Inflamação induzida por cristais de MSU leva à superexpressão dos microRNAs 135a, 135b, 146a, 155 e 223 no tecido periarticular	56
Figura 12: Cinética de expressão de microRNAs na inflamação induzida por cristais de MSU.	57
5.2.2. Os microRNAs 135a, 135b, e 155 são superexpressos em macrófagos isolados do lavado sinovial de animais após injeção de cristais de MSU	57
Figura 13: Expressão dos microRNAs em células isoladas do lavado sinovial após estímulo com cristais de MSU.....	58
5.2.3 Os microRNAs 135b e 155 são superexpressos em macrófagos isolados do lavado peritoneal de animais após injeção de cristais de MSU	58
Figura 14: Expressão dos microRNAs em células isoladas do lavado peritoneal induzidas por cristais de MSU.....	59
5.2.4. O microRNA 135b é superexpresso em macrófagos derivados de medula óssea (BMDM) primados com LPS e estimulados com cristais de MSU.....	60
Figura 15: Expressão dos microRNAs em BMDMs induzida por cristais de MSU	61
5.2.5. Perfil de citocinas produzidas por BMDMs após o estímulo com cristais de MSU.....	62

5.2.6. A expressão do microRNA-135b é induzida por IL-1 β e é dependente da via de sinalização desta citocina	62
Figura 16: Produção de citocinas por BMDMs induzidas por cristais de MSU.	63
Figura 17: Expressão dos microRNAs em BMDMs induzida por IL-1 β	64
Figura 18: Expressão dos microRNAs induzidas por cristais de MSU em BMDMs de animais deficientes para IL-1R1.....	65
5.2.7. A expressão do microRNA 135b não é modulada em neutrófilos primados com LPS e estimulados com cristais de MSU	66
Figura 19: Expressão do microRNA-135b em neutrófilos após estímulo com cristais de MSU.....	66
5.2.8. Validação de alvos do microRNA-135b	67
Tabela 2: Alvos preditos do microRNA-135b por diferentes softwares.....	67
Figura 20: Expressão dos possíveis alvos do microRNA-135b.....	68
Figura 21: Validação dos alvos do microRNA-135b.....	70
5.2.9. Avaliação da relevância do microRNA-135b <i>in vivo</i>	71
Figura 22: Validação dos alvos do microRNA-135b.....	74
Figura 23: Avaliação da relevância do microRNA-135b <i>in vivo</i>	73
6. Discussão	74
7. Conclusões.....	85
Figura 24: Esquema dos mecanismos propostos para PTX3 e microRNA-135b na inflamaç.....	86
8. Referências bibliográficas	87
9. Anexos	94

1. Introdução

1.1. Gota

1.1.1. Aspectos gerais

A gota foi uma das primeiras doenças reconhecidas. Primeiramente, ela foi identificada pelos egípcios, em 2640 antes de cristo, sendo descrita como uma doença aguda que atingia a primeira articulação metatarso falangeana e foi denominada como “podagra”. Posteriormente, no século V antes de Cristo, Hipócrates relatou características clínicas da doença e então se referiu a ela como “a doença incapacitante do andar” ou como “artrite dos ricos”, uma vez que foi observada uma relação entre esta doença e o estilo de vida dos doentes que tinham acesso a uma alimentação farta e a bebidas alcoólicas. Poucos séculos depois, no século III depois de cristo, Galeno descreveu em pacientes com gota os tofos, que são nódulos duros geralmente depositados sob a pele ao redor das articulações. O nome gota, derivado da palavra em latim “gutta”, foi dado pelo monge Randolphus de Bocking no século XIII depois de cristo e se referiu à crença medieval de que o excesso de um dos quatros “humores” – os quais em equilíbrio eram responsáveis por manter o estado saudável – iria, sob certas circunstâncias, “gotejar” para a articulação causando dor e inflamação. Finalmente no século XVII, com o aparecimento do microscópio óptico, Van Leeuwenhoek desmistificou esta crença e identificou que na verdade o que estava presente nas articulações dos doentes com gota eram cristais de urato de sódio (Nuki e Simkin, 2006).

Em 1961, MacCarty e Hollander provaram que estes cristais são os responsáveis pela inflamação na gota. Esta hipótese foi confirmada através de um experimento em que cristais de ácido úrico foram injetados nas articulação de cães, desencadeando um processo inflamatório agudo com recrutamento de neutrófilos e dor semelhantes ao que ocorria na doença (Akahoshi,

Murakami e Kitasato, 2007; Martinon e Glimcher, 2006). Desde então, a gota vem sendo estudada, porém ainda existem muitas questões a serem elucidadas sobre a sua patogênese.

Atualmente a gota é a forma de artrite mais comum em homens e em mulheres após a menopausa, acometendo 1 a 2% da população mundial (Kuo *et al.*, 2015). Estudos epidemiológicos mostram que a incidência e prevalência da doença aumentam com a idade e afeta mais homens que mulheres (Singh, 2013). Nas mulheres, a doença ocorre principalmente após a menopausa devido à redução do estrógeno que é um hormônio importante na eliminação do ácido úrico pelos rins (Robinson e Horsburgh, 2014). Vários estudos epidemiológicos de diferentes países sugerem que tanto a incidência quanto prevalência da gota têm crescido principalmente devido à mudança de hábitos da população. Dentre os fatores de risco desta doença estão fatores genéticos, excesso no consumo de álcool e de dietas ricas em purinas, síndrome metabólica (obesidade), uso de diuréticos e falência renal crônica (Fam, 2005; Pascual e Perdiguero, 2006; Sebesta, 2012).

A gota é uma doença causada pela deposição de cristais de urato monossódico (MSU), forma ionizada do ácido úrico associada ao sódio, no interior e ao redor das articulações. A deposição dos cristais de MSU ocorre nesses compartimentos causando uma inflamação aguda grave que espontaneamente se resolve após 7-10 dias (Roddy e Choi, 2014). A doença ainda, em sua fase crônica, pode apresentar outras manifestações, como a formação de nódulos (tofo) em diversas partes do corpo, resultado de uma grande deposição de cristais de MSU nos tecidos. Além disso, os cristais podem ser depositados nos rins causando nefropatias (Rock, Kataoka e Lai, 2013).

1.1.2. Formação de ácido úrico e hiperuricemia

O ácido úrico é o metabólito final da degradação de purinas provindas da dieta ou endógenas que são produzidas a partir da renovação dos ácidos nucleicos. Os nucleotídeos purínicos, como adenina e guanina oriundos do DNA e RNA, perdem um grupo fosfato a partir da ação da enzima 5'-nucleotidase, formando o monofosfato de adenosina no caso da adenina (AMP). O AMP libera a adenosina, que é então desaminada para inosina pela adenosina desaminase. A inosina é hidrolisada e libera a base purínica hipoxantina que é então oxidada sucessivamente para xantina e posteriormente para ácido úrico pela xantina oxidase (Figura 1) (Mucsi, 2010; Rock, Kataoka e Lai, 2013). O monofosfato de guanosina (GMP) também pode ser catabolizado até ácido úrico. Primeiramente o GMP é hidrolisado para liberar a guanosina, a qual é clivada para liberar guanina. A guanina sofre remoção hidrolítica do seu grupo amino para liberar xantina que então é convertida pela xantina oxidase em ácido úrico. A maioria dos mamíferos possui no fígado a enzima uricase que oxida o ácido úrico em alantoína, uma substância solúvel e facilmente excretada. Entretanto, os humanos não possuem essa enzima e o excesso de ácido úrico é retido em suas células e fluidos corporais (Rock, Kataoka e Lai, 2013).

Os níveis de urato são mantidos à custa da excreção do excedente da produção diária principalmente pelos rins, que eliminam cerca de dois terços dessa produção, ou através do intestino, que excreta o restante. O aumento da concentração sérica de ácido úrico a níveis acima de 6,0 mg/dL leva ao quadro de hiperuricemia que predispõe ao risco de sua cristalização, sobretudo na presença de condições favoráveis que diminuem sua solubilidade, como a diminuição da temperatura local ou do pH, que acontecem essencialmente nas extremidades do corpo (Punzi *et al.*, 2012). Além disso, a deposição dos cristais não ocorre em solução e sim em tecidos, principalmente na superfície da cartilagem (Bardin e Richette, 2014).

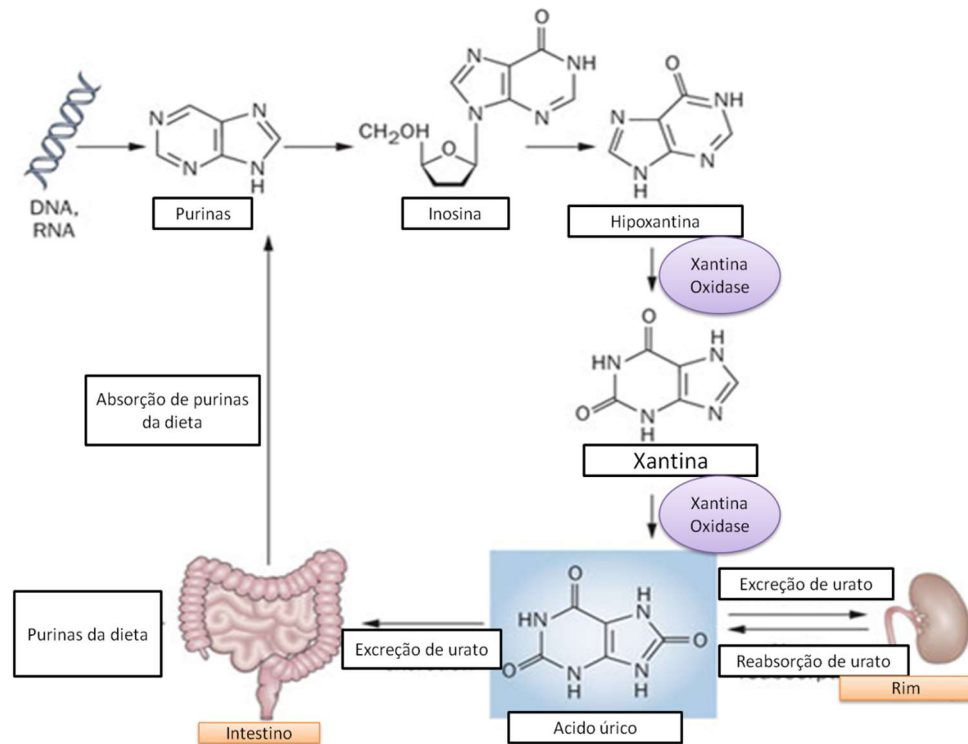


Figura 1: Metabolismo do ácido úrico. Figura adaptada de Rock *et al.*, 2013.

1.1.3. Patogênese da gota

Os cristais de MSU, depositados no interior e ao redor das articulações, são reconhecidos por células do sistema imune inato como células dendríticas, macrófagos e neutrófilos, que identificam os cristais como sinais endógenos pró-inflamatórios ou padrões associados a danos celulares (Ghaemi-Oskouie e Shi, 2011). Eles são identificados como sinais endógenos, uma vez que normalmente as células contêm altos níveis intracelulares de ácido úrico que são liberados quando essas células morrem por necrose. Entretanto, o ácido úrico é muito mais imunogênico na sua forma de cristal (Rock, Kataoka e Lai, 2013).

Martin e colaboradores, em 2009, demonstraram que os macrófagos residentes são as principais células responsáveis pela produção inicial dos mediadores inflamatórios e pelo recrutamento de neutrófilos durante os estágios iniciais da inflamação induzida pelos cristais

de MSU. Entretanto, devido às complexas interações celulares que acontecem durante as respostas inflamatórias, é possível que outras células, tais como sinoviócitos (que compreendem também uma população de fibroblastos além de macrófagos), células endoteliais e mastócitos, também possam desempenhar um papel importante na modulação inicial da resposta inflamatória aos cristais de MSU na gota (Getting *et al.*, 1997; Reber *et al.*, 2014; Zheng *et al.*, 2015).

A interação entre os cristais de MSU e as células residentes na articulação, tais como macrófagos, promove a liberação de mediadores inflamatórios, como a IL-1 β , responsável pela ativação de células endoteliais e produção de outras citocinas resultando no recrutamento de neutrófilos. O recrutamento de neutrófilos também é um marcador característico da gota aguda, uma vez que normalmente existe um número desprezível de neutrófilos na articulação saudável. Dessa forma, a identificação de neutrófilos no fluido sinovial é crucial para o diagnóstico dessa fase da doença. A chegada de neutrófilos para a articulação ocorre através da liberação de vários quimioatraentes incluindo citocinas ligantes de receptores CXCR1/2, leucotrieno B4, fator de ativação plaquetária e proteínas de ligação de cálcio (S100A8 e S100A9) (Miguelez *et al.*, 1996; Ryckman *et al.*, 2003; Terkeltaub *et al.*, 1998; Williams *et al.*, 2011). Além disso, a posterior fagocitose de cristais de urato pelos neutrófilos promove a liberação de mais mediadores, amplificando a resposta inflamatória aguda da gota (Rose e Liu-Bryan, 2006).

Os cristais de MSU possuem superfície que é conhecida por se ligar avidamente às proteínas presentes no plasma. Essa ligação ocorre através de interações não específicas (Rose e Liu-Bryan, 2006). Alguns estudos mostraram que cristais de MSU isolados de sítios inflamados na gota são cobertos com imunoglobulinas, principalmente IgG. A ligação do anticorpo ao cristal é feita através da região Fab enquanto a porção Fc fica exposta. Acredita-se que essa ligação do anticorpo com o ácido úrico facilite a precipitação do cristal, além de

facilitar também a fagocitose desse cristal através do seu reconhecimento pelos receptores Fc presentes nas células imunes (Ghaemi-Oskouie e Shi, 2011). Estudos mostram que os cristais de MSU podem se ligar, além da superfície de proteínas plasmáticas, tais como IgG, a proteínas do sistema complemento, as quais são importantes para a opsonização do cristal e posterior fagocitose do mesmo (ORTIZ BRAVO; SIECK; RALPH SCHUMACHER, 1993; TRAMONTINI *et al.*, 2004). A ativação do complemento pelos cristais ocorre tanto pela via clássica quanto pela via alternativa para a produção de C3a e C5a, assim como o complexo de ataque à membrana (MAC).

Os mecanismos envolvidos no reconhecimento dos cristais de MSU pelos fagócitos responsáveis pela ativação da cascata inflamatória ainda não estão totalmente esclarecidos. Sabe-se que alguns receptores de superfície dos neutrófilos estão envolvidos na resposta aos cristais de MSU, dentre eles estão CR3 (CD11b/CD18) e Fc γ RIII (CD16), que se ligam aos cristais envolvidos por iC3b e IgG, respectivamente (Barabe *et al.*, 1998). A sinalização via TLR-2 e TLR-4 através de vias dependentes de MyD88 e CD14 foi proposta como sendo essencial para o reconhecimento dos cristais de MSU e posterior fagocitose por macrófagos murinos (Liu-Bryan *et al.*, 2005; Scott *et al.*, 2006). Entretanto, a importância dos TLRs nesse processo foi revista por Chen *et al.*, que demonstrou que a ativação por cristais de MSU é dependente de IL-1/MyD88, mas independente da ativação de TLR, uma vez que em animais deficientes para vários TLRs a resposta inflamatória frente à injeção de cristais de MSU não se alterava (Chen *et al.*, 2006).

Outro mecanismo proposto para explicar a ativação das cascatas de sinalização celular independentes de receptores específicos é a de que o cristal de MSU, por ser uma grande partícula, interaja com a membrana celular causando perturbação da camada lipídica e agregação das moléculas de colesterol. Esta interação é suficiente para ativar vias de

sinalização, incluindo a via de Syk quinase (“*spleen tyrosine kinase*”) e a via de fosfatidilinositol 3–cinase (PI3K), com consequente ativação do processo de fagocitose (Ng *et al.*, 2008).

Martinon e colaboradores, em 2006, demonstraram que o inflamassoma NLRP3 tem um papel essencial na resposta aos cristais de MSU, sendo que a ativação deste complexo proteico pode ocorrer através da catepsina B liberada pela desestabilização com ruptura dos lisossomos ou até mesmo pela geração de ROS pelo leucotrieno B4 (Amaral *et al.*, 2012; Hornung *et al.*, 2008; Martinon *et al.*, 2006). A ativação do inflamassoma NLRP3 resulta na produção de IL-1 β que envolve a clivagem do seu precursor inativo pró-IL-1 β (35 kDa) em sua forma biologicamente ativa IL-1 β (17-kDa). A produção e ativação desta citocina envolve 3 etapas distintas e finamente controladas: primeiro, a produção do precursor pró-IL-1 β ; segundo, a clivagem e maturação deste precursor pela caspase-1; e por último, a liberação da IL-1 β ativa no espaço extracelular (Burns, Martinon e Tschopp, 2003).

A síntese do precursor pró-IL-1 β está sobre controle de fatores de transcrição ativado por outras vias de sinalização, tais como os ligantes de TLR (LPS e ácidos graxos (Joosten *et al.*, 2010)), ou por outras citocinas inflamatórias, tais como TNF- α (Dinarello, 1998). A pró-IL-1 β é clivada na forma ativa da IL-1 β através da ação da protease caspase-1 que precisa ser ativada por um membro da família dos receptores intracelulares do tipo NOD (NLR, do inglês “nucleotide-binding domain, leucine-rich repeat–containing”). Estes receptores detectam padrões moleculares específicos. Alguns NLRs, como a proteína NLRP3 que contém o domínio PYD 3 (“*pyrin domain-containing protein 3*”) e é essencial para a resposta aos cristais de MSU, se associam a proteínas citoplasmáticas ASC (“*apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase-associated recruitment domain [CARD]*”) e formam os inflamassomas

NLRP3 (Figura 2), que estão envolvidos com a ativação da caspase-1 e das citocinas IL-1 β e IL-18 (Lamkanfi e Dixit, 2009).

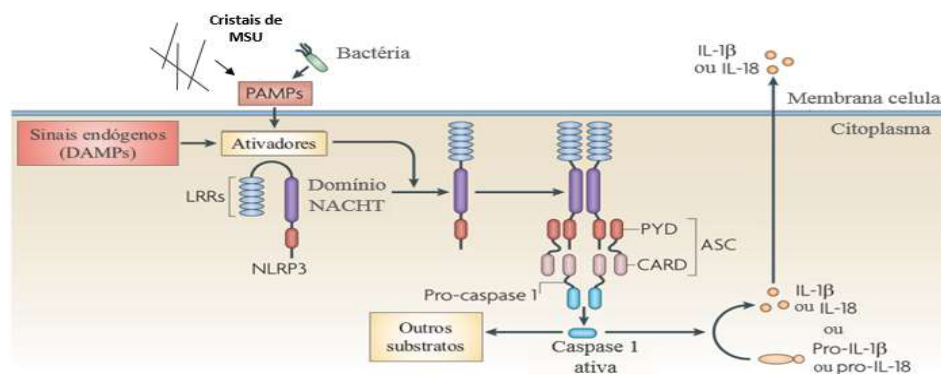


Figura 2: Mecanismo de formação do inflamassoma NLRP3. Figura adaptada de Tschopp & Schroder, 2010.

Além da via clássica de produção e ativação de IL-1 β , existem mecanismos adicionais capazes de clivar IL-1 β por vias independentes de inflamassoma. Outras proteases, como serina-proteases de neutrófilos (elastase, catepsina G e proteinase 3), serina-proteases de mastócitos (granzima A e quimase) e as metaloproteinases de matriz, podem clivar pró-IL-1 β em IL-1 β ativa (Lamkanfi, 2011; Netea *et al.*, 2015).

Após ser liberada para o meio extracelular, IL-1 β se liga ao receptor do tipo 1 (IL-1R1) e o sinal se propaga com ajuda da proteína acessória de IL-1 (IL-1RAcP), formando um complexo trimérico (Greenfeder *et al.*, 1995). Neste complexo trimérico, os domínios Toll- e IL-1R-like (TIR) da região citoplasmática dos receptores IL-1R1 e IL-1RAcP se aproximam resultando no recrutamento da proteína adaptadora MyD88 (“*myeloid differentiation primary response protein 88*”) que será responsável para propagação do sinal levando a ativação final do NF κ B.

A citocina IL-1 β tem um papel chave na indução da inflamação induzida por cristais de MSU em modelos experimentais de gota aguda (Amaral *et al.*, 2012; Martinon *et al.*, 2006; Torres *et al.*, 2009). Essas observações demonstradas em modelos experimentais estão de acordo com os dados obtidos com o uso clínico de inibidores de IL-1 β em pacientes com gota. Vários tipos de tratamentos para inibir IL-1 como o uso de IL-1Ra recombinante (anakinra), IL-1Trap (rilonacept), e anticorpo monoclonal anti-IL-1 β (canakinumab), resultaram na resolução dos ataques de gota (Kingsbury, Conaghan e McDermott, 2011; Mitroulis, Skendros e Ritis, 2010; Schlesinger *et al.*, 2012; Schumacher *et al.*, 2012).

O tratamento atual da gota consiste em diminuir a inflamação das articulações juntamente com a dor associada durante os ataques de gota e reduzir os níveis séricos de ácido úrico durante a fase assintomática, prevenindo formações de cristais de MSU e ajudando a dissolver os já existentes. Uma vez que os cristais de MSU são eliminados e a hiperuricemia for controlada, futuros ataques agudos de gota são improváveis de ocorrer e o risco de dano à articulação induzidos pelos cristais é removido. Entretanto, embora a gota seja a única forma de artrite crônica no qual uma “cura” existe, tanto os cuidados de saúde primários quanto os cuidados de saúde hospitalares estão longe do ideal para esta doença (Gnanenthiran *et al.*, 2011; Roddy e Choi, 2014). Para a maioria dos pacientes as terapias existentes são eficientes, porém alguns indivíduos com gota crônica não respondem ou não toleram os tratamentos. Isto ocorre devido a diferentes fatores como idade, comorbidades associadas, potenciais interações entre medicamentos, risco de ulcera gástrica e falência renal aguda (Rees, Hui e Doherty, 2014). Dessa forma, o desenvolvimento de terapias alternativas é necessário. Assim, este trabalho teve como objetivo identificar novas moléculas regulatórias deste processo inflamatório com o propósito de abrir novas perspectivas terapêuticas (Rees, Hui e Doherty, 2014). Neste trabalho focamos em duas moléculas associadas à inflamação: pentraxinas 3 e microRNAs, devido ao

seu potencial em regular inflamação induzida por cristais de MSU como será justificado nos próximos tópicos.

1.2. Pentraxinas

As pentraxinas são importantes componentes do sistema imune inato e são consideradas como proteínas de fase aguda em um processo inflamatório. Elas são proteínas com estrutura multimérica, caracterizadas pela presença de um domínio na região carboxi-terminal com aproximadamente 200 aminoácidos contendo um motivo altamente conservado de uma sequência primária conhecida como assinatura das pentraxinas (HxCxS/TWxS, onde x é um aminoácido qualquer). Elas são extremamente conservadas na evolução desde aracnídeos até humanos. Baseada em sua estrutura primária, elas são divididas em dois grupos: pentraxinas longas e curtas (Deban *et al.*, 2011).

As pentraxinas curtas têm aproximadamente 25 kDa e compartilham uma organização estrutural comum de cinco a dez subunidades arranjadas numa simetria pentamérica radial. Dentre as pentraxinas curtas podemos citar a proteína C reativa (CRP) e o componente amiloide P sérico (SAP). Ambas são as principais proteínas de fase aguda de processos inflamatórios em humanos e camundongos, sendo produzidas no fígado em resposta a citocinas inflamatórias como a IL-6 e IL-1 β (Bottazzi *et al.*, 2016; Mulay *et al.*, 2016).

A pentraxina 3 (PTX3) é um protótipo da subfamília das pentraxinas longas e foi identificada pela primeira vez no começo dos anos 90. A expressão de PTX3 é induzida rapidamente por diferentes estímulos como IL-1 β e TNF- α , agonistas de TLR e até mesmo por microrganismos intactos. Posteriormente à descrição da PTX3, outras moléculas com características semelhantes (uma porção carboxi-terminal relacionada à CRP e SAP e uma

porção N- terminal inédita) foram identificadas e passaram a fazer parte do grupo das pentraxinas longas: apexina, PTX4, as pentraxinas neurais Pentraxina 1 (NP1 ou NPTX1) e 2 (NP2 ou NPTX2) e o NPR (*neuronal pentraxin receptor*) (Bottazzi *et al.*, 2009; Garlanda *et al.*, 2002, 2005) (Figura 3).

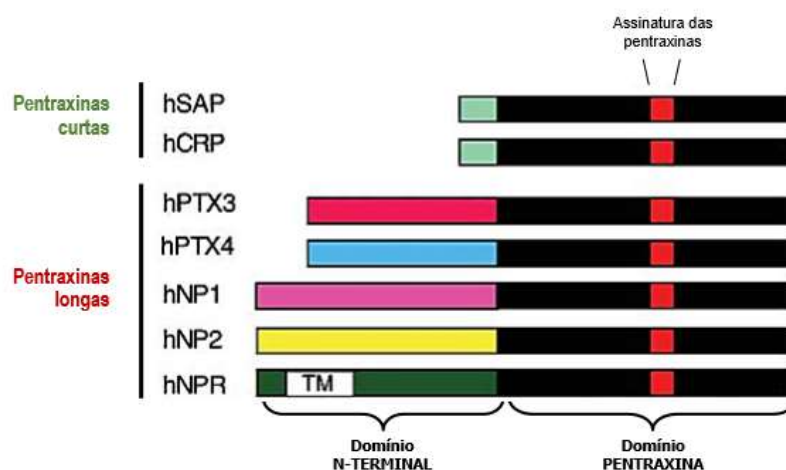


Figura 3: Estrutura proteica das pentraxinas. Figura adaptada de Garlanda *et al.* 2010.

PTX3 é expressa por células dendríticas mielóides, monócitos, macrófagos, células sinoviais, condrócitos, adipócitos, fibroblastos e células epiteliais (Deban *et al.*, 2011). Além disso, PTX3 é constitutivamente armazenada em grânulos específicos de neutrófilos e pode ser liberada em resposta a agonistas de TLRs ou microrganismos que interagem com esses receptores (Daigo *et al.*, 2016; Jaillon *et al.*, 2007).

A proteína PTX3 madura tem aproximadamente 40 kDa, apresentando um único sítio de glicosilação ligado ao N presente no resíduo Asn220, o qual aumenta o peso molecular para 45 kDa (Garlanda *et al.*, 2005) e permite que PTX3 amplie sua interação com outras moléculas, como a molécula selectina P e componentes do complemento (Inforzato *et al.*, 2006). O primeiro ligante descrito de PTX3 foi o componente C1q do sistema do complemento, porém PTX3 não mostrou nenhum tipo de interação com outros componentes do complemento como

C3 e C4 (Nauta *et al.*, 2003a). Essa ligação resulta na ativação da cascata da via clássica quando medida em uma condição experimental em que PTX3 está ancorada ao substrato, pela deposição de C3 e C4. Entretanto, PTX3 quando solúvel causa uma inibição de maneira dose-dependente da atividade hemolítica de C1q, indicando que PTX3 pode exercer dupla função e diferentes efeitos na ativação do complemento: 1) facilita a depuração de materiais que se ligam a PTX3 (como microrganismos) e 2) protege contra ativação do complemento não desejada na fase fluida (Inforzato *et al.*, 2013). Além disso, Ma e colaboradores demonstraram que PTX3 pode interagir com L-ficolina (Ma *et al.*, 2009). Outros componentes do complemento da via da lectina, como a lectina ligadora de manose (MBL) também interagem com PTX3. A formação do complexo MBL/PTX3 recruta C1q aumentando a deposição de C4 e C3 e a fagocitose de *Candida albicans* (Ma *et al.*, 2011).

De forma interessante, PTX3 tem a capacidade de interagir com uma grande variedade de patógenos, como certos fungos, vírus e bactérias. Dentre eles podemos citar a interação entre esta molécula e zimosam, *Paracoccidioides brasiliensis*, conídias de *Aspergillus fumigatus*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, e com os vírus humanos e murinos de citomegalovirus (CMV) e influenza H3N2 (Bozza *et al.*, 2006; Diniz *et al.*, 2004; Garlanda *et al.*, 2002; Gaziano *et al.*, 2004; Reading *et al.*, 2008).

Dados obtidos a partir de modelos experimentais e dados clínicos mostraram que PTX3 está envolvida na modulação de diversos processos inflamatórios. Foi demonstrado que PTX3 se liga seletivamente a P-selectina inibindo o rolamento de leucócitos, principalmente neutrófilos, no endotélio (Deban *et al.*, 2010). Além disso, foi demonstrado que PTX3 está envolvida no *clearance* de células apoptóticas, porém com efeitos opostos: quando PTX3 se liga em células apoptóticas ela inibe sua eliminação, entretanto quando PTX3 recombinante é

translocada para membrana plasmática de neutrófilos apoptóticos ela funciona como um sinal de “*eat-me*” promovendo a fagocitose dos mesmos (Jaillon *et al.*, 2009; Jeannin, Jaillon e Delneste, 2008; Rossum, Van *et al.*, 2004; Rovere *et al.*, 2000). Ao investigar a atividade opsônica de PTX3, foi demonstrado que PTX3 favorece o reconhecimento e fagocitose de conídias por neutrófilos humanos através do receptor FcγRII em um mecanismo dependente do sistema complemento (Moalli *et al.*, 2010). Além disso, receptores do tipo Fcγ foram propostos como sendo receptores de pentraxinas (Lu *et al.*, 2008).

Além dos papéis citados, PTX3 está envolvida na modulação de diversos processos fisiopatológicos. A expressão aumentada de PTX3 confere a camundongos maior resistência à toxicidade do LPS e à infecção causada pelo procedimento de ligadura e perfuração do ceco em comparação aos camundongos do tipo selvagem (Dias *et al.*, 2001). Além disso, deficiência de PTX3 está associada a maior dano tecidual decorrente da isquemia e reperfusão cardíaca (Salio *et al.*, 2008). Por outro lado, PTX3 mostrou-se deletéria em modelos de isquemia e reperfusão da artéria mesentérica superior, aumentando a mortalidade e danos teciduais (Souza *et al.*, 2009), além de acelerar injúria pulmonar em modelo experimental murino de ventilação mecânica (Real *et al.*, 2012). Estes trabalhos mostram que PTX3 é um regulador fino da inflamação, com efeitos danosos e benéficos, dependendo da natureza e intensidade da injúria.

Como foi mencionado que macrófagos e neutrófilos são capazes de produzir PTX3 sob estímulo de IL-1β, e estes mediadores são elementos chave para o desenvolvimento da inflamação induzida por cristais de MSU, decidiu-se focar neste trabalho o papel de PTX3 no desenvolvimento da gota. Uma outra classe de moléculas analisada neste trabalho foram os microRNAs, devido ao seu potencial de regular diferentes processos inflamatórios.

1.3. microRNAs

O termo microRNA surgiu em 2001, apesar de sua descoberta ter acontecido em 1993 quando pesquisadores americanos estudavam uma mutação importante para o desenvolvimento da *Caenorhabditis elegans* no gene *lin-14*. O primeiro microRNA descoberto foi o *lin-4* quando Lee e colaboradores perceberam que o seu gene não codificava nenhuma proteína, mas sim um par de pequenos RNAs. Um desses RNAs tinha 22 nucleotídeos de comprimento enquanto o outro possuía 61 nucleotídeos e formava uma estrutura em forma de grampo, sendo este, então, proposto como sendo a forma precursora do menor. Além disso, também foi observado que esses RNAs eram complementares a vários sítios da região 3'UTR do RNA mensageiro do *lin-14*, sendo importante para sua regulação e conseqüentemente influenciando no desenvolvimento larval de *Caenorhabditis elegans* (Wightman, Ha e Ruvkun, 1993).

Os microRNAs (miRNAs) são definidos como pequenos RNAs de fita simples, não codificantes e de apenas 20 a 25 nucleotídeos. Eles regulam diretamente a expressão de genes codificantes de proteínas através da degradação do mRNA ou por inibição direta da tradução (Pasquinelli, 2012). Com relação à nomenclatura, a abreviação “miR” se refere ao microRNAs maduros e esse prefixo é acompanhado por um número que segue a ordem de descoberta da molécula. Os microRNAs que se diferem apenas em 1 ou 2 nucleotídeos na sequência *seed* (responsável pela ligação desta molécula com o RNA mensageiro alvo), recebem o mesmo número, mas é adicionado uma letra minúscula ao seu nome.

Os miRNAs são formados a partir de longos precursores denominados microRNAs primários (pri-miRNA) e são transcritos pela RNA polimerase II ou III. Os pri-miRNAs são inicialmente processados no núcleo da célula pela enzima DROSHA, originando os pré-miRNAs, que são exportados para o citoplasma e se tornam miRNAs maduros por meio da ação

da enzima DICER. Uma das fitas geradas pelo miRNA maduro conduzirá a repressão do RNA mensageiro (RNAm) alvo ao se integrar ao complexo RISC (RNA-induced silencing complex) (Almeida *et al.*, 2015). O RNAm alvo é reconhecido pelos miRNAs maduros por meio da região *seed* e o pareamento ocorre com a região 3' não-traduzida (3'UTR) do RNAm alvo (Gu *et al.*, 2009), resultando na degradação do mesmo ou repressão da tradução (Wu e Belasco, 2008). Um fato interessante é que um miRNA pode regular diversos genes e um gene pode ser regulado por diferentes miRNAs. Além disso, acredita-se que mais de 30% dos genes em mamíferos sejam regulados por miRNAs (John *et al.*, 2004).

Os microRNAs regulam diferentes processos fisiológicos como diferenciação, crescimento, proliferação e morte celular. Uma expressão desregulada destas moléculas em resposta a estímulos endógenos ou externos pode levar a mudanças drásticas na expressão gênica podendo assim afetar a homeostase celular (Erson e Petty, 2008), e além disso, pode estar associada a condições patológicas como doenças cardiovasculares, doenças pulmonares, doenças inflamatórias e câncer (Abdellatif, 2012). Recentemente, tem sido demonstrado que microRNAs podem interferir no recrutamento celular e ativação de vias inflamatórias. Estudos recentes mostraram que microRNAs, como microRNA-155 e 146a estão envolvidos no desenvolvimento da artrite gotosa (Dalbeth *et al.*, 2015; Jin *et al.*, 2014a). Além dessa demonstração direta da participação de microRNAs na patogênese da gota, outros estudos mostrara que essas moléculas podem regular algumas moléculas de vias inflamatórias que estão presentes nesta doença. O microRNA-223, por exemplo, pode regular a de forma negativa a expressão de NLRP3, reduzindo dessa forma a atividade do inflamassoma NLRP3 (Bauernfeind *et al.*, 2012). Por outro lado, microRNA-92a pode ativar indiretamente o inflamassoma NLRP3 tendo como alvo moléculas importantes para a homeostasia endotelial durante o estresse oxidativo (Chen *et al.*, 2015). Ainda não foi descrito nenhum microRNA

capaz de regular diretamente a expressão da citocina IL-1 β , a principal citocina envolvida na inflamação gótica. Entretanto, alguns microRNAs são capazes de inibir indiretamente a produção desta citocina como microRNA-146a, 223 e 146b (Chen *et al.*, 2012; Haneklaus *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2014) ou até mesmo promover a produção de IL-1 β como microRNA-155 (Ceppi *et al.*, 2009; Li, Tian e Wang, 2013). Além disso, foi demonstrado em um modelo de inflamação induzida por fumaça de cigarro que microRNA-135b tem como alvo direto a caspase-1 e o receptor de IL-1 β , IL-1R1, tendo um importante papel regulatório promovendo a resolução deste processo inflamatório (Halappanavar *et al.*, 2013).

Assim, os microRNAs, sendo componentes importantes do processo de regulação gênica, possuem várias funções cruciais biológicas em células animais e têm sido alvos de muito interesse para estudos visando seu potencial terapêutico. Dessa forma, hipotetizamos que eles apresentam um papel regulador importante no desenvolvimento da resposta inflamatória induzida por cristais de MSU.

2. Justificativa

A incidência da gota tem aumentado mesmo com a existência de fármacos para o tratamento dos ataques de gota (Kuo *et al.*, 2015). Apesar de já se saber que o cristal de ácido úrico é o agente causador da gota, muitas questões ainda precisam ser elucidadas como por exemplo quais seriam os mecanismos de gatilho da inflamação induzida pelos cristais e quais mediadores dirigem esta resposta inflamatória. Dessa forma, a identificação de moléculas regulatórias deste processo ajudaria a entender melhor a natureza da artrite gotosa assim como abriria novas perspectivas terapêuticas, uma vez que as estratégias terapêuticas imunológicas atualmente são baseadas apenas na inibição de IL-1 β . Com este intuito, utilizamos um modelo experimental de gota em camundongos, uma vez que já é sabido que modelos animais de doenças humanas são ferramentas valiosas para entender os mecanismos biológicos básicos, para identificar e validar novas vias e alvos moleculares implicados na patogênese da doença e dessa forma descobrir potenciais agentes preventivos e terapêuticos (Kollias *et al.*, 2011).

Estas moléculas foram escolhidas com base em evidências na literatura de que elas poderiam participar na inflamação gotosa. Por exemplo, é sabido que PTX3 é produzida por macrófagos e neutrófilos sob estímulo de IL-1 β e que estes mediadores são elementos chaves na inflamação induzida por cristais de MSU. Além disso, vários estudos mostram que alguns microRNAs possuem sua expressão induzida por IL-1 β e que estes poderiam ser potenciais regulares durante desenvolvimento da gota (Wang *et al.*, 2015).

Assim, no presente trabalho buscou-se avaliar a participação de PTX3 e a relevância de microRNAs no contexto da gota com objetivo de identificar novas alternativas terapêuticas.

3. Objetivo geral

Estudar o papel de PTX3 e do microRNA-135b na inflamação articular induzida por cristais de MSU.

3.1. Objetivos específicos

3.1.1. Estudar a participação de PTX3 na inflamação induzida por cristais de MSU tanto em um modelo experimental de gota em camundongos quanto em amostras de pacientes e células humanas.

3.1.2. Avaliar a participação de PTX3 na fagocitose e produção de IL-1 β por monócitos, macrófagos e neutrófilos.

3.1.3. Identificar os mecanismos pelo qual PTX3 atua na inflamação gotosa estudando receptores da família Fc γ .

3.1.4. Identificar microRNAs importantes para a inflamação induzida por cristais de MSU.

3.1.5. Identificar microRNAs que são induzidos por IL-1 β e a participação da via de sinalização desta citocina na expressão dos mesmos.

3.1.6. Estudar possíveis alvos e mecanismos regulatórios do microRNA-135b no modelo experimental de gota.

4. Metodologia

4.1. Animais

Todos animais usados para o desenvolvimento deste trabalho foram no background C57BL/6. Animais *knockouts* para PTX3 e para o receptor Fc γ foram obtidos do *The Jackson Laboratory* (Bar Harbor, US). Todas colônias foram mantidas em condições SPF (*pathogen-free*) no Instituto Clinico Humanitas (Rozzano, Itália). Para experimentos pareados com estes *knockouts*, camundongos selvagens foram obtidos da *Charles River Laboratories* (Calco, Itália). Camundongos *knockouts* para Fc γ RIIB e Fc γ RIII foram criados e mantido no biotério do Laboratório de Imunofarmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Para os experimentos pareados com estes *knockouts*, camundongos selvagens foram obtidos no Centro de Bioterismo (Biotério Central) da UFMG e mantidos no biotério do Laboratório de Imunofarmacologia - UFMG. Foram usados camundongos de 8 a 10 semanas.

O manejo de animais foi realizado obedecendo às normas de ética animal em experimentação. Todos os animais receberam ração (Nuvilab nuvital, Curitiba, PR) e água *ad libitum* e foram mantidos em ciclo claro-escuro de 12 horas. Procedimentos realizados na Itália envolvendo manuseio de animais foram feitos conforme protocolos aprovados pelo Instituto Clinico Humanitas e o estudo foi aprovado pelo Ministério Italiano de Saúde (n. 71/2012-B). Todos os procedimentos experimentais feitos no Brasil foram aprovados pelo Comitê de Ética em experimentação animal da UFMG – CETEA no protocolo de acesso nº 35/ 2016.

4.2. Modelo de gota

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

Para preparação dos cristais, 1,68 g de ácido úrico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) foram adicionados em 500 mL de uma solução de hidróxido de sódio (NaOH 0,01 M). A solução foi colocada em agitação a 70° C e foi adicionado NaOH (1M) para manter a solução com o pH entre 7,1 e 7,2 para que a dissolução ocorresse. Posteriormente a solução foi filtrada em filtro de 0,22 µm em capela de fluxo laminar e deixada em temperatura ambiente para a precipitação dos cristais de ácido úrico. Após 7 dias a solução com os cristais foi centrifugada (12.000 g, 10 minutos) e o sobrenadante descartado. Posteriormente, duas lavagens do precipitado com álcool absoluto foram realizadas. Além disso, a solução foi submetida ao processo de sonicação para diminuir o tamanho dos cristais e posteriormente foi deixada secando em temperatura ambiente em condições estéreis. Após secar, os cristais foram autoclavados e, então, ressuspensos em tampão fosfato estéril (PBS) na concentração desejada e mantidos a -20°C até posterior utilização.

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

Inicialmente os camundongos foram anestesiados via intraperitoneal com uma mistura de cetamina 60 mg/kg e xilazina 10 mg/kg diluídos em PBS e a região tíbio-femural desejada foi depilada. Os cristais de MSU obtidos foram diluídos em PBS para a injeção intra-articular tíbio-femural de 10 µL de solução contendo 100 µg do cristal. A articulação contralateral foi utilizada como controle (injeção de veículo – PBS). Em um experimento específico, alguns camundongos foram tratados com antagonista do receptor de IL-1 (IL-1Ra) (Biogen). Esses

animais foram tratados com 5mg/kg de IL-1Ra ou salina através de injeção subcutânea 1 hora antes da injeção com os cristais de MSU na articulação.

4.2.3. Peritonite induzida por cristais de MSU

Cristais de MSU (3 mg em 0,5 mL de PBS) foram injetados no peritônio de camundongos e 12 horas após a injeção os animais foram eutanasiados. As células foram coletadas através de duas lavagens do peritônio com 5 mL de PBS gelado cada uma.

4.2.4. Avaliação da migração de leucócitos para a cavidade articular

Os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical horas após a injeção dos cristais (3, 6, 15 ou 24 horas de acordo com o experimento). Para avaliar a migração de leucócitos para a cavidade articular, foi realizado um lavado intra-articular que consistiu em lavar duas vezes com 5 μ L a cavidade articular utilizando uma solução de albumina bovina 3 % diluída em PBS. Este lavado de células da articulação foi diluído em 90 μ L de albumina bovina 3 % para a posterior contagem total e diferencial dos leucócitos. Alíquotas de 20 μ L do lavado foram diluídas em 20 μ L de solução Turk, para posterior contagem total dos leucócitos que foi realizada em câmara de Neubauer, com o auxílio de microscópio óptico. O número total de leucócitos foi utilizado para cálculo da percentagem dos diferentes leucócitos encontrados no lavado articular a partir da contagem/discriminação por visualização de lâminas preparadas por citocentrifugação sob microscópio óptico e posteriormente coradas de acordo com kit panótico rápido (Laborclin, Paraná).

4.3. Processamento do tecido periarticular

O tecido periarticular removido foi pesado e processado em 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 1 mL por 100 mg de tecido, utilizando um homogeneizador de tecidos (TissueLyser II- Qiagen). Após homogeneização e centrifugação (12.000 g, 10 minutos a 4°C), o sobrenadante foi coletado e estocado a -20°C para quantificação de PTX3 e citocinas.

4.4. Dosagem de PTX3 e citocinas: ensaio imunoenzimático (ELISA)

Anticorpos de captura de interesse - PTX3, IL-1 β , CXCL1, CXCL2, IL-6 e CCL5 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) - diluídos em PBS foram adicionados à placa (NUNC) de 96 poços (50 μ L/poço). Essa placa foi incubada a 4°C por 12 a 18 horas. O conteúdo foi retirado e os poços lavados 4 vezes (300 μ L) com o tampão de lavagem (PBS/Tween-20 0,5 %) utilizando um lavador de placas. Foi adicionado 100 μ L/poço de tampão de bloqueio (PBS/BSA 1 %) e a placa foi incubada por 2 horas a temperatura ambiente. O conteúdo foi retirado e os poços lavados 4 vezes (300 μ L) com o tampão de lavagem (PBS/Tween 0,5%) utilizando um lavador de placas. Foi adicionado 50 μ L/poço dos padrões e amostras à placa. A placa foi incubada por 2 horas a temperatura ambiente. O conteúdo foi retirado e os poços lavados 4 vezes (300 μ L) com o tampão de lavagem (PBS/Tween 0,5%) utilizando um lavador de placas. Foi adicionado 50 μ L/poço de anticorpo de detecção e a placa foi incubada por 2 horas a temperatura ambiente. O conteúdo foi retirado e a placa lavada 4 vezes com tampão de lavagem. Foi adicionado 50 μ L/poço de estreptavidina ligada à enzima peroxidase à placa que foi incubada por 20 minutos a temperatura ambiente ao abrigo da luz. O conteúdo foi retirado e a placa lavada 4 vezes com tampão de lavagem. Foi adicionado 50 μ L/poço de tampão citrato

contendo ortofenildiamina (OPD) à placa que foi incubada por 10 a 20 minutos a temperatura ambiente ao abrigo da luz. A reação foi interrompida adicionando-se 25 µL/poço de solução de H₂SO₄ 1M. A densidade óptica foi quantificada em comprimento de onda de 490nm com o espectrofotômetro SpectraMax Plus Microplate Reader (Molecular Devices), e os resultados expressos com base na concentração da curva padrão.

4.5. Ensaio de fagocitose de cristais de MSU

Uma quantidade de 100 µL de sangue total de camundongo ou 0,5 x 10⁶ neutrófilos ou PBMC (células mononucleares de sangue periférico) isolados, como descrito no próximo tópico, foram incubados com cristais de MSU (150 µg/mL) por 15 minutos a 37°C. Os cristais de MSU foram pré-incubados ou não com PTX3 recombinante (1, 10, 50, 100 ou 200 µg/mL) por 1 hora. Como controle da fagocitose 2,5 µM de citocalasina D (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) foi adicionada 1 hora antes do estímulo com cristais de MSU.

Logo em seguida as amostras foram colocadas no gelo para bloquear a fagocitose e solução de lise (ACK) gelada foi adicionada, no caso do sangue total. Seguiu-se com a marcação para posterior análise por citometria de fluxo. As células de camundongo foram marcadas com CD45, CD11b, LyG (neutrófilos) e Ly6C (monócitos) (eBiosciences, BD Pharmingen) e logo fixadas com 0,1 % de paraformaldeído e a leitura foi feita no citômetro FACSCANTOII (BD Biosciences). As células mononucleares humanas foram marcadas com CD14 (monócitos) e os neutrófilos, por apresentarem pureza acima de 90% e devido a facilidade de discriminação da população de acordo com o FSC e SSC, não foram marcados. As populações celulares analisadas incluíram neutrófilos e monócitos e a fagocitose de cristais de MSU foi determinada através da análise da mudança do parâmetro SSC dentro das diferentes populações (Schorn *et al.*, 2012). Os dados foram analisados com o software FlowJo (Tree

Star). Os valores foram representados por porcentagem relativa ao grupo de células de animais selvagens incubados apenas com cristais de MSU.

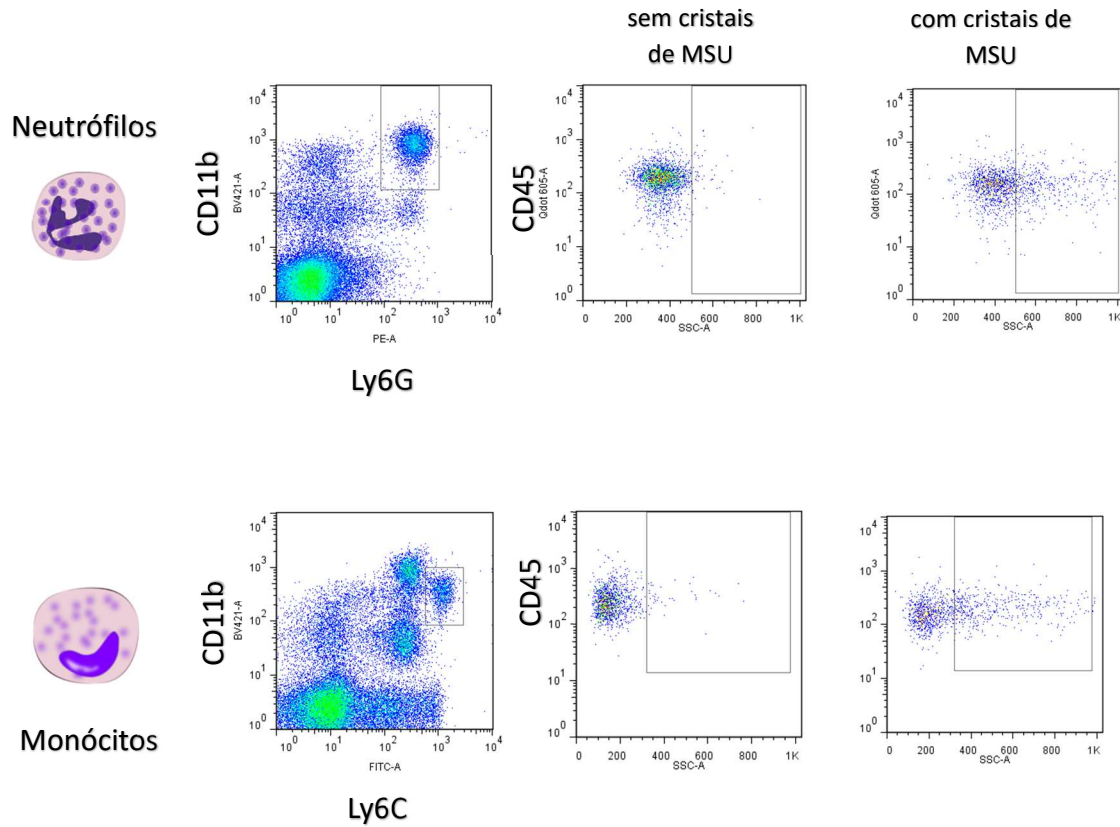


Figura 4: Análise de fagocitose de cristais de MSU por fagócitos. Estratégia de análise da fagocitose de cristais de MSU por neutrófilos e monócitos do sangue de camundongos analisando a variação do perfil de SSC após fagocitose dos mesmos. Neutrófilos foram considerados como células $CD11b^{high} Ly6G^{high}$ e monócitos $CD11b^{+} Ly6C^{high}$.

4.6. Coleta e análise de líquido sinovial humano

Duas coortes de pacientes, diagnosticados com gota através da identificação de cristal de MSU no líquido sinovial, foram usadas neste estudo: uma da Nova Zelândia e outra do Brasil. Os pacientes apresentavam gota aguda ou crônica na coorte da Nova Zelândia e somente gota aguda na coorte do Brasil. O líquido sinovial e o sangue foram coletados em tubos de

EDTA, centrifugados 2.000 g por 10 minutos e o sobrenadante ou soro foram coletados e mantidos a -20°C até serem usados para as medições de PTX3 e IL-1 β . Todos os pacientes forneceram consentimento para participação do estudo que foi aprovado pelo Comitê de Ética. No caso dos pacientes da coorte brasileira: parecer do CEP é 1.297.041, emitido em 26 de outubro de 2015, e o registro CAAE (Conep) é: 50373815.4.0000.5259.

4.7. Isolamento de neutrófilos e células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de sangue total periférico de humanos

As células humanas do sangue total periférico foram isoladas através de centrifugação por gradiente de densidade de acordo com as instruções do fabricante (*Histopaque* 1077 e *Histopaque* 1119 - Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Brevemente, 10mL de sangue total foram colocados sob 5 mL de *Histopaque* 1119 (Sigma Aldrich) sobre 5 mL de *Histopaque* 1077. Os tubos foram centrifugados a 1200 g com aceleração e desaceleração mínima por 30 minutos a temperatura ambiente. As células PBMC, no primeiro anel, e os neutrófilos juntamente com outras células polimorfonucleares, localizados no segundo anel, foram coletados com auxílio de pipeta Pasteur e as células lavadas em meio RPMI-1640. Em seguida, as células foram ressuspensas em meio RPMI e as células viáveis foram contadas em câmara de Neubauer através da técnica de exclusão com azul de Tripán (Merck, USA). Os PBMCs antes de serem estimuladas foram incubadas em meio RPMI suplementado com 10 % SFB a 37°C em atmosfera contendo 5 % CO_2 por 2 horas e posteriormente as células não aderidas foram removidas. Para avaliar a pureza das células isoladas, foi realizada a contagem diferencial de lâminas preparadas a partir da solução de células diluídas em BSA 3% e citocentrifugadas (Citospin, Shandon Lipshaw Inc, Pittsburg, Pennsylvania, USA). As lâminas obtidas foram coradas com kit panótico rápido (Laborclin, Paraná) e observadas em microscópio óptico

(objetiva de 100X em óleo de imersão). Apenas as amostras com pureza acima de 90% foram consideradas para os ensaios.

4.8. Análise da ativação de caspase-1

A detecção de caspase-1 ativa foi obtida através da utilização de um kit específico: FLICA FAM-YVAD-FMK (Immunochemistry). Este kit é composto por uma sonda fluorescente que se liga de forma irreversível a uma subunidade específica de caspase-1 clivada. Monócitos isolados do sangue periférico humano foram estimulados com LPS 100 µg/mL por 1 hora e posteriormente com cristais de MSU 150 µg/mL por 6 horas. Após este período as células foram submetidas à marcação com FLICA de acordo com as instruções do fabricante e, posteriormente, marcadas para CD14 e analisados por citometria de fluxo. As análises foram feitas com o software FlowJo (Tree Star).

4.9. Isolamento de neutrófilos de medula óssea

O lavado do canal medular (tíbia e fêmur) foi feito com 5 mL de PBS (após lise das hemácias). A solução de PBS contendo células da medula foram coletadas e centrifugadas a 1200 g, 10 minutos a 4°C e suspensas em 1 mL de PBS. As células foram cuidadosamente adicionadas em tubos de 15 mL contendo gradiente duplo de separação formado pela adição sequencial de 3 mL de Histopaque 1077 e 3 mL de Histopaque 1119 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Os tubos foram centrifugados à 1200 g sem aceleração por 30 minutos e em temperatura ambiente. A camada inferior de células polimorfonucleares foi coletada com o auxílio de pipeta Pasteur e as células foram lavadas em meio RPMI-1640. Em seguida, as células foram ressuspensas em meio RPMI-1640. Após isolamento as células foram diluídas em solução de azul de Tripan para contagem total dos leucócitos realizada em câmara de Neubauer, com o

auxílio de microscópio óptico. A pureza foi determinada através de visualização de lâminas preparadas por citocentrifugação sob microscópio óptico e posteriormente coradas de acordo com o kit panótico rápido (Laborclin, Paraná) e examinadas sob microscópio óptico usando os critérios morfológicos padrões para diferenciar os tipos celulares. Apenas amostras com pureza e viabilidade acima de 90 % foram consideradas nos ensaios. As células foram mantidas em meio RPMI suplementado com 10 % SFB a 37 °C em atmosfera contendo 5 % CO₂ e foram estimuladas de acordo com o experimento.

4.10. Obtenção de macrófagos peritoneais

Tioglicolato a 3 % foi injetado via intraperitoneal nos camundongos e após 5 dias esses foram sacrificados. Foi feita a coleta das células através da lavagem peritoneal utilizando 5 mL de PBS gelado. Logo após as células foram contadas e plaqueadas. Essas células foram colocadas em meio RPMI-1640 suplementado com 10 % de SFB a 37 °C em atmosfera contendo 5 % CO₂ por 2 horas. Após este período foi feita a lavagem das placas com PBS para remoção das células não aderidas e as células foram deixadas *overnight* para que o estímulo fosse feito somente no dia seguinte de acordo com o experimento.

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

Células obtidas do lavado do canal medular após lise de hemácias foram plaqueadas em meio IMDM com 10 % de SFB *overnight* a 37°C. Células não aderentes foram ressuspendidas e plaqueadas com 10 ng/mL M-CSF. Elas permaneceram em cultura por 7 dias, sendo que o meio foi substituído no terceiro dia. Após este período elas foram estimuladas de acordo com o experimento.

4.12. Extração do RNA, reação da cadeia de polimerase por transcrição reversa e PCR quantitativo em tempo real

As amostras de tecido periarticular foram homogeneizadas em TRIZOL (Ambion, Life Technologies, EUA) utilizando-se um homogeneizador de tecidos (TissueLyser II- Qiagen). O RNA total foi extraído com a utilização do kit de extração *Direct-zol RNA MiniPrep kit* (Zymo Research), seguindo as instruções do fornecedor. A quantificação das amostras de RNA foi feita no espectrofotômetro NanoDrop ND1000 (Nano Drop Technologies).

A PCR quantitativa em tempo real (qPCR) foi realizada usando 7900HT Real-time PCR System (Applied Biosystems). Para a quantificação dos microRNAs, foi feita a transcrição reversa de 300 ng de RNA total usando o kit *TaqMan® MiRNA Reverse Transcription kit* (Applied Biosystems) de acordo com o fabricante. Para a quantificação gênica, foi feita a transcrição reversa de 1 µg de RNA usando random primers e a quantificação foi feita usando *Power SYBR Green Mix* (Applied Biosystems) com pares específicos de primers. Os dados foram analisados e os valores de expressão relativa foram calculados usando snor202 como controle endógeno para microRNA e GAPDH para o controle endógeno do mRNA. Os dados foram analisados utilizando-se a seguinte fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ onde: $\Delta\Delta Ct =$ o valor de calibração encontrado através da subtração das médias do Ct do experimental – Ct do grupo controle e que $\Delta Ct = Ct$ da gene alvo – Ct do gene constitutivo (snor202 ou GAPDH).

. Sequência dos primers qPCR (5'-3'):

GAPDH

Sense - ACG GCC GCA TCT TCT TGT GCA

Antisense - CGC CCA AAT CCG TTC ACA CCG A

IL-1β

Sense - TCT TTG AAG TTG ACG GAC CC

Antisense – TGA GTG ATA CTG CCT GCC TG

MyD88

Sense – AGAAAAGGTGTCGCCGCAT

Antisense - GGCTGAGTGCAAACCTTGGTC

IL-1RAcP

Sense - GAAAGAGCCCCCAGAACTCC

Antisense - ACAGTAGGTGACACAGCAGC

4.13. *Sorting* através de citometria de fluxo

As células do lavado sinovial ou do lavado peritoneal foram ressuspensas em FACS *buffer* (1 % BSA em PBS) e incubadas com anticorpos por 30 minutos no escuro a 4°C. Células foram lavadas três vezes com BSA 0,1% diluído em PBS e fixadas com 0,1% de paraformaldeído. Anticorpos conjugados a fluorocromos usados foram anti-CD11b, anti-F4/80 e anti-LyG (BD Bioscience). Para o procedimento de *sorting* as células foram marcadas com os anticorpos e ressuspensas em uma solução própria (PBS sem cálcio e magnésio + 1% BSA + 2mM EDTA). O *sorting* foi feito com o equipamento FACSAria (BD Biosciences). A pureza obtida de ambas populações variou entre 93-96 %.

4.14. Análise bioinformática

Para prever quais genes poderiam ser alvos do microRNA135b, diferentes softwares de predição de alvos para microRNAs foram usados: MIRANDA, MicroRNA.org e Targetscan.

4.15. Ensaio de atividade da luciferase

Para a realização do ensaio de luciferase primeiramente alguns construtos contendo a região 3'UTR dos genes de interesse foram criados. Para isso toda ou parte da região 3'UTR

de IL-1 β , IL-1R1, MyD88 e IL-1RAcP foram amplificadas a partir do DNA genômico e posteriormente foram clonadas no vetor psiCHECKTM-2 (Promega, USA). Mutações na sequência *seed* na região 3'UTR dos genes de interesse foram criadas usando o kit *QuikChangeII XL site directed mutagenesis kit* com os primers adequados (Stratagene, Agilent Technologies, USA). Posteriormente, fibroblasto da linhagem NIH3T3 foram plaqueados em meio DMEM suplementado com 10 % SFB e após 24 horas foram transfectados com os 100 ng dos diferentes construtos psiCHECKTM-2-3'-UTR e 10 μ M do mimético do microRNA-135b ou uma sequência *scramble* para controle - mirVana (Life Technologies), usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen), de acordo com o protocolo do fabricante. Após 48 horas, as células foram lisadas e a atividade luciferase de *firefly* e *renilla* foram determinadas usando o kit *Dual-Glo Luciferase Assay System* (Promega, USA), seguindo protocolo do fabricante. A atividade enzimática das duas luciferases foram quantificadas através do equipamento *MultiDetection Microplate Reader Synergy 2 luminometer* (BioTek, USA). Os valores da atividade da luciferase *renilla* foram normalizados pela atividade de luciferase da *firefly*, a qual serviu de controle interno. Os valores normalizados foram expressos como expressão relativa com relação ao controle negativo.

4.16. Ensaio de superexpressão do microRNA-135b *in vitro*

Para ensaio de superexpressão, macrófagos derivados de medula foram transfectadas com 10 μ M do mimético do microRNA-135b ou uma sequência *scramble* para controle - mirVana (Life Technologies), usando *TransIT-TKO* (Mirus Bio, USA), de acordo com o protocolo do fabricante. 24 horas após a transfecção as células foram primadas com LPS (100 ng/mL) por 15 horas e posteriormente foram estimuladas com cristais de MSU (150 μ g/mL)

por 6 horas. O sobrenadante foi coletado e as células lisadas com TRIZOL para posterior processamento e análise da expressão gênica.

4.17. Ensaio de inibição do microRNA-135b *in vivo*

Para a inibição do microRNA-135b *in vivo*, 50nM do microRNA-135b-5p miRCURY LNA™ Power microRNA inhibitor (Exiqon) foi injetado na articulação do camundongo 3 horas antes da injeção dos cristais de MSU. Após 6 horas da injeção dos cristais os animais foram eutanasiados e os parâmetros inflamatórios foram avaliados.

4.18. Análises estatísticas

Primeiramente o teste de normalidade foi utilizado para verificar se as amostras apresentavam distribuição Gaussiana. As comparações estatísticas entre os vários grupos foram feitas por ANOVA “one way” seguida de pós-teste Newman-Keuls. A análise da diferença entre dois grupos foi realizada pelo teste t-student ou Whitney U test. Para correlação das amostras foi realizado a correlação de Pearson. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM). A significância estatística foi estabelecida em $p < 0,05$. Para a realização de todas as análises, foi utilizado o software GraphPad PRISM, GraphPad software Inc. (San Diego, CA, USA).

5. Resultados

Para simplificar a exposição dos resultados e facilitar o entendimento, os mesmos estão separados em dois tópicos: participação de PTX3 na inflamação induzida por cristais de MSU e papel de microRNAs na inflamação induzida por cristais de MSU.

5.1. Participação de PTX3 na inflamação induzida por cristais de MSU

5.1.1. PTX3 participa da inflamação induzida por cristais de MSU

Com o objetivo de investigar o papel de PTX3 na gota, utilizou-se um modelo experimental de gota em que animais recebem uma injeção de cristais de MSU na articulação tíbio-femoral. O pico da inflamação neste modelo ocorre entre 6 a 15 horas após a injeção dos cristais de MSU. Além disso, este é um modelo auto resolutivo, em que a resolução do processo inflamatório se dá a partir de 24 horas após injeção de cristais de MSU (Amaral *et al.*, 2012). Utilizando este modelo, foi possível observar que os níveis de PTX3 apresentaram-se elevados no tecido periarticular 6 e 15 horas após a injeção de cristais de MSU (Figura 4A).

O próximo passo foi entender a relevância de PTX3 no modelo de gota e para isso animais deficientes em PTX3 foram utilizados. A injeção de cristais de MSU na articulação do joelho dos camundongos causou um aumento significativo na quantidade de IL-1 β e CXCL1 no tecido periarticular resultando em um grande influxo de neutrófilos na cavidade articular com 6 e ainda mais após 15 horas após esta injeção (Figura 4B-D). De forma interessante, todos estes parâmetros inflamatórios foram significativamente reduzidos nos animais deficientes em PTX3 (PTX3^{-/-}) em comparação aos animais selvagens (WT) (Figura 4B-D). Esses dados demonstram a contribuição de PTX3 para a inflamação induzida por cristais de MSU.

Com objetivo de avaliar a importância de IL-1 β , uma citocina chave neste modelo (Amaral *et al.*, 2012), na produção de PTX3 após injeção de cristais de MSU, camundongos foram tratados com antagonista do receptor de IL-1 (IL-1Ra). Esta inibição resultou em uma diminuição significativa no recrutamento de neutrófilos para a cavidade sinovial (dados não mostrados) e de forma interessante, também resultou em uma menor produção de PTX3 (Figura 4E). Esses dados, sugerem que IL-1 β seja uma molécula importante para a produção de PTX3 neste contexto.

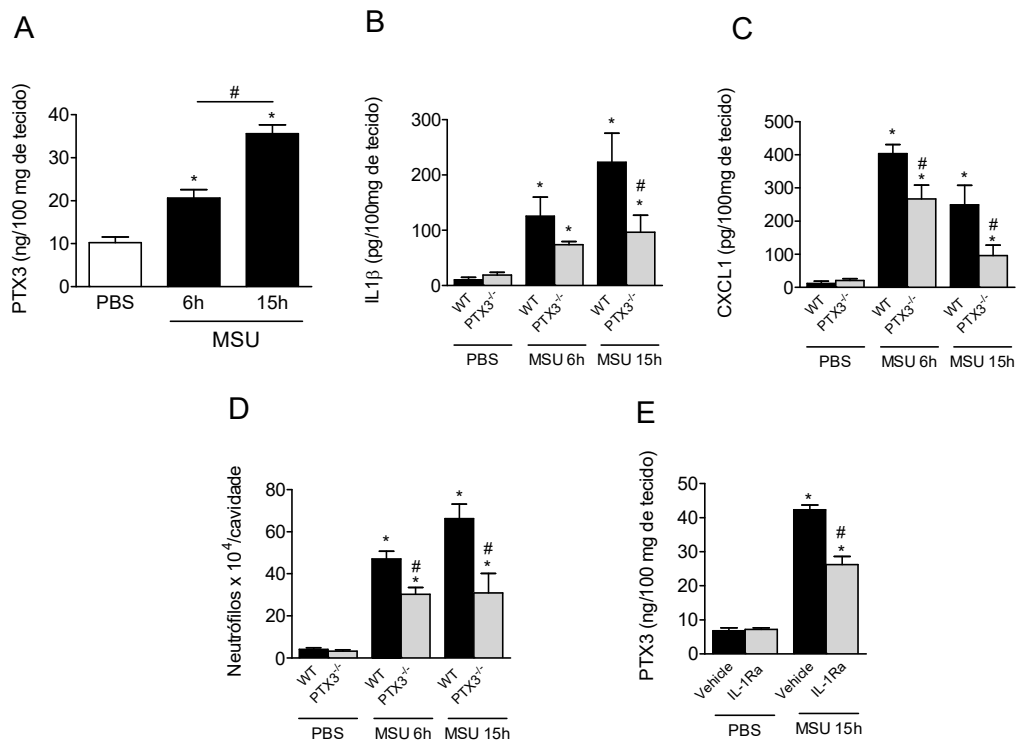


Figura 5: Participação de PTX3 na inflamação induzida por cristais de MSU. Camundongos receberam injeção intra-articular de cristais de MSU (100 μ g/cavidade) e 6 e 15 horas depois os níveis de PTX3 foram quantificados no tecido periarticular (A). Animais selvagens (WT) e PTX3^{-/-} receberam injeção com os cristais de MSU e 6 e 15 horas depois os parâmetros inflamatórios foram analisados, como a quantidade de IL-1 β (C) e CXCL1 (D) no tecido periarticular e número de neutrófilos (D) presentes no lavado sinovial. Concentração de PTX3 no tecido periarticular, 15 horas após injeção de cristais de MSU (100 μ g/cavidade), em camundongos tratados com IL-1Ra (5mg/kg) 1 hora antes da injeção com os cristais (E). Os resultados são expressos pela média \pm EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (PBS) e # $p < 0,05$ em relação ao grupo de animais WT que receberam injeção com cristais de MSU. $n = 5-6$ (o experimento foi repetido 2-3 vezes). Gráfico representativo de um experimento

Para avaliar a relevância desses dados no contexto da gota em humanos, a concentração de PTX3 foi mensurada no plasma e no líquido sinovial de pacientes diagnosticados com gota. Os pacientes na fase aguda da doença de duas coortes independentes (Nova Zelândia e Brasil) apresentaram níveis de PTX3 elevados no plasma com relação a indivíduos saudáveis (Figura 5A e B). De maneira interessante, não houve um aumento significativo de PTX3 na fase crônica da doença (pacientes da Nova Zelândia). Também foi detectado altos níveis de PTX3 no líquido sinovial nos pacientes com gota aguda, porém não tivemos fluido sinovial de indivíduos saudáveis como controle negativo para comparação (Figura 5B). Esta concentração foi maior do que a detectada no soro dos mesmos pacientes, embora não tenha sido possível observar uma correlação positiva entre esses dois compartimentos. De forma importante, foi possível observar uma correlação positiva entre a quantidade de PTX3 e IL-1 β no líquido sinovial durante a fase aguda da doença (Figura 5C). Dessa forma, a concentração aumentada de PTX3 durante a fase aguda da gota e sua associação com IL-1 β sugerem que PTX3 participa dos eventos iniciais da inflamação gotosa.

5.1.2. PTX3 facilita a fagocitose de cristais de MSU e ativação celular

PTX3 é uma molécula reconhecida por apresentar atividade opsonizante em diferentes microrganismos promovendo sua eliminação por meio da fagocitose (Moalli *et al.*, 2010). Dessa forma, decidiu-se investigar se PTX3 poderia estar envolvida na fagocitose de cristais de MSU. Para analisar a taxa de fagocitose de cristais de MSU por fagócitos, células do sangue total de camundongo ou células humanas isoladas (neutrófilos e monócitos) foram incubados com os cristais e posteriormente foi feita uma análise por citometria de fluxo, uma vez que células que fagocitam os cristais de MSU, por aumentarem a complexidade interna, apresentam um perfil diferenciado no SSCc - *side scatter* (parâmetro para detectar a dispersão lateral do

laser) (Figura 6). Nessas análises, os neutrófilos de camundongo foram considerados como sendo as células $CD45^+CD11b^{high} LyG6^{high}$ e monócitos de camundongo como $CD45^+CD11b^+LyC6^{high}$.

Para estabelecer um ensaio de fagocitose e avaliar sua consequência na produção de IL-1 β , as células do sangue total de camundongos foram previamente incubadas com citocalasina D, um inibidor de polimerização da actina conhecido por bloquear a fagocitose. Com este tratamento, houve uma diminuição significativa na taxa de fagocitose de cristais de MSU em monócitos (Figura 7A). Confirmando a necessidade da fagocitose dos cristais de MSU para a maturação e liberação de IL-1 β , macrófagos previamente primados com baixas doses de LPS (importante para a produção de pró-IL-1 β e componentes do inflamassoma) e incubados com citoclasina D apresentaram uma menor produção de IL-1 β após serem estimulados com cristais de MSU (Figura 7B).

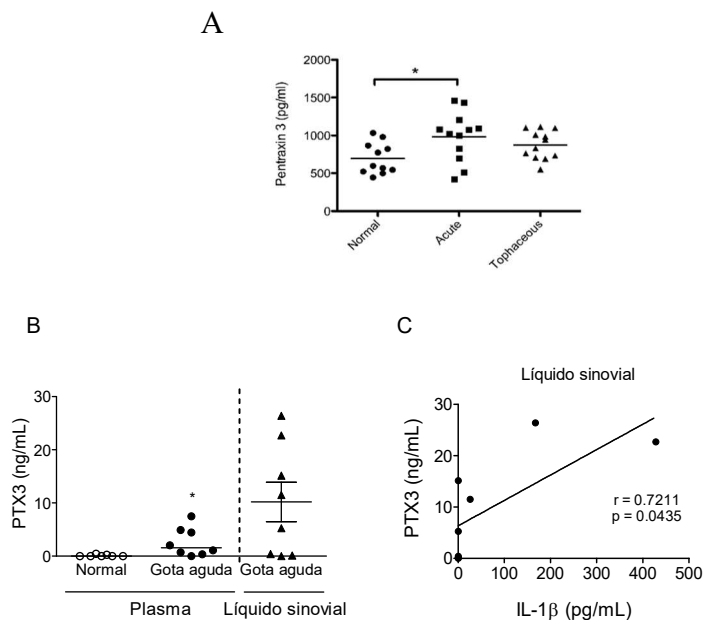


Figura 6: Quantificação de PTX3 em amostras de pacientes com gota. Quantificação de PTX3 no plasma de pacientes com gota na fase aguda em duas coortes diferentes (Nova Zelândia–A e Brasil–B) e durante a fase crônica na coorte da Nova Zelândia (A). Determinação da concentração de PTX3 no líquido sinovial na coorte do Brasil (B). Correlação entre os níveis de PTX3 e IL-1 β no líquido sinovial de pacientes com gota aguda na coorte do Brasil (C). Os resultados são expressos pela média \pm EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

Monócitos que foram incubados com cristais de MSU juntamente com PTX3 recombinante (50 µg/mL) apresentaram um aumento significativo na taxa de fagocitose (Figura 7C). Não houve diferença nesse parâmetro quando utilizamos uma concentração mais baixa de PTX3, como 1 ou 10 µg/mL (dados não mostrados). Além disso, monócitos de animais PTX3^{-/-} apresentaram uma atividade fagocítica reduzida após 15 minutos de incubação com cristais de MSU (Figura 7C). De forma interessante, a incubação dos cristais de MSU por PTX3 recombinante restaurou os níveis de fagocitose de monócitos PTX3^{-/-} aos níveis próximos dos apresentados por animais selvagens (Figura 7C). Na mesma direção, macrófagos primados com baixas doses de LPS e estimulados com cristais de MSU juntamente com PTX3 recombinante apresentaram um aumento significativo na liberação de IL-1β no sobrenadante das células. Macrófagos de animais PTX3^{-/-} tiveram uma produção reduzida desta citocina que foi restaurada quando PTX3 recombinante foi adicionada (Figura 7D). De forma semelhante, os neutrófilos de animais PTX3^{-/-} apresentaram menor taxa de fagocitose e esta foi restaurada quando PTX3 recombinante foi adicionada (Figura 7E). A produção de IL-1β foi analisada apenas em macrófagos por esse tipo celular ser o mais importante para a produção desta citocina no modelo de gota (Martin, Walton e Harper, 2009).

Com relação às células humanas, o mesmo perfil foi observado. Monócitos incubados com cristais de MSU na presença de PTX3 recombinante apresentaram maior taxa de fagocitose dos cristais (Figura 8A). Também foi detectado um aumento na produção de IL-1β no sobrenadante de monócitos previamente primados incubados com MSU+PTX3 recombinante (Figura 8B). Como a clivagem e liberação de IL-1β após a estimulação com cristais é dependente do eixo NLRP3/ASC/caspase-1 (Martinon *et al.*, 2006), a clivagem da caspase-1 foi determinada nos monócitos nas mesmas condições experimentais. Como mostrado na figura

8C, a incubação de PTX3 recombinante aumentou a ativação de caspase-1 dependente de cristais de MSU quando comparado com células tratadas somente com os cristais.

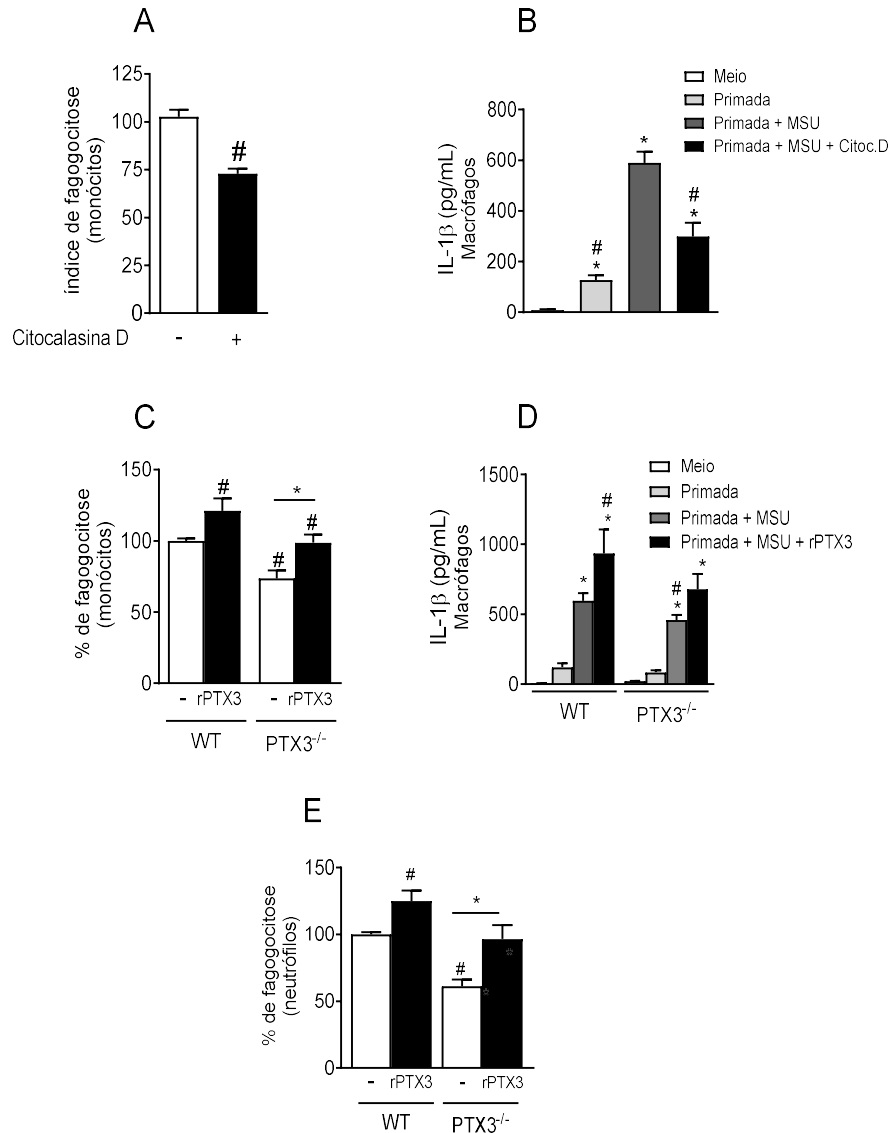


Figura 7: Papel de PTX3 na fagocitose de cristais de MSU em células de camundongos. Células tratadas com citocalasina D (2,5 μ M) 1 hora antes do estímulo com cristais de MSU foram utilizadas como controle e a taxa de fagocitose (A) e produção de IL-1 β (B) foram determinadas em monócitos e macrófagos respectivamente. Sangue total de camundongos selvagens (WT) e PTX3^{-/-} foram incubados com cristais de MSU (150 μ g/mL) por 15 minutos com ou sem PTX3 recombinante (50 μ g/mL) e a taxa de fagocitose foi analisada em monócitos (A e C) e neutrófilos (E). Macrófagos peritoneais, previamente primados com LPS (100 ng/mL) por 1 hora, foram estimulados com cristais de MSU (150 μ g/mL) por 6 horas com ou sem PTX3 recombinante (50 μ g/mL) e a produção IL-1 β por essas células foi determinada (D). Os resultados são expressos pela média \pm EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle e # $p < 0,05$ em relação ao grupo de animais WT estimulado somente com cristais de MSU. $n = 5$ (o experimento foi repetido 3 vezes). Gráfico representativo de um experimento.

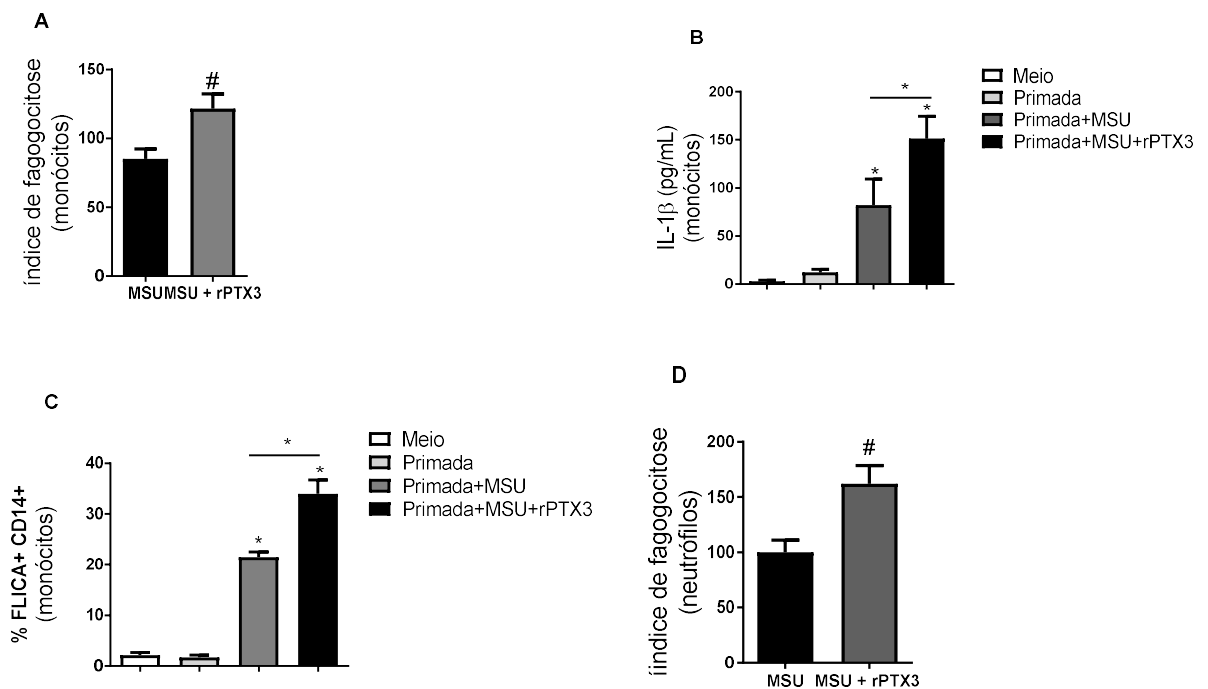


Figura 8: PTX3 facilita a fagocitose de cristais de MSU em células humanas. Monócitos e neutrófilos isolados do sangue total humano foram incubados cristais de MSU (150 $\mu\text{g/mL}$) por 15 minutos com ou sem PTX3 recombinante (50 para neutrófilos e 200 $\mu\text{g/mL}$ para monócitos) e a fagocitose dos cristais foram analisadas em monócitos (A) e neutrófilos (D). Monócitos, previamente primados com LPS (100 ng/mL) por 1 hora, foram incubados com cristais de MSU por 6 horas e a produção de IL-1 β (B) e ativação de caspase-1 (C) foram determinadas. Os resultados são expressos pela média \pm EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle e # $p < 0,05$ em relação ao grupo estimulado com cristais de MSU. $n=3-5$ (o experimento foi repetido 2 vezes). Gráfico representativo de um experimento.

De forma interessante, neutrófilos humanos também apresentaram maior taxa de fagocitose quando PTX3 foi incubada juntamente com cristais de MSU (Figura 8D). Dessa forma, pode-se dizer que PTX3 tem um papel importante na atividade fagocítica de cristais de MSU com consequente ativação de caspase-1 e produção de IL-1 β .

5.1.3. PTX3 contribui para a fagocitose de cristais de MSU em um mecanismo dependente de receptor Fc γ , principalmente Fc γ RIII em camundongos

Como já foi demonstrado que a atividade opsônica de PTX3 favorece o reconhecimento e fagocitose de alguns microrganismos através de receptores do tipo Fc γ , que inclusive foram propostos como sendo receptor de pentraxinas (Lu *et al.*, 2008; Moalli *et al.*, 2010), decidiu-se avaliar a importância desta família de receptores no contexto da inflamação causada por cristais de MSU. Dessa forma, foi investigado a contribuição dos receptores Fc γ na fagocitose dos cristais de MSU induzida por PTX3.

Monócitos de animais deficientes da cadeia γ comum do receptor Fc (FcR γ) apresentaram menor taxa de fagocitose em comparação a células de animais selvagens. De forma interessante, quando PTX3 recombinante foi incubada juntamente com cristais de MSU, os níveis de fagocitose não aumentaram como aconteceu com células de animais selvagens (Figura 9A). Com objetivo de investigar o papel de receptores Fc γ específicos, animais deficientes para Fc γ RIIB (um receptor Fc γ inibitório) e para Fc γ RIII (um receptor Fc γ estimulatório) foram usados. Monócitos tanto de camundongos Fc γ RIIB^{-/-} quanto Fc γ RIII^{-/-} apresentaram níveis similares de fagocitose de cristais de MSU quando comparado às células de animais selvagens. Entretanto, células de camundongos Fc γ RIIB^{-/-}, mas não de Fc γ RIII^{-/-}, apresentaram maior taxa de fagocitose quando PTX3 recombinante foi adicionada (Figura 9B). O mesmo perfil foi encontrado com relação quando a produção de IL-1 β foi analisada. Macrófagos primados que foram estimulados com cristais de MSU apresentaram maiores níveis de IL-1 β no sobrenadante de células de animais WT, FcR γ ^{-/-} (Figura 9C), Fc γ RIIB^{-/-} e Fc γ RIII^{-/-} (Figura 9D) quando comparado às células não estimuladas. Entretanto, a incubação com PTX3 recombinante foi capaz de aumentar a produção de IL-1 β somente em células de

animais WT e $Fc\gamma RIIB^{-/-}$, sem alteração significativa nas células de animais $FcR\gamma^{-/-}$ e $Fc\gamma RIIB^{-/-}$ (Figura 9C e D).

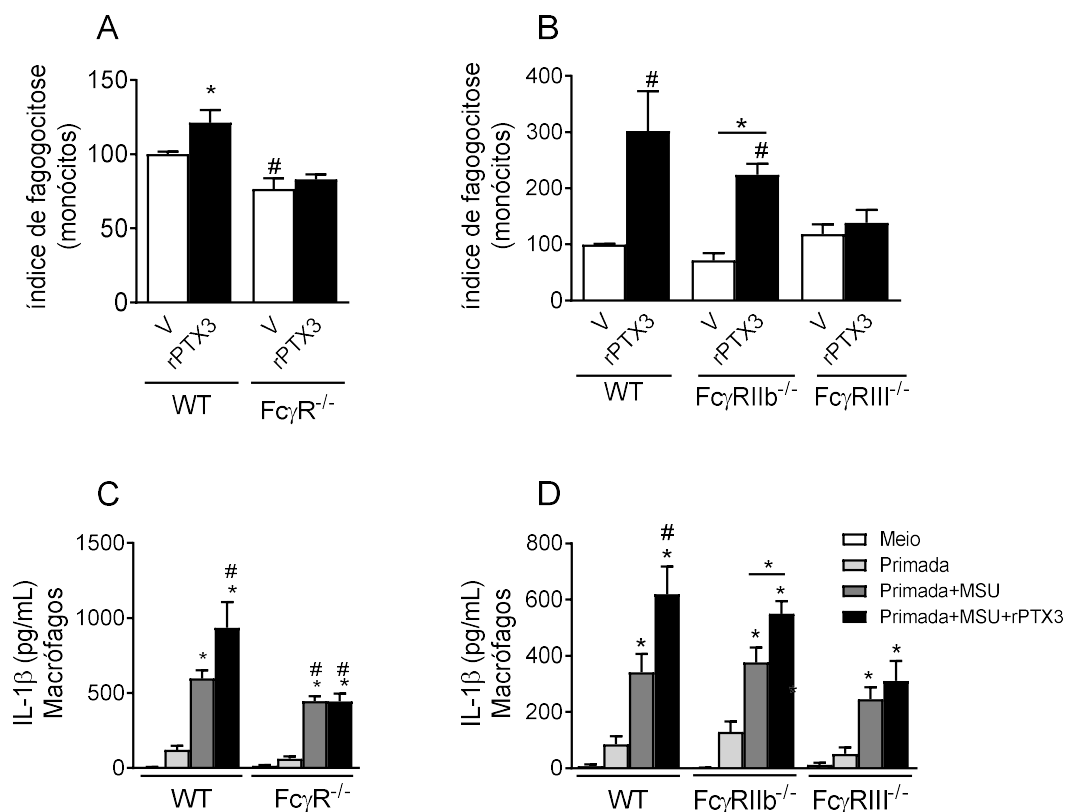


Figura 9: Papel do $FcR\gamma$ na fagocitose de cristais de MSU e produção de IL-1 β mediada por PTX3. Células do sangue total de animais selvagens (WT) ou animais $FcR\gamma^{-/-}$, $Fc\gamma RIIB^{-/-}$ e $Fc\gamma RIIB^{-/-}$ foram incubadas com cristais de MSU (150 $\mu\text{g/mL}$) por 15 minutos com ou sem PTX3 recombinante (50 $\mu\text{g/mL}$) e a taxa de fagocitose foi analisada em monócitos (A e B). Macrófagos peritoneais desses animais, previamente primados com LPS (100 ng/mL) por 1 hora, foram estimulados com cristais de MSU (150 $\mu\text{g/mL}$) por 6 horas e a produção de IL-1 β por essas células foi determinada (C e D). Os resultados são expressos pela média \pm EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle e # $p < 0,05$ em relação ao grupo de animais WT estimulado somente com cristais de MSU. $n = 6-8$ (o experimento foi repetido 2 vezes).

Este perfil de fagocitose foi mantido por neutrófilos. Células de animais $FcR\gamma^{-/-}$ apresentaram menor fagocitose de cristais de MSU comparada a células de animais WT (Figura 10A), enquanto células de animais $Fc\gamma RIIB^{-/-}$ e $Fc\gamma RIIB^{-/-}$ apresentaram uma taxa de fagocitose similar (Figura 10B). Entretanto, a adição de PTX3 recombinante foi capaz de aumentar a taxa de fagocitose somente em neutrófilos de animais selvagens e $Fc\gamma RIIB^{-/-}$, mantendo o nível

basal nas células de animais $FcR\gamma^{-/-}$ e $Fc\gamma RIII^{-/-}$ (Figura 10A e B). Dessa forma, esses dados sugerem que PTX3 facilita a fagocitose de cristais de MSU em um mecanismo dependente de receptor $Fc\gamma$, principalmente de $Fc\gamma RIII$.

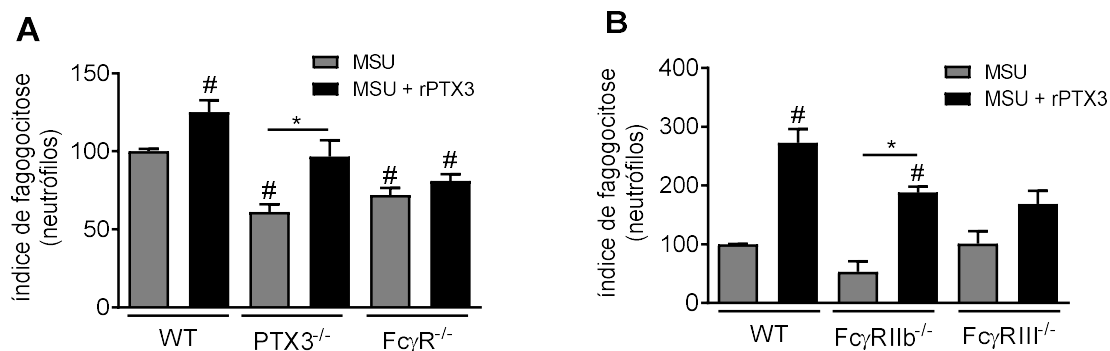


Figura 10: Papel do $FcR\gamma$ na fagocitose de cristais de MSU e produção de $IL-1\beta$ mediada por PTX3 em neutrófilos. Células do sangue total de animais selvagens (WT) ou animais $FcR\gamma^{-/-}$, $Fc\gamma RIIB^{-/-}$ e $Fc\gamma RIII^{-/-}$ foram incubadas com cristais de MSU (150 μ g/mL) com ou sem PTX3 recombinante (50 μ g/mL) e a taxa de fagocitose foi analisada em neutrófilos (A e B). Os resultados são expressos pela média \pm EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle e # $p < 0,05$ em relação ao grupo de animais WT estimulado somente com cristais de MSU. $n=4-5$ (o experimento foi repetido 3 vezes). Gráfico representativo de um experimento.

Com o objetivo de avaliar a relevância destes receptores no contexto da gota, camundongos $FcR\gamma^{-/-}$, $Fc\gamma RIIB^{-/-}$ e $FcR\gamma RIII^{-/-}$ foram injetados com cristais de MSU e os parâmetros inflamatórios, como os níveis de $IL-1\beta$ e CXCL1 no tecido periarticular e o número de neutrófilos na cavidade articular, foram analisados 15 horas após a injeção. Como demonstrado na Figura 11, camundongos $FcR\gamma^{-/-}$ e $Fc\gamma RIII^{-/-}$ (Figura 11A-F) apresentaram um menor nível de inflamação em relação aos animais WT, enquanto camundongos $Fc\gamma RIIB^{-/-}$ não apresentaram alteração significativas nos parâmetros inflamatórios analisados (Figura 11G-I). Esses dados mostram a importância relativa de cada receptor no modelo experimental de gota.

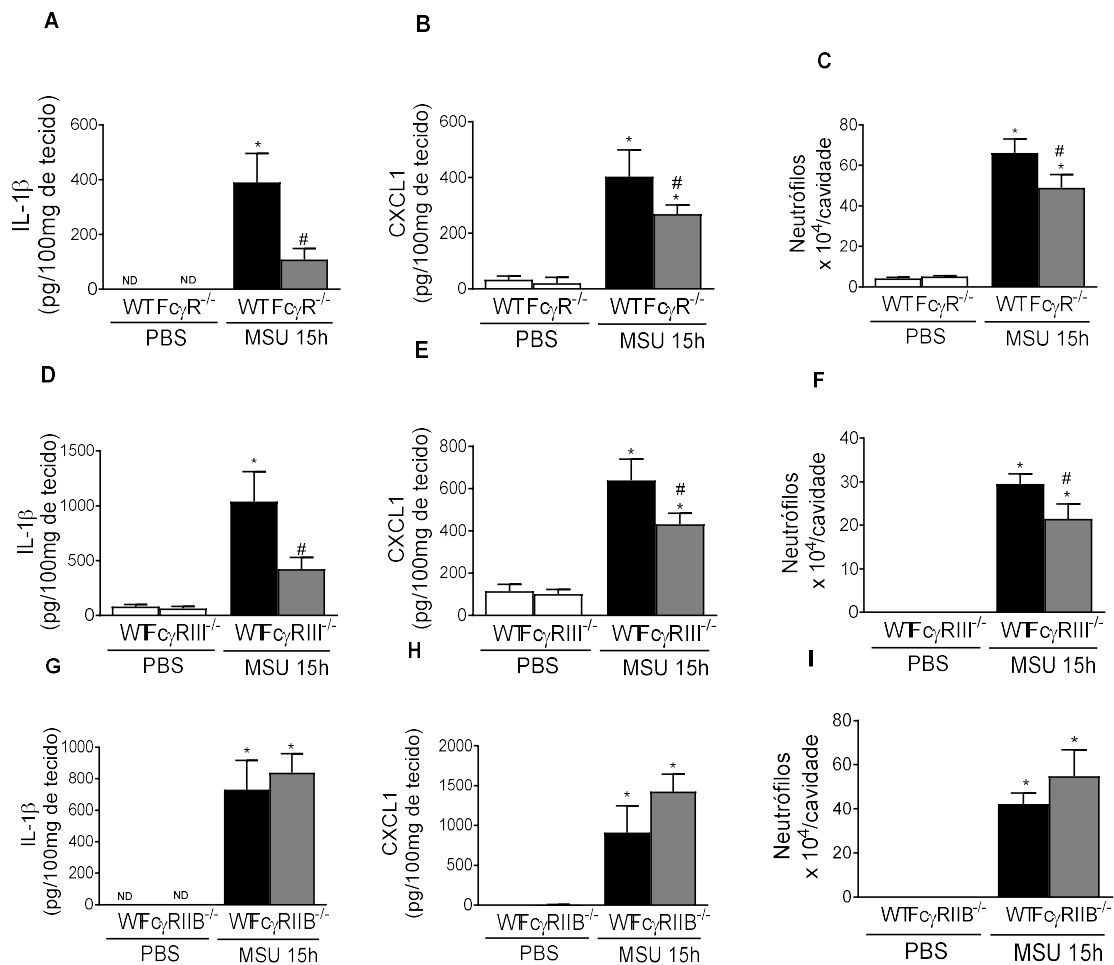


Figura 11: Papel dos receptores FcR γ na inflamação causada por cristais de MSU *in vivo*. Camundongos selvagens (WT), FcR γ ^{-/-}, Fc γ RIIB^{-/-} e Fc γ RIII^{-/-} foram injetados na articulação com cristais de MSU (100 μ g/cavidade). 15 horas depois, os animais foram eutanasiados para quantificação de IL-1 β (A, D, G) e CXCL1 (B, E, H) no tecido periarticular e o acúmulo de neutr3filos na cavidade articular (C, F, I). Os resultados são expressos pela média \pm EPM. * p < 0,05 em relação ao grupo controle e # p < 0,05 em relação ao grupo de animais WT injetados com cristais de MSU. n=5-8 (o experimento foi repetido 2 vezes). Gráfico representativo de um experimento.

Resumindo, os dados mostrados nesta parte do trabalho evidenciam o papel de PTX3 como facilitador da fagocitose de cristais de MSU via receptor Fc γ , principalmente Fc γ RIII. A partir de agora o estudo será sobre outra classe de moléculas regulatórias na gota, os microRNAs.

5.2. Papel de microRNAs na inflamação induzida por cristais de MSU

Estudos preliminares do nosso grupo de pesquisa mostraram que a injeção de cristais de MSU na articulação tíbio-femoral de camundongos foi capaz de induzir um aumento na expressão de vários microRNAs no tecido periarticular. Dentre os 384 microRNAs analisados, aqueles que foram superexpressos em relação ao grupo controle (injeção de PBS) estão registrados na Tabela 1. Os maiores aumentos registrados estão destacados em negrito e sublinhados (Tabela 1).

microRNAs	Aumento relativo com relação ao controle			
	3h	6h	15h	24h
mmu-miR-130b	<u>3,16</u>	<u>2,08</u>	<u>3,90</u>	<u>3,73</u>
mmu-miR-135a	1,50	<u>3,68</u>	<u>6,14</u>	<u>2,81</u>
mmu-miR-135b	0,61	<u>2,88</u>	1,66	1,18
mmu-miR-137	<u>2,97</u>	ND	ND	ND
mmu-miR-142-3p	0,96	1,65	<u>3,15</u>	<u>2,51</u>
mmu-miR-142-5p	1,12	1,10	<u>2,95</u>	<u>2,40</u>
mmu-miR-184	<u>2,46</u>	0,68	0,99	1,01
mmu-miR-18a	1,89	1,66	1,76	<u>2,17</u>
mmu-miR-197	<u>4,33</u>	<u>3,62</u>	<u>5,25</u>	<u>10,14</u>
mmu-miR-200c	<u>0,99</u>	<u>1,38</u>	<u>2,50</u>	<u>1,08</u>
mmu-miR-202-3p	ND	ND	<u>4,07</u>	0,54
mmu-miR-223	1,79	<u>5,25</u>	<u>6,51</u>	<u>3,82</u>
mmu-miR-335-3p	<u>2,13</u>	1,11	1,09	1,65
mmu-miR-338-3p	<u>4,11</u>	1,14	<u>2,48</u>	<u>3,40</u>
mmu-miR-342-5p	1,61	0,38	<u>2,12</u>	1,41
mmu-miR-351	<u>2,18</u>	ND	ND	ND
mmu-miR-376b	1,50	ND	1,55	<u>2,56</u>
mmu-miR-467b	ND	<u>2,79</u>	1,21	<u>2,14</u>
mmu-miR-496	<u>3,01</u>	ND	ND	ND
mmu-miR-674	<u>2,16</u>	0,45	0,2	0,26
mmu-miR-680	<u>2,54</u>	<u>2,11</u>	<u>6,15</u>	1,07
mmu-miR-682	<u>3,42</u>	<u>2,83</u>	1,39	1,81
mmu-miR-685	<u>2,23</u>	<u>2,25</u>	1,24	1,66
mmu-miR-7a	1,29	1,94	0,46	<u>3,02</u>

Tabela 1: Expressão dos microRNAs. Expressão dos microRNAs superexpressos no tecido periarticular horas após injeção de cristais de MSU (medido por *TaqMan Low Density Array 384;well microfluidic card*). Os dados foram analisados e os valores de expressão relativa foram calculados usando *snor202* como controle endógeno.

5.2.1. Inflamação induzida por cristais de MSU leva à superexpressão dos microRNAs 135a, 135b, 146a, 155 e 223 no tecido periarticular

Com intuito de comprovar se a inflamação induzida por cristais de MSU leva a um aumento na expressão de certos microRNAs já evidenciados em estudos prévios do grupo, foi feita a reação de qPCR para cada microRNA separadamente. Como vários microRNAs foram superexpressos nessa resposta inflamatória, decidiu-se focar em apenas alguns deles. Dessa forma, os microRNAs escolhidos foram: microRNA-135b, uma vez que existe um trabalho mostrando que ele é induzido por IL-1 α e regula a expressão de caspase-1 e IL-1R1 (Halappanavar *et al.*, 2013); microRNA-135a, por ser da mesma família do anterior; microRNA-146a porque já foi mostrado a relação deste microRNA com a inflamação causada por cristais de MSU, porém os resultados obtidos em humanos foram controversos aos apresentados em camundongos (Dalbeth *et al.*, 2015); microRNA-155, por ser um microRNA extensivamente estudado e considerado como um marcador inflamatório (Jin *et al.*, 2014a); e microRNA-223, que é capaz de regular o inflamassoma NLRP3 e o recrutamento de neutrófilos, eventos importantes para a inflamação gotosa (Bauernfeind *et al.*, 2012; Dorhoi *et al.*, 2013).

Foi possível observar que todos estes microRNAs foram superexpressos após injeção de cristais de MSU, porém a cinética de indução apresentada por eles foram diferentes entre si. O microRNA-146a e o microRNA-155 foram induzidos na fase inicial da inflamação, ou seja, 3 horas após injeção de cristais de MSU (Figura 12C e D), enquanto o microRNA-135a, 135b e 223 foram superexpressos durante o pico da inflamação, 6 e 15 horas após a injeção (Figura 12A, B e E).

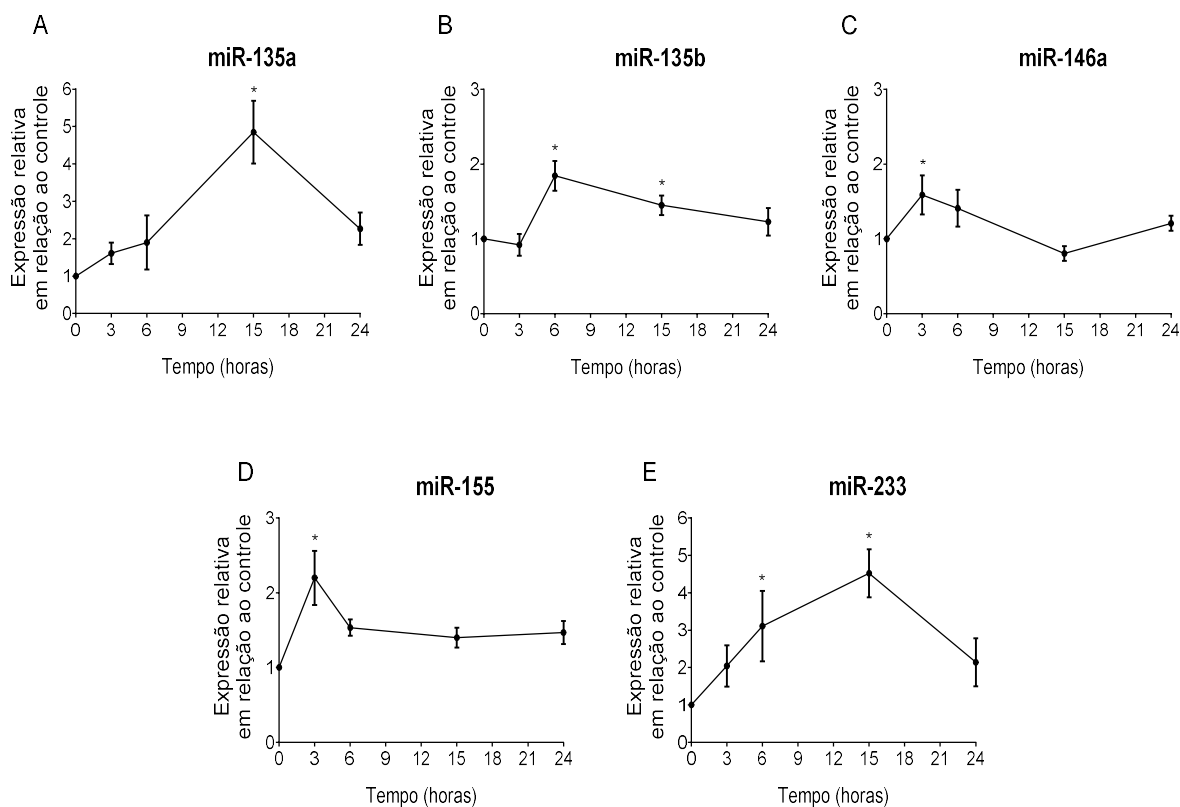


Figura 12: Cinética de expressão de microRNAs na inflamação induzida por cristais de MSU. Expressão relativa dos microRNAs 135a (A), 135b (B), 146a (C), 155 (D) e 233 (E) no tecido periarticular após 3, 6, 15 e 24 horas de injeção de cristais de MSU (100 µg/cavidade) na articulação tibio-femoral. Os resultados são expressos pela média ± EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. $n = 4-5$ (o experimento foi repetido 2 vezes). Gráfico representativo de um experimento.

5.2.2. Os microRNAs 135a, 135b, e 155 são superexpressos em macrófagos isolados do lavado sinovial de animais após injeção de cristais de MSU

Com objetivo de identificar qual tipo celular seria o responsável pelo aumento na expressão desses microRNAs, macrófagos e neutrófilos foram isolados do lavado sinovial 15 horas após a injeção dos cristais de MSU e a expressão dessas moléculas foram determinadas. Os macrófagos residentes, juntamente com outro subtipo de sinoviócito (fibroblastos), são as primeiras células que entram em contato com cristais de MSU na cavidade sinovial, sendo importantes para o início de toda a resposta inflamatória. Já o neutrófilo é a principal célula

efetora desta doença que chega ao tecido devido à ação de diferentes agentes quimiotáticos. Assim, decidimos focar nestes dois tipos celulares. As células analisadas foram obtidas do lavado sinovial após 15 horas de injeção de cristais de MSU (Amaral *et al.*, 2012). Com isso, foi possível observar que, em macrófagos, houve um aumento na expressão dos microRNAs 135a, 135b e 155 (Figura 13A), enquanto em neutrófilos apenas o microRNA-135b foi superexpresso (Figura 13B).

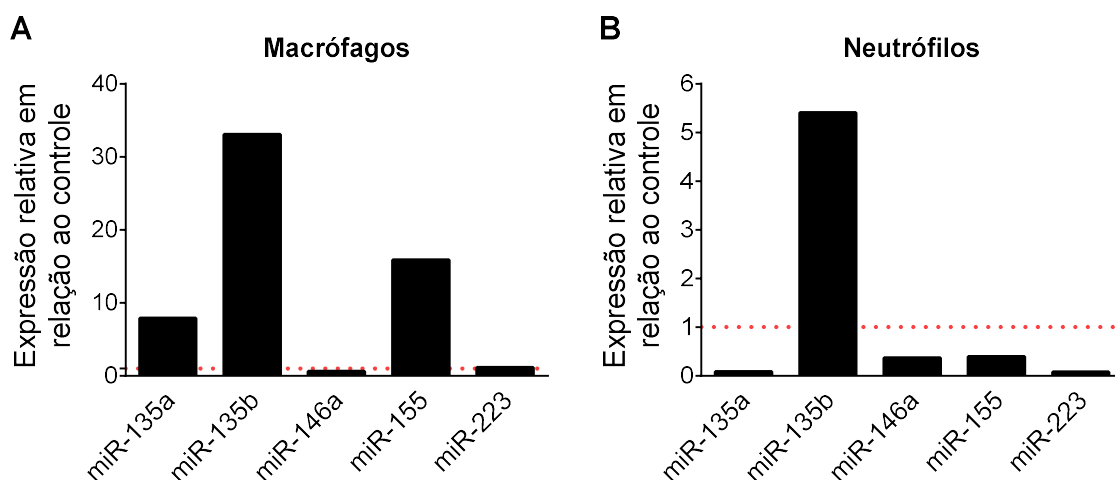


Figura 13: Expressão dos microRNAs em células isoladas do lavado sinovial após estímulo com cristais de MSU. Expressão relativa dos microRNAs 135a, 135b, 146a, 155 e 223 em macrófagos F4/80⁺ (macrófagos do lavado comparados com macrófagos do peritônio) (A) e em neutrófilos LY6G⁺ (neutrófilos do lavado comparados com neutrófilos da medula óssea) (B), isolados do lavado sinovial após 15 horas de injeção de cristais de MSU (100 µg/cavidade). Foi utilizado um pool de 8 camundongos.

5.2.3 Os microRNAs 135b e 155 são superexpressos em macrófagos isolados do lavado peritoneal de animais após injeção de cristais de MSU

A injeção de cristais de MSU na articulação induz um recrutamento celular, principalmente de neutrófilos, conforme demonstrado (Amaral *et al.*, 2012). Porém, devido ao tamanho da cavidade articular, a recuperação de células não é suficiente para alguns tipos de análises, havendo a necessidade de fazer um pool de células como observado na Figura 13.

Assim, foi decidido utilizar a cavidade peritoneal dos animais uma vez que ela nos permite a recuperação de uma maior quantidade de células, principalmente nos animais controle (injeção de PBS). Além disso, também foi do nosso interesse analisar o que estava acontecendo com relação a expressão desses microRNAs quando a inflamação induzida por cristais de MSU ocorria em um outro local anatômico. Dessa forma, 12 horas após a injeção de cristais de MSU, tempo aproximado que representa o pico da inflamação neste modelo (Martin, Walton e Harper, 2009), foi realizada uma lavagem da cavidade peritoneal e posterior análise da expressão de microRNAs em macrófagos e neutrófilos isolados. Verificamos que macrófagos nessas condições apresentaram uma superexpressão dos microRNA-135b e 155, (Figura 14A) enquanto que em neutrófilos houve uma superexpressão dos microRNA-146a e 155 (Figura 14B).

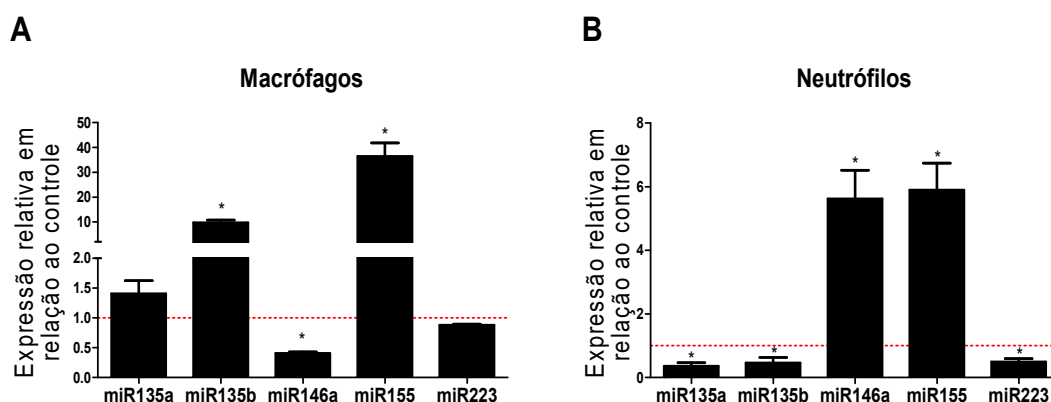


Figura 14: Expressão dos microRNAs em células isoladas do lavado peritoneal induzidas por cristais de MSU. Expressão relativa dos microRNAs 135a, 135b, 146a, 155 e 223 macrófagos (A) F4/80⁺ (macrófagos do lavado peritoneal comparados com macrófagos do mesmo lavado) e em neutrófilos (B) LY6G⁺ (neutrófilos do lavado peritoneal comparados com neutrófilos da medula óssea), isolados do lavado peritoneal após 12 horas de injeção de cristais de MSU (3 mg/cavidade). Os resultados são expressos pela média ± EPM. * p<0,05 em relação ao grupo controle. n=4-5. Gráfico representativo de um experimento.

5.2.4. O microRNA 135b é superexpresso em macrófagos derivados de medula óssea (BMDM) primados com LPS e estimulados com cristais de MSU

Como a utilização de modelos *in vivo*, apesar de ser mais completa, é muito complexa para se estudar mecanismos, decidiu-se adequar o estudo para um protocolo *in vitro* que mimetizasse a mesma situação que ocorre *in vivo*. Para isso macrófagos derivados de medula foram primados com LPS em baixas doses e posteriormente estimulados com cristais de MSU por 6 ou 15 horas. Essa pré estimulação com baixas doses de LPS, conhecida como primagem, é uma estratégia bastante utilizada para a produção da molécula pró-IL-1 β e também de alguns componentes do inflamassoma.

O estímulo isolado com cristais de MSU não foi capaz de induzir um aumento na expressão dos microRNAs analisados. Por outro lado, o estímulo somente com LPS levou a um aumento na expressão dos microRNA-135a, 135b, 146a, 155 e 223 (Figura 15). Este resultado indica que estes microRNAs são sensíveis ao estímulo de LPS. Entretanto, o aumento na expressão induzido pelo estímulo conjunto de cristais de MSU e LPS, que, em teoria, mimetiza melhor uma situação *in vivo*, foi significativamente diferente da induzida somente pelo estímulo de LPS apenas para o microRNA-135b (Figura 15B). Como este microRNA foi o único induzido nesta situação (LPS+MSU), decidiu-se aprofundar na análise da cinética de indução do mesmo. Para isso este microRNA também foi quantificado 3 e 24 horas após as células serem estimuladas. Porém, nestes pontos não foi possível observar alteração na expressão do microRNA-135b. Dessa forma, pode-se dizer que a primagem mais estímulo com cristais de MSU em BMDMs induziu apenas a expressão do microRNA-135b.

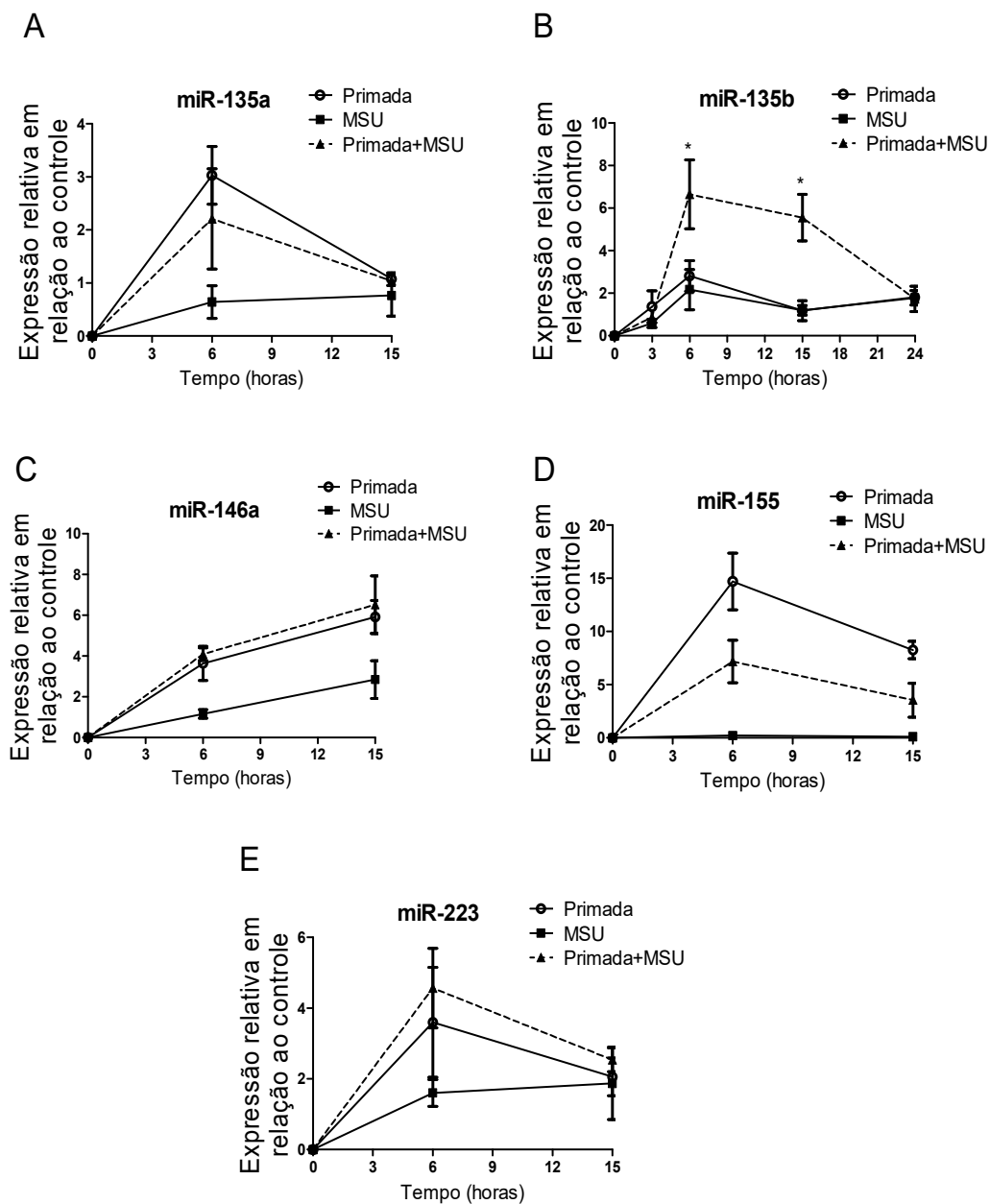


Figura 15: Expressão dos microRNAs em BMDMs induzida por cristais de MSU. Expressão relativa dos microRNAs 135a (A), 135b (B), 146a (C), 155 (D) e 223 (E) em BMDMs após estímulos com LPS (10 ng/mL por 15 horas), cristais de MSU (150 µg/mL) ou os dois em conjunto (LPS por 15 horas e depois cristais de MSU). Os resultados são expressos pela média ± EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo primado. $n=3$ (o experimento foi repetido 3 vezes). Gráfico representativo de um experimento.

5.2.5. Perfil de citocinas produzidas por BMDMs após o estímulo com cristais de MSU

Para investigar as moléculas que poderiam participar da produção do microRNA 135b no contexto da gota, BMDMs foram previamente primadas com baixas doses de LPS e as citocinas produzidas foram avaliadas no sobrenadante da cultura 6 e 15 horas após o estímulo com cristais de MSU. Foi possível observar que apenas o estímulo LPS mais MSU levou a produção de IL-1 β , CXCL1, CXCL2 e IL-6 por BMDMs (Figura 16A-D). Entretanto, a produção de CCL5, que foi induzida pelo estímulo com LPS não foi alterada quando MSU foi adicionado ao meio (Figura 16E).

5.2.6. A expressão do microRNA-135b é induzida por IL-1 β e é dependente da via de sinalização desta citocina

Como IL-1 β é uma citocina crucial para o desenvolvimento da gota, decidiu-se avaliar a sua importância na modulação da expressão dos microRNAs analisados. Para isso, BMDMs de animais selvagens foram estimulados com IL-1 β recombinante. Além disso, com o intuito de elucidar a importância da via de sinalização desta citocina para a expressão desses microRNAs, BMDMs de animais deficientes de IL-1R1 (IL-1R1^{-/-}) foram primadas com LPS e posteriormente estimuladas com cristais de MSU para verificar a expressão dos mesmos. Foi possível observar que os microRNA-135a, 135, 146a e 155 (Figura 17A-D) foram induzidos após o estímulo com IL-1 β , mostrando que esta citocina é importante para a modulação dos mesmos.

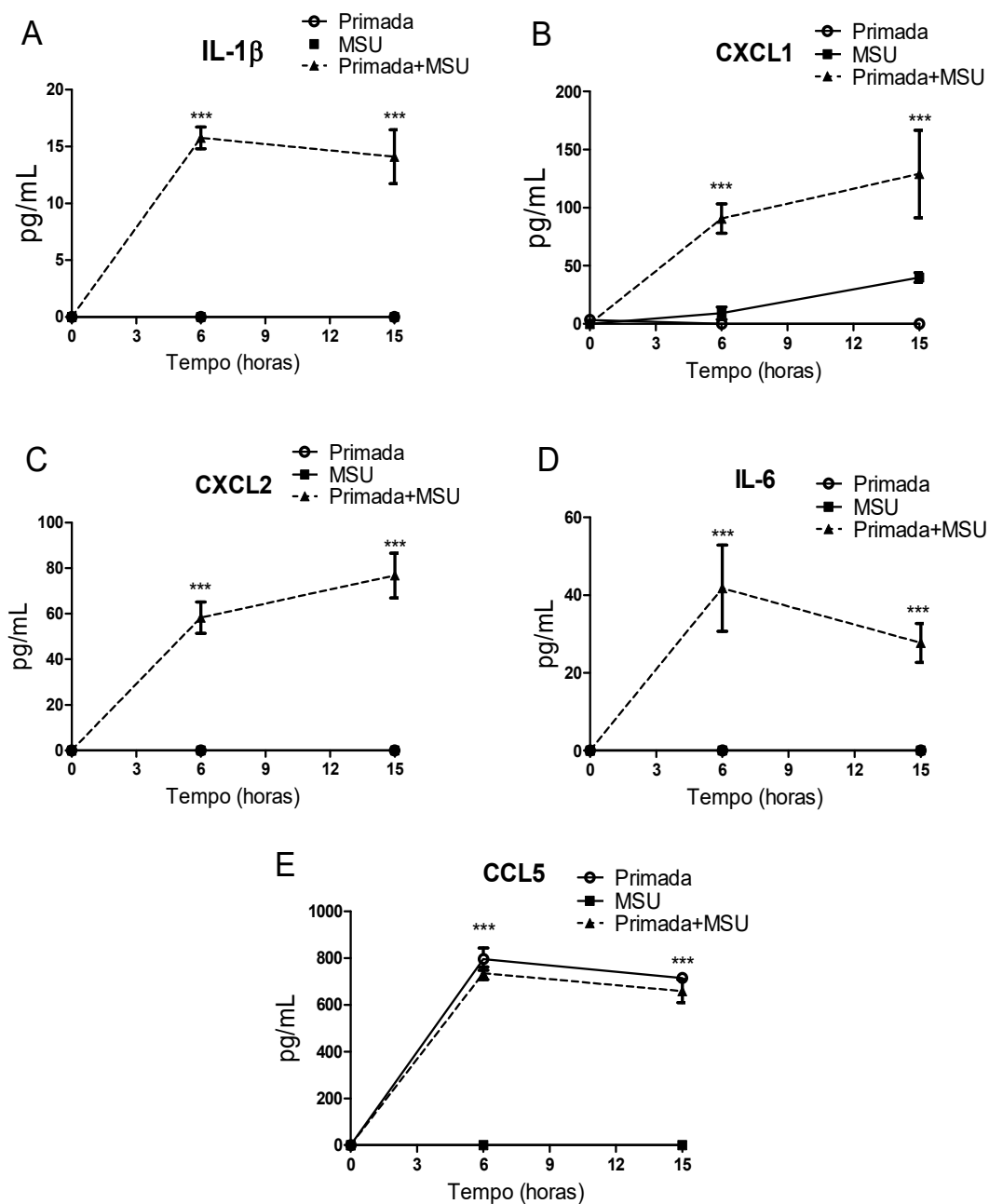


Figura 16: Produção de citocinas por BMDMs induzidas por cristais de MSU. Produção de citocinas por BMDMs após estímulos com cristais de MSU (150 $\mu\text{g}/\text{mL}$), LPS (10 ng/mL por 15 horas) ou os dois em conjunto (LPS por 15 horas e depois cristais de MSU). IL-1 β (A), CXCL1 (B), CXCL2 (C), IL-6 (D) e CCL5 (E). Os resultados são expressos pela média \pm EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. $n=3$ (o experimento foi repetido 3 vezes). Gráfico representativo de um experimento.

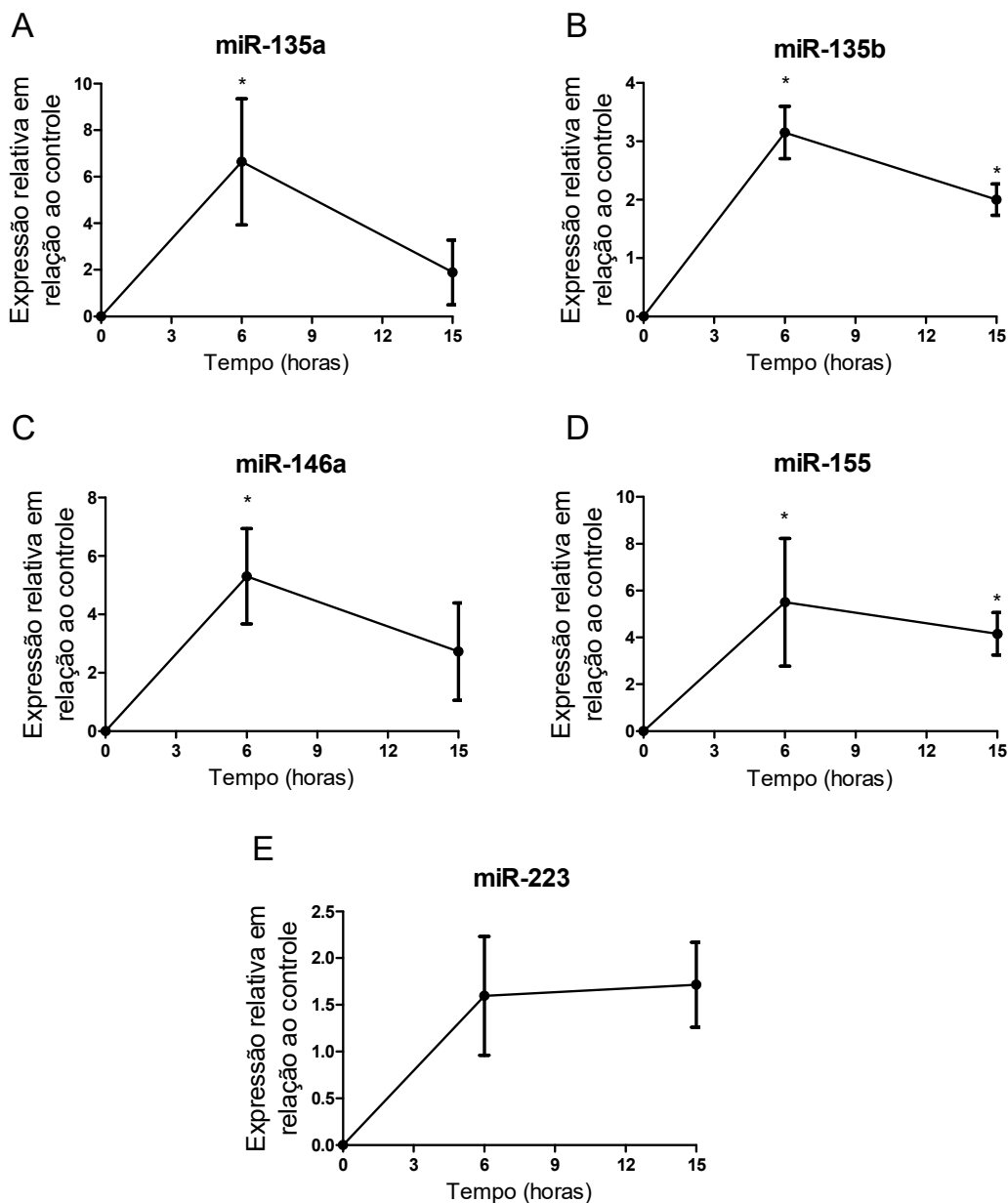


Figura 17: Expressão dos microRNAs em BMDMs induzida por IL-1 β . Expressão relativa de microRNAs 135a (A), 135b (B), 146a (C), 155 (D) e 223 (E) em BMDMs após estímulo com IL-1 β recombinante - 20ng/mL por 6 horas (A, C, E, G e I). Os resultados são expressos pela média \pm EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. $n=3$ (o experimento foi repetido 2 vezes). Gráfico representativo de um experimento.

Entretanto, ao analisar se a via de sinalização de IL-1 β era essencial para produção desses microRNAs induzidos por LPS + cristais de MSU, utilizando células de animais KO

para IL-1R1, foi possível observar que apenas a expressão de microRNA-135b e 146a eram dependentes desta via (Figura 18B e C).

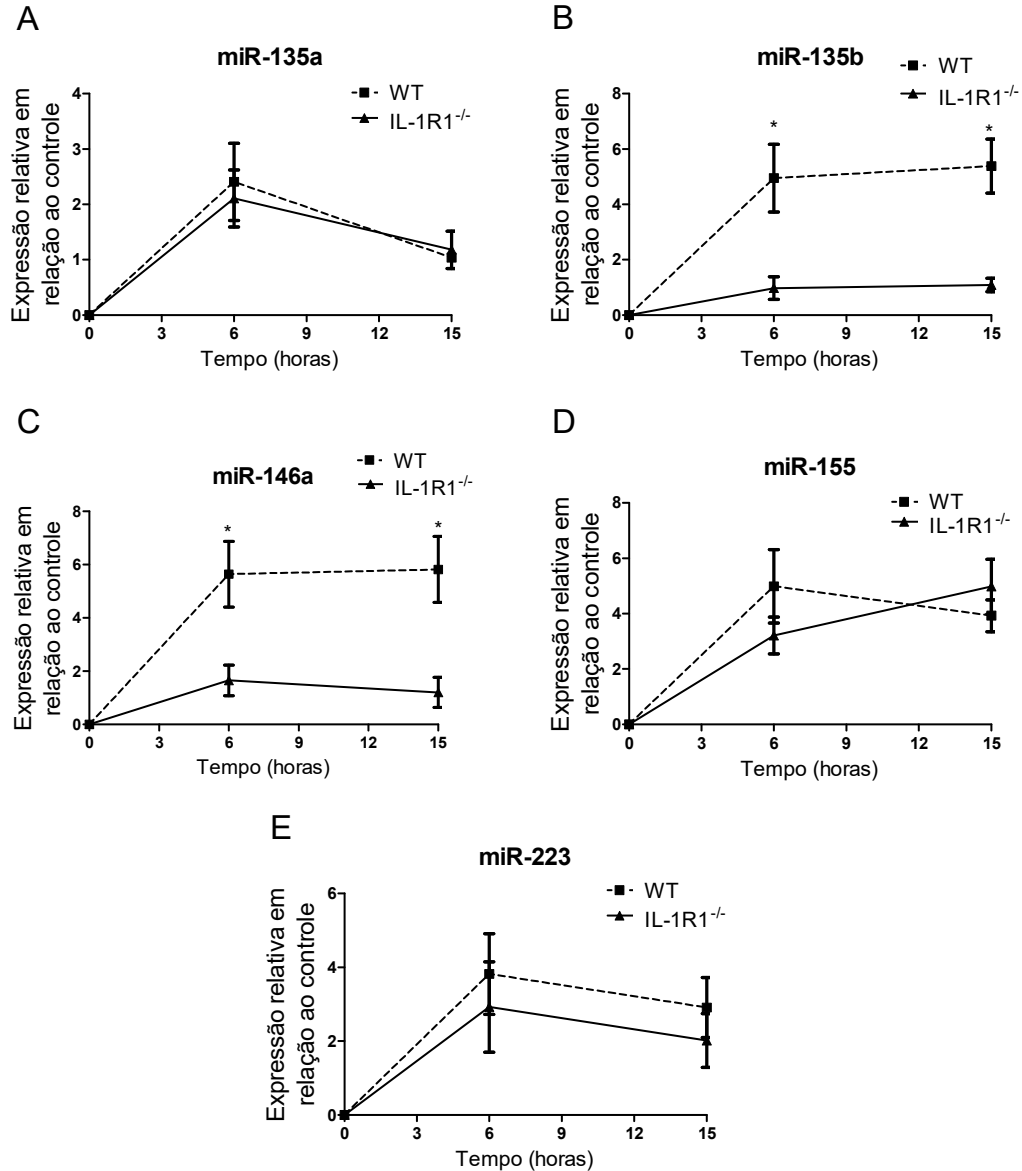


Figura 18: Expressão dos microRNAs induzidas por cristais de MSU em BMDMs de animais deficientes para IL-1R1. Expressão relativa dos microRNAs 135a (A), 135b (B), 146a (C), 155 (D) e 223 (E) em BMDMs de animais WT e IL-1R1^{-/-} após estímulo com LPS (10 ng/mL por 15 horas) e cristais de MSU (150 µg/mL por 6 horas) (B, D, F, H e J). Os resultados são expressos pela média ± EPM. * p<0,05 em relação ao grupo controle. n=3 (o experimento foi repetido 3 vezes). Gráfico representativo de um experimento.

5.2.7. A expressão do microRNA 135b não é modulada em neutrófilos primados com LPS e estimulados com cristais de MSU

Dentre os microRNAs analisados a indução do microRNA-135b por cristais de MSU foi a mais consistente e interessante nos experimentos realizados (após injeção de cristais de MSU *in vivo*, após estímulo com LPS e cristais de MSU *in vitro*, após o estímulo direto da citocina IL-1 β *in vitro* e ao utilizar células de animais IL1R1^{-/-} também *in vitro*). Dessa forma, decidiu-se focar especificamente neste microRNA para o estudo de seus possíveis alvos e sua relevância no modelo de gota.

Com objetivo de analisar se o aumento da expressão do microRNA-135b visto em BMDMs primados e estimulados com cristais de MSU também aconteceria em neutrófilos, essas células foram purificadas da medula óssea, primadas com LPS por 1 hora e estimuladas por 6 horas com cristais de MSU. Em seguida, foram avaliadas a produção de IL-1 β e a expressão de microRNA-135b. Foi possível observar que este tempo de estímulo foi suficiente para que houvesse produção de IL-1 β (Figura 19A), entretanto não houve um aumento significativo na expressão do microRNA-135b (Figura 19B). Este resultado indica que em neutrófilos o estímulo LPS mais cristais de MSU não resultou na indução da expressão do microRNA-135b como aconteceu em macrófagos.

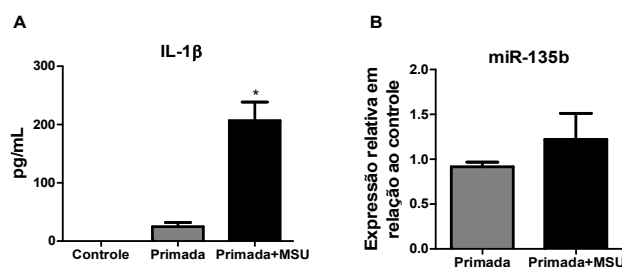


Figura 19: Expressão do microRNA-135b em neutrófilos após estímulo com cristais de MSU. Produção de IL-1 β (A) e expressão relativa do microRNA-135b (B) em neutrófilos de medula estimulados com LPS (100 ng/mL por 1 hora) e cristais de MSU (150 μ g/mL por 6 horas). Os resultados são expressos pela média \pm EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. $n=3$ (o experimento foi repetido 3 vezes). Gráfico representativo de um experimento.

5.2.8. Validação de alvos do microRNA-135b

Com o intuito de identificar potenciais alvos do microRNA-135b, um estudo *in silico* através do uso de banco de dados de diferentes softwares foi feito. Os programas utilizados para esta análise foram: Targetscan, MIRANDA e MicroRNA.org. Como o interesse era em proteínas importantes para a via de sinalização da IL-1 β e ativação do inflamassoma NLRP3 (vias cruciais para a inflamação induzida por cristais de MSU), decidiu-se focar nessas moléculas. A Tabela 2 mostra os genes escolhidos dessas vias, os quais foram preditos pelos programas utilizados e aqueles que já foram inclusive validados.

Alvos	Alvo predito por pelo menos 1 software	Alvo predito pelos três softwares usados	Alvo validado
IL-1 α			
IL-1 β	x	x	
IL-1R1	x	x	x
IL-1RAcP	x	x	
TOLLIP	x		
MyD88	x	x	
TRAF6			
Panexina1	x		
CatepsinaB	x		
NLRP3			
Caspase1	x	x	x

Tabela 2: Alvos preditos do microRNA-135b por diferentes softwares. Os softwares utilizados foram Targetscan, MIRANDA e MicroRNA.org.

A escolha desses genes foi feita baseando-se nas proteínas envolvidas em diferentes níveis da via de sinalização de IL-1 β e ativação de NLRP3. Por exemplo, dentro da via de

sinalização de IL-1 β foi escolhida IL-1 β e IL-1 α , que são proteínas desencadeadoras da via; IL-1R1 e IL-1RAcP, proteínas de superfície importantes no reconhecimento da citocina; e finalmente MyD88, TOLLIP e TRAF6, que são proteínas importantes para sinalização da via.

Os genes preditos pelos três softwares utilizados foram: IL-1 β , IL-1R1, IL-1RAcP, MyD88 e caspase-1. Como geralmente os microRNAs desestabilizam e degradam os seus RNA mensageiros alvos (Baek *et al.*, 2008), determinamos a expressão desses genes em BMDMs estimulados com baixas doses de LPS e MSU. De forma interessante, foi possível observar uma relação inversa entre a expressão desses genes e a expressão do microRNA-135b, indicando que eles poderiam de fato ser possíveis alvos deste microRNA (Figura 15 e 20). O gene do receptor IL-1R1 não foi analisado pois ele já é um alvo validado do microRNA-135b.

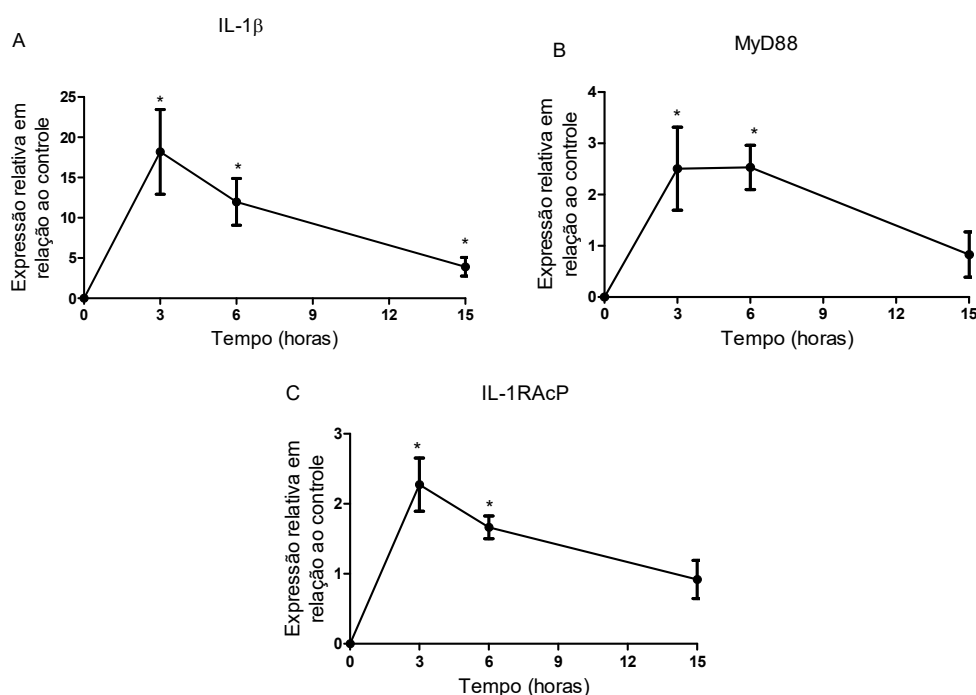


Figura 20: Expressão dos possíveis alvos do microRNA-135b. Expressão de IL-1 β (A), MyD88 (B) e IL-1RAcP (C) em BMDMs estimuladas com LPS (10 ng/mL por 15 horas) e posteriormente com cristais de MSU (150 μ g/mL por 6 horas). Os resultados são expressos pela média \pm EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. $n=3$ (o experimento foi repetido 3 vezes). Gráfico representativo de um experimento.

Posteriormente foi feito o ensaio de luciferase para validar esses possíveis alvos. Para isso, regiões específicas 3'UTR, indicadas pelos programas de predição, dos genes IL-1 β , MyD88, IL-1RAcP e IL-1R1, foram clonados dentro de um vetor de expressão para posterior execução do ensaio de luciferase, o qual investiga a estabilidade da região 3'-UTR quando o microRNA-135b é superexpresso. Neste ensaio, a diminuição da luminescência relativa significa uma interação direta entre o gene e o microRNA que foi transfectado na célula. Este evento mostra que aconteceu o *binding* entre eles, indicando que possivelmente esse gene é alvo do microRNA em questão.

Ao realizar o ensaio de luciferase foi possível confirmar que IL-1R1 de fato era alvo do microRNA-135b, como já havia sido publicado (Halappanavar *et al.*, 2013). Dessa forma, ele foi utilizado como um controle positivo do ensaio (Figura 21A). Já o ensaio de luciferase com IL-1 β não mostrou nenhuma diferença com relação ao controle, indicando que não existe interação física entre este gene e o microRNA em questão (Figura 21B). De forma interessante, tanto para o gene de MyD88 e IL-1RAcP houve diminuição na atividade de luciferase indicando que eles são possíveis alvos para o microRNA-135b (Figura 21C e D). Além disso, quando as regiões *seed* para este microRNA nos genes IL-1RAcP e MyD88, indicadas pelo aplicativo Targetscan, foram mutadas a atividade de luciferase retornou a níveis do controle mostrando a especificidade da interação e indicando que estas de fato são as regiões de *binding* entre o 3'-UTR dos genes e o microRNA-135b.

Regiões de *binding*: MyD88: GTCTGGGGGAGGAATGAGGCCT e

IL-1RAcP: GTCCATGGCACATGGCCTTCAA.

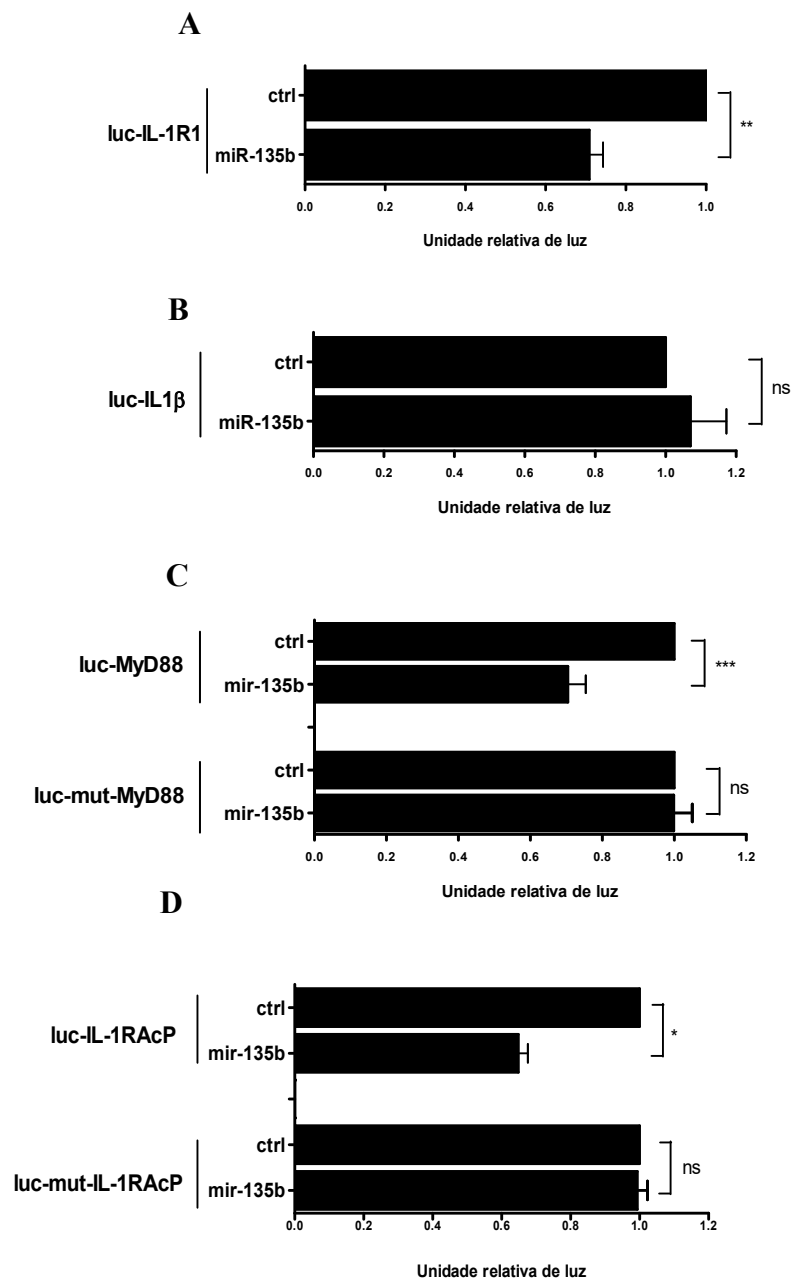


Figura 21: Validação dos alvos do microRNA-135b. Ensaio de luciferase para validar IL-1R1 (A), IL-1β (B), MyD88 (C) e IL-1RAcP (D) como alvos do microRNA-135b. Fibroblasto da linhagem NIH3T3 foram plaqueados e após 24 horas foram transfectados com os 100 ng dos diferentes construtos e 10 μM do mimético do microRNA-135b ou uma sequência *scramble* para controle. Após 48 horas, as células foram lisadas e a atividade luciferase de *firefly* e *renilla* foram determinadas. Os resultados são expressos pela média ± EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. $n=3$ (o experimento foi repetido 3 vezes). Gráfico representativo de um experimento.

Para verificar se esta interação entre microRNA-135b e 3'-UTR dos diferentes genes em estudo, observada anteriormente com o ensaio de luciferase, também ocorria de uma forma mais fisiológica, foi realizado um experimento de ganho de função em que este microRNA foi superexpresso em BMDMs, os quais foram, em seguida, estimulados com cristais de MSU após serem primados com baixas doses de LPS. Com a superexpressão do microRNA-135b nos macrófagos foi possível observar, através de qPCR, um aumento de cerca de 500 vezes deste microRNA quando comparado com células que foram transfectadas apenas com *scramble*, que é uma sequência usada como controle (Figura 22A). Após a superexpressão do microRNA-135b, foi possível observar uma significativa redução na expressão gênica de MyD88 e IL-1RAcP, alvos validados pelo ensaio de luciferase como (Figura 22B e C), mostrando a relevância biológica da interação 3'-UTR destes genes e o microRNA-135b. De forma interessante, o gene da IL-1 β também sofreu redução na sua expressão. Como esse gene não se mostrou um alvo direto do microRNA-135b para a região clonada do teste da luciferase, pode-se dizer que ou ele é um alvo indireto do mesmo ou se liga a uma outra sequência do 3'UTR não clonada. Além disso, IL-1 β em nível proteico também apresentou menor produção quando o microRNA-135b foi superexpresso (Figura 22E).

5.2.9. Avaliação da relevância do microRNA-135b *in vivo*

Com o objetivo de elucidar a relevância *in vivo* do microRNA-135b, utilizamos um inibidor deste microRNA e analisamos os efeitos na inflamação induzida por cristais de MSU. Para isso, foram utilizados oligonucleotídeos *antisense* que trabalham como inibidores

competitivos de microRNAs por se ligarem ao filamento guia de microRNA maduro (Davis *et al.*, 2006).

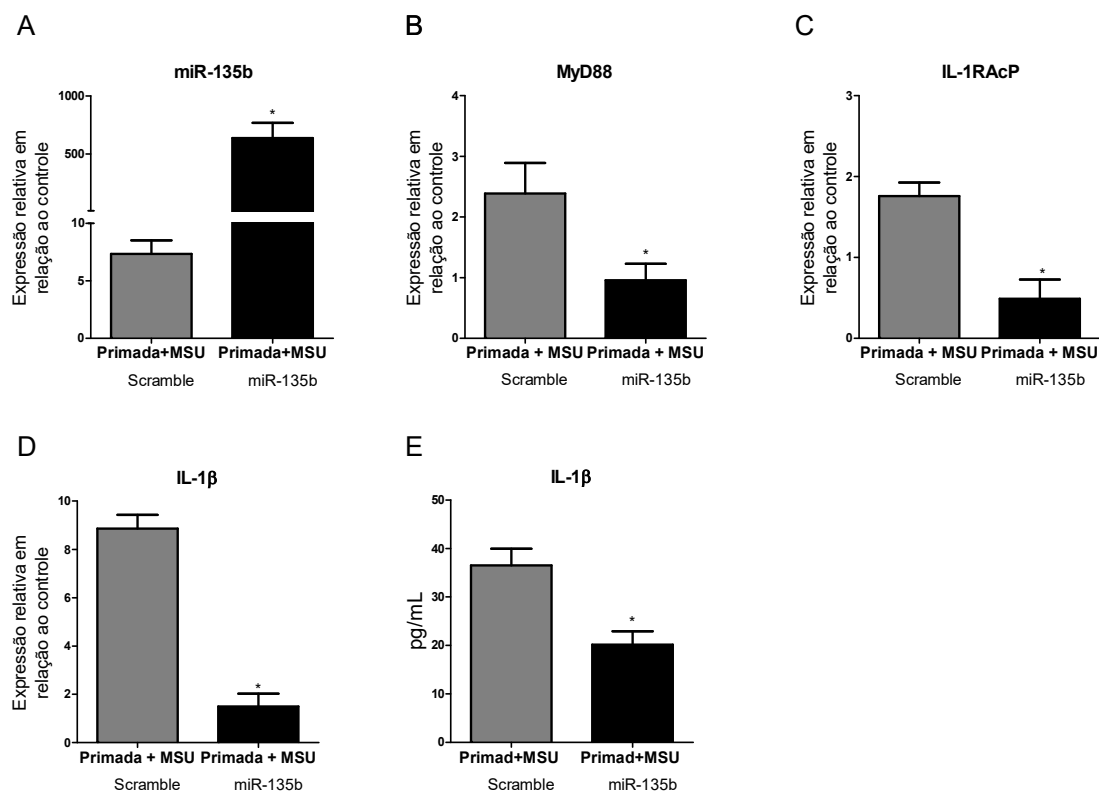


Figura 22: Validação dos alvos do microRNA-135b. Expressão relativa por qPCR do microRNA-135b em BMDMs que foram primadas com LPS e estimuladas com MSU (LPS 10ng/mL por 15 horas e depois cristais de MSU 150µg/mL por 6 horas) após transfecção com 10 µM de *scramble* ou de microRNA-135b (A). Expressão relativa por qPCR de MyD88 (B), IL-1RAcP (C) e IL-1β (D) em BMDMs que foram primadas com LPS e estimuladas com cristais de MSU após transfecção com *scramble* ou com microRNA-135b. Produção de IL-1β (E) em BMDMs que foram estimuladas com as mesmas condições citadas. Os resultados são expressos pela média ± EPM. * p<0,05 em relação ao grupo controle. n=3 (o experimento foi repetido 3 vezes). Gráfico representativo de um experimento.

Além disso, os oligonucleotídeos utilizados apresentavam nucleotídeos bloqueados, em que vários nucleotídeos são substituídos por análogos bicíclicos de RNA dispostos em uma conformação “locked” (moléculas LNA). Esta característica confere maior afinidade ao microRNA-alvo e maior estabilidade, uma vez que a modificação “locked” do anel de ribose cria uma conformação ideal para ligação com o microRNA-alvo (Lennox e Behlke, 2011).

Camundongos selvagens foram tratados com o inibidor do microRNA-135b diretamente na articulação 3 horas antes da injeção de cristais de MSU (também intra-articular) e os parâmetros inflamatórios foram analisados 6 horas depois da injeção dos cristais. Foi possível observar que este tratamento resultou em uma diminuição da expressão do microRNA-135b no tecido periarticular (Figura 23A) e aumento no nível de MyD88 que foi validado como sendo alvo do mesmo (Figura 23B). Além disso, essa inibição resultou em um aumento na resposta inflamatória evidenciada pelo aumento nos níveis das citocinas IL-1 β e CXCL1 no tecido periarticular e no número de neutrófilos na cavidade intra-articular (Figura 23C-E).

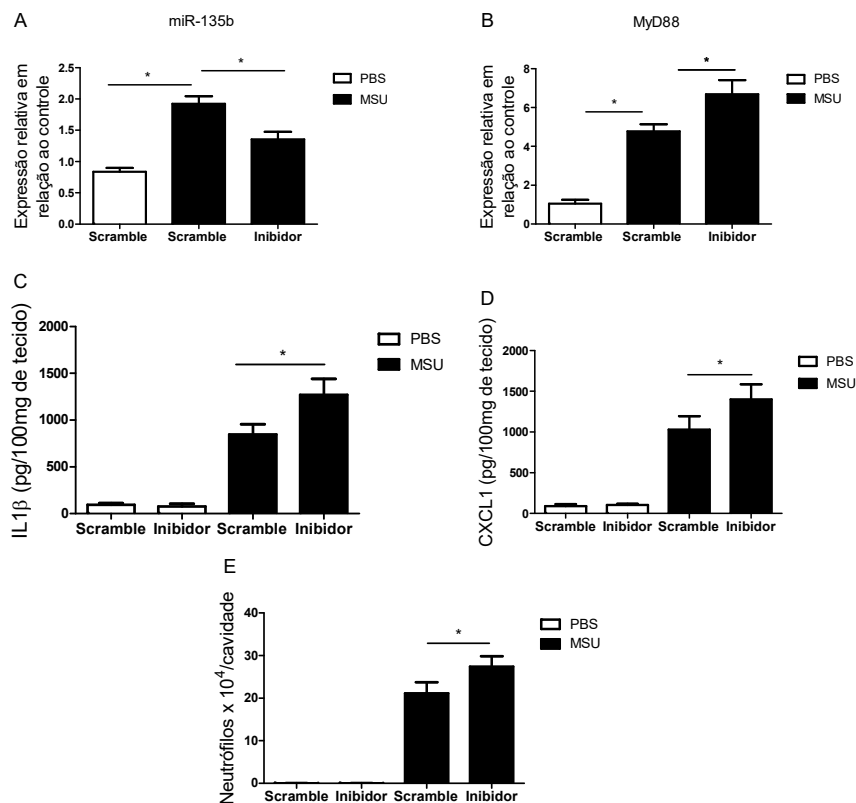


Figura 23: Avaliação da relevância do microRNA-135b in vivo. Expressão relativa por qPCR do microRNA-135b no tecido periarticular após injeção intra-articular com um inibidor do microRNA-135b (50nM) e posterior injeção de cristais de MSU (100 μ g/cavidade) (A). Expressão relativa de MyD88 no tecido periarticular (B). Produção de IL-1 β (C) e CXCL1 (D) no tecido periarticular e determinação do número de neutrófilos (E) na cavidade articular. Os resultados são expressos pela média \pm EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. $n = 3$ (o experimento foi repetido 2 vezes). Gráfico representativo de um experimento.

6. Discussão

No presente estudo foram identificadas duas importantes moléculas regulatórias da inflamação induzida por cristais de MSU, porém com papéis divergentes e com funções em diferentes momentos do processo inflamatório. Uma foi PTX3, definida como um importante mediador para o desencadeamento da inflamação causada por cristais de MSU e manutenção da resposta inflamatória. E a outra foi o microRNA-135b, reconhecido como tendo um papel fundamental no controle deste processo inflamatório. Os principais achados deste trabalho estão sumarizados a seguir:

- 1) a produção de PTX3 é aumentada em resposta a inflamação induzida por cristais de MSU durante a gota aguda, tanto em modelo animal quanto em amostras de pacientes com gota;
- 2) a ausência de PTX3 resulta em uma diminuição significativa da inflamação causada por cristais de MSU, evidenciada por menor produção de IL-1 β , CXCL1 e recrutamento de neutrófilos;
- 3) PTX3 facilita a fagocitose dos cristais de MSU, resultando em maior ativação celular evidenciada pelo aumento de caspase 1 ativa e consequente aumento de IL-1 β ;
- 4) os efeitos de PTX3 nesse contexto ocorrem através do receptor Fc γ ;
- 5) a inflamação induzida por cristais de MSU leva a um aumento na expressão de diversos microRNAs;
- 6) o microRNA mais relevante nesse contexto foi o microRNA-135b, uma vez que sua expressão foi induzida por IL-1 β e foi dependente da via de sinalização desta citocina;
- 7) o microRNA-135b é expresso durante a inflamação induzida por cristais de MSU principalmente por macrófagos e seus alvos validados foram MyD88 e IL-1RAcP;

8) o microRNA-135b é uma importante molécula regulatória no controle da inflamação induzida por cristais de MSU.

A citocina IL-1 β tem um papel crucial para a indução da inflamação causada por cristais de MSU. Sua participação foi demonstrada em diferentes modelos experimentais de gota, em que camundongos deficientes do receptor da IL-1 β (IL-1R1) apresentavam menor influxo de neutrófilos (Dinarello, 2014; Martinon *et al.*, 2006; Torres *et al.*, 2009). Essas observações também foram confirmadas em alguns estudos clínicos em que o bloqueio de IL-1 β (IL-1Ra recombinante - anakinra, IL-1Trap – riloncept e anti-IL-1 β - canakinumab), resultou em diminuição dos ataques recorrentes de gota (Mitroulis, Skendros e Ritis, 2010). De forma interessante, IL-1 β é uma das moléculas responsáveis por ativar a produção e liberação de PTX3 por uma grande variedade de células como fagócitos mononucleares, neutrófilos, fibroblastos, células endoteliais, adipócitos, células sinoviais e condrócitos (Mantovani *et al.*, 2008), as quais são importantes componentes da cavidade sinovial e participam da inflamação gotosa. Dessa forma, foi hipotetizado neste trabalho que a produção de PTX3 seria induzida na gota e teria um papel importante na inflamação causada por cristais de MSU.

Foi possível observar que níveis de PTX3 estavam aumentados no tecido periarticular de animais após injeção de cristais de MSU e de forma interessante este aumento foi significativamente reduzido quando os animais foram tratados com IL-1Ra, mostrando a importância da IL-1 β para a produção de PTX3 neste contexto. Além disso, animais que não possuem PTX3 apresentaram uma menor inflamação do que animais selvagens, evidenciando a relevância desta proteína no desenvolvimento da gota.

Pentraxina 3 (PTX3) é uma proteína de fase aguda produzida em diferentes tecidos do corpo. Os níveis sanguíneos de PTX3 são praticamente indetectáveis em condições normais

mas aumenta rapidamente em diversas condições patológicas, como sepse, infecção por *A. fumigatus*, tuberculose pulmonar e infarto agudo do miocárdio (Latini *et al.*, 2004; Salvatori e Campo, 2012). PTX3 também é expressa em altos níveis no líquido sinovial durante inflamação articular em pacientes com artrite idiopática juvenil (Padeh *et al.*, 2013). Além disso, o líquido sinovial de pacientes com artrite reumatoide (RA) apresentam altos níveis de PTX3 e a correlação existente entre a atividade da doença com a concentração de PTX3 em pacientes positivos para anticorpos específicos (fator reumatóide e anti-CCP) sugere um papel de PTX3 nesse processo inflamatório (Luchetti *et al.*, 2000). Na nossa população analisada de pacientes com gota, foi possível demonstrar um aumento nos níveis de PTX3 no sangue de pacientes durante a fase aguda da doença mas não durante a fase crônica, dado que está de acordo com o fato de PTX3 ser uma proteína de fase aguda. Além disso, foi demonstrada uma correlação positiva entre a concentração de PTX3 e IL-1 β no líquido sinovial de pacientes com gota aguda. Esses dados sugerem PTX3 como um possível marcador da doença, especialmente durante os ataques de gota.

O mecanismo específico pelo qual o sistema imune reconhece os cristais de MSU ainda não está claramente definido, porém sabe-se que os cristais de MSU podem se ligar a diferentes proteínas presentes no soro, como IgG (CHERIAN; SCHUMACHER, 1986; ORTIZ BRAVO; SIECK; RALPH SCHUMACHER, 1993). Os cristais de MSU que são fagocitados por macrófagos estão geralmente ligados a anticorpos, sugerindo um papel para o receptor Fc γ na fagocitose desses cristais. Ainda, foi descrito que cristais de MSU ligados a IgG levam a produção do ânion superóxido em fagócitos (Nagase, Baker e Schumacher, 1989). Existem ainda evidências na literatura de que cristais de MSU, em neutrófilos humanos, interagem com o receptor Fc γ RIIIB (CD16) em associação com o complexo CD11b/CD18. Já o receptor Fc γ RIIA (CD32) parece não mediar de forma direta os efeitos dos cristais de MSU (Barabe *et*

al., 1998). Todavia, os receptores envolvidos na fagocitose de cristais de MSU por fagócitos mononucleares ainda precisam ser estudados. Como os receptores Fc γ participam no reconhecimento de cristais de MSU e como eles também foram identificados como sendo receptores de pentraxinas (Lu *et al.*, 2008), decidimos analisar o papel de PTX3 através dos receptores Fc γ na fagocitose dos cristais de MSU.

Estudos demonstraram que PTX3 é capaz de aumentar a fagocitose de vários microrganismos como *Escherichia coli* uropatogênica e conídias de *Aspergillus fumigatus* por neutrófilos humanos (Jaillon *et al.*, 2014)(Moalli *et al.*, 2010). No presente trabalho, foi possível observar que PTX3 facilita a fagocitose de cristais de MSU tanto em monócitos quanto em neutrófilos de camundongos e humanos. Além disso, PTX3 foi capaz de potencializar a produção de IL-1 β por macrófagos de camundongos, tipo celular que é a maior fonte de produção desta citocina na gota experimental (Martin, Walton e Harper, 2009) e também por monócitos humanos através da ativação de caspase-1. Nosso grupo de pesquisa demonstrou que a produção de IL-1 β após a inflamação induzida por cristais de MSU, no mesmo modelo utilizado nesse trabalho, é mediada por ativação da caspase-1 dependente de NLRP3 inflamassoma (Amaral *et al.*, 2012). Mecanicamente, células de animais deficientes na cadeia γ comum dos receptores Fc (FcR γ), os quais são animais deficientes na cadeia γ dos receptores Fc γ RI, Fc γ RIII e Fc ϵ RI, mostraram uma menor taxa de fagocitose e produção de IL-1 β após estímulo com cristais de MSU. Entretanto, a fagocitose nas células desses animais não foi alterada quando PTX3 recombinante foi adicionada. Além disso, células de animais deficientes para Fc γ RIII comportaram da mesma forma com relação a PTX3. Contudo, células dos animais deficientes em FcR γ R apresentaram uma resposta mais robusta, indicando o receptor Fc γ RI também poderia ter um papel neste contexto. O receptor Fc ϵ RI não foi levado em consideração

uma vez que este é um receptor de alta afinidade para a imunoglobulina E que não está relacionada com a inflamação induzida por cristais de MSU.

Humanos e camundongos possuem duas classes de receptores $Fc\gamma$, os receptores ativadores e inibitórios. Ambas espécies possuem apenas um receptor $Fc\gamma$ inibitório, $Fc\gamma RIIB$, o qual é expresso em linfócitos B, células dendríticas e basófilos nas duas espécies, e encontrado também em monócitos, macrófagos e todos granulócitos em camundongos (Ravetch e Kinet, 1991). Em camundongos, os receptores $Fc\gamma$ ativadores são: $Fc\gamma RI$, $Fc\gamma RIII$ e $Fc\gamma RIV$. Já em humanos os membros desta família são: $Fc\gamma RI$, $Fc\gamma RIIA$, $Fc\gamma RIIC$ e $Fc\gamma RIIIA$ (C.E. *et al.*, 2015). Baseado na similaridade da sequência na porção extracelular, $Fc\gamma RIV$ de camundongo é considerado o ortólogo $Fc\gamma RIIIA$ em humanos, e $Fc\gamma RIII$ de camundongos seria o mais próximo relacionado ao $Fc\gamma RIIA$ de humano. Devido a essas diferenças, extrapolar dados de estudos em animais para o sistema humano nesse contexto não é trivial uma vez que existem diferenças nos domínios intracelulares e no padrão de expressão desses receptores. $Fc\gamma RIIA$ de humanos, por exemplo, contém seu próprio motivo de ativação do imunorreceptor baseado em tirosina (ITAM) enquanto o $Fc\gamma RIII$ de camundongos não é ligado covalentemente ao ITAM do receptor $Fc\gamma$. Além disso, existe um receptor exclusivo humano, $Fc\gamma RIIB$, que é somente expresso em neutrófilos (Futosi, Fodor e Mócsai, 2013). Portanto, embora demonstramos aqui o papel de PTX3 facilitando a fagocitose de cristais de MSU através do receptor $Fc\gamma$, a relevância do $Fc\gamma RIII$ em camundongos nesse contexto deve ser validada em sistemas humanos. Para isso são necessários mais estudos com relação a esses receptores na resposta de PTX3 aos cristais de MSU em células humanas.

Acredita-se que a natureza iônica da superfície dos cristais de MSU permite sua interação com proteínas tanto aniônicas quanto catiônicas. Neste trabalho, sugerimos que o efeito de PTX3 na fagocitose dos cristais de MSU seja devido a interação entre essas duas

moléculas, entretanto não demonstramos se existe uma ligação direta ou não entre elas. Caso não exista uma ligação direta, uma opção seria a de que PTX3 poderia indiretamente interagir com os cristais de MSU. Sabe-se que tanto os cristais de MSU quanto PTX3 se ligam a C1q, o primeiro subcomponente do complexo C1 da via clássica de ativação do complemento (Nauta *et al.*, 2003b; Terkeltaub *et al.*, 1983). Desse modo, C1q poderia agir como uma ponte orquestrando a interação entre os cristais de MSU e PTX3. Entretanto, estudos são necessários para identificar a natureza dessa interação. Neste trabalho, foi tentado elucidar a natureza da interação entre cristais de MSU e PTX3 através da técnica de Espectroscopia Raman, a qual consegue identificar a assinatura (informação química e estrutural) de cada molécula conseguindo identificar se algo está ligado a uma proteína ou não. Entretanto, os dados obtidos até o presente momento foram inconclusivos e posteriores análises serão necessárias.

Resumindo, esses dados evidenciam o papel de PTX3 como facilitador da fagocitose de cristais de MSU via receptor $Fc\gamma$, principalmente $Fc\gamma RIII$. Dessa forma conseguimos descrever mais um mecanismo de reconhecimento de cristais de MSU e além disso, identificar um possível biomarcador para a gota. Como PTX3 favorece a fagocitose dos cristais de MSU e este evento é crucial para desencadear a resposta inflamatória da gota, esta molécula apresenta um grande potencial terapêutico. Entretanto mais informações sobre a biologia do PTX3 e dos cristais de MSU são necessárias. Por exemplo, se a fagocitose dos cristais fosse bloqueada, será que os cristais depositados nas articulações não fagocitados seriam danosos? Apenas as terapias anti-hiperuricêmica conseguiria dissolvê-los? Se sim, uma boa estratégia seria inibir a fagocitose dos cristais de MSU durante os surtos de gota, presentes na fase aguda. Algumas opções poderiam ser bloquear PTX3 com um anti-PTX3 ou até mesmo bloquear o receptor $Fc\gamma$. Entretanto, mais estudos são necessários para elucidar todas essas questões.

Além do PTX3, uma outra classe de moléculas regulatórias analisada neste trabalho foram os microRNAs. Como mencionado anteriormente, uma resposta inflamatória acionada por um agente agressor precisa ter todas suas etapas como início, propagação e resolução cuidadosamente coordenadas e balanceadas. A falta de um início e propagação apropriados impede uma resposta imune inata adequada e, da mesma forma, a falta de uma resolução apropriada pode resultar na cronificação da doença. Assim, os microRNAs, sendo importantes reguladores gênicos, são moléculas cruciais para orquestrar todo o processo inflamatório. Devido ao seu papel biológico fundamental, a expressão dos microRNAs é finamente controlada e uma desregulação nesse processo pode resultar em várias doenças, como doenças inflamatórias intestinais e cânceres (F. *et al.*, 2008; Volinia *et al.*, 2005).

Neste estudo, foi possível observar que os microRNAs 135a, 135b, 146a, 155 e 223, foram superexpressos no tecido periarticular de camundongos após a injeção de cristais de MSU, porém em momentos diferentes da inflamação. Com objetivo de saber qual tipo celular seria o responsável pela produção desses microRNAs, macrófagos e neutrófilos foram isolados do lavado sinovial no pico da inflamação no nosso modelo experimental e a expressão desses microRNAs foi analisada. Essas células foram escolhidas devido sua importância no modelo, macrófagos sendo importantes para o início e resolução da resposta inflamatória e neutrófilos importantes para a propagação da mesma. De forma interessante, apenas dois microRNAs apresentaram um perfil de expressão consistente nos dois diferentes modelos de inflamação induzida por cristais de MSU (peritonite e inflamação articular). Esses microRNAs foram o microRNA-135b e 155 e esta consistência ocorreu apenas em macrófagos.

O microRNA-155, é um microRNA bastante estudado no contexto de inflamação. Ele possui diferentes perfis de expressão e tem um papel importante em vários processos fisiológicos e patológicos como, diferenciação de células da linha hematopoiética, inflamação

e câncer. Além disso, este microRNA está associado a várias doenças como doenças autoimunes (O'Connell *et al.*, 2010) e durante infecções virais (Yin *et al.*, 2008). A expressão do microRNA-155 é induzida em macrófagos por estímulos pro-inflamatórios como TNF- α , receptores do tipo Toll (TLRs), LPS e IL-1 β (O'Connell *et al.*, 2007). De forma interessante, estudos demonstraram que o microRNA-155 é um importante regulador na inflamação gotosa, tendo como alvo SHIP-1. A superexpressão de microRNA-155 nesse contexto resultou em uma diminuição dos níveis de SHIP-1, aumentando assim a produção de citocinas inflamatórias como IL-1 β (Jin *et al.*, 2014b). Além disso, já foi descrito que o microRNA-155 também está envolvido indiretamente na produção de IL-1 β em outras doenças inflamatórias (Ceppi *et al.*, 2009; Li, Tian e Wang, 2013).

Já o microRNA-135b, tem sido estudado basicamente no contexto da biologia do câncer e pouco se conhece sobre seu papel em processos inflamatórios agudos. Sabe-se por exemplo que este microRNA promove a progressão de câncer de cólon (Valeri *et al.*, 2014) e câncer de pulmão (Lin *et al.*, 2013).

Como mencionado, IL-1 β tem um papel crucial no desenvolvimento da inflamação induzida por cristais de MSU. Dessa forma, decidiu-se analisar se esta citocina era capaz de induzir a expressão desses microRNAs. Além disso, como a inflamação induzida por cristais de MSU é dependente da via de sinalização de IL-1R1 (Martinon *et al.*, 2006; Torres *et al.*, 2009), foi do nosso interesse analisar se a expressão do microRNA-135b é regulada por IL-1R1 durante este tipo de inflamação. Foi possível identificar que tanto microRNA-155 quanto microRNA-135b foram induzidos após estímulo com IL-1 β recombinante, porém apenas o microRNA-135b foi superexpresso após o estímulo com LPS+MSU em células de animais deficientes de IL-1R1. Este dado corrobora com o trabalho de Halappanavar e colaboradores, em que foi demonstrado que pulmão de animais expostos à fumaça de cigarro apresentam um

aumento na expressão do microRNA-135b, enquanto em animais deficientes em IL-1R1 este aumento não acontece, mostrando a dependência dessa via de sinalização para a expressão deste microRNA (Halappanavar *et al.*, 2013).

Dentre os microRNAs analisados, a indução do microRNA-135b foi a mais consistente e interessante no contexto da gota, uma vez que ele foi superexpresso tanto após injeção de cristais de MSU *in vivo* quanto após estímulo com LPS e MSU *in vitro*. Ainda, a expressão deste microRNA foi induzida diretamente por IL-1 β e foi dependente da via de sinalização de IL-1R1. Dessa forma, decidiu-se focar no estudo deste microRNA no intuito de identificar seus alvos e sua relevância no modelo experimental de gota.

Para identificar os possíveis alvos deste microRNA foi feito um estudo *in silico* baseado nas proteínas envolvidas na via de sinalização de IL-1 β e ativação de NLRP3. Os softwares analisados identificaram IL- β , MyD88 e IL-1RAcP como possíveis alvos do microRNA-135b. Posteriormente, através do ensaio de luciferase e também com um experimento de ganho de função validamos MyD88 e IL-1RAcP como alvos do microRNA-135b. Este sistema em que um microRNA é capaz de regular proteínas pertencentes a mesma via que foi responsável pela sua produção (*feedback* negativo) é muito comum neste universo. MyD88 e IL-1RAcP são duas proteínas crucias para o desenvolvimento da gota. Estudos mostram que animais deficientes em MyD88 quando são estimulados com cristais de MSU apresentam menor influxo de neutrófilos e produção de CXCL1, em dois modelos diferentes (peritonite e inflamação articular) (Amaral *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2006). Apesar de existirem estudos mostrando a importância de IL-1R1 na inflamação induzida por cristais de MSU, ainda não se tem descrito experimentalmente a importância do IL-1RAcP neste processo. Entretanto, sabe-se que para que a transdução do sinal da IL-1 β ocorra, esta citocina precisa se ligar tanto

ao receptor IL-1R1 quanto ao IL-1RAcP, ou seja, pode-se dizer que IL-1RAcP também é crucial para a inflamação induzida por cristais de MSU.

De forma interessante, foi também demonstrada neste trabalho a relevância *in vivo* do microRNA-135b. A inibição deste microRNA, resultou em um maior nível de inflamação após injeção de cristais de MSU na articulação de camundongos, evidenciada por maior influxo de neutrófilos para a cavidade sinovial e maior produção de IL-1 β e CXCL1. Visando uma proposta terapêutica do microRNA-135b, seria interessante, como contraprova, administrar o mimético deste microRNA para ver se ele seria capaz de diminuir ou mesmo bloquear este processo inflamatório.

Atualmente, existe um grande interesse na utilização de microRNAs como alvos terapêuticos. Essas moléculas representam alvos atrativos com potencial de poder manipular diversos processos patológicos. Dessa forma, um número considerável de patentes nesse campo foram publicadas nesta última década. Além disso, já existem vários estudos clínicos envolvendo microRNAs, alguns em fase pré-clínica e outros já em fase IIa (Christopher *et al.*, 2016). Apesar do potencial terapêutico do microRNA-135b, não só para a gota como também para outras doenças dependentes de IL-1 β , vários aspectos ainda precisam ser estudados. Primeiramente, a validação da relevância e dos alvos deste microRNA também precisa ser feita em um contexto humano. Além disso, estudos adicionais precisariam ser feitos com o objetivo de identificar o efeito colateral desse tipo de terapia, uma vez que as moléculas MyD88 e IL-1RAcP também participam de outras vias de sinalização e não apenas da via de IL-1, fazendo com que esse tipo de terapia não seja específica. Por exemplo, MyD88 é um componente também da via de TLRs e um dos possíveis efeitos colaterais seria uma imunossupressão ao indivíduo. Além disso, IL-1RAcP também participa da via de sinalização de citocinas como IL-33 e IL-36 (Dietrich e Gabay, 2014; García-Miguel *et al.*, 2013). Uma alternativa seria a

administração local do mimético do microRNA, com objetivo de amenizar os possíveis efeitos colaterais. Ainda, este microRNA poderia ter outros alvos gênicos sendo capaz de comprometer funções fisiológicas importantes. Dessa forma um estudo mais aprofundado sobre a biologia do microRNA-135b é necessário.

7. Conclusões

O presente estudo identifica duas importantes moléculas regulatórias para a inflamação induzida por cristais de MSU: PTX3 e microRNA-135b, os mecanismos propostos de cada uma delas está esquematizado na Figura 24. Os resultados apresentados neste trabalho indicam que PTX3 promove a fagocitose de cristais de MSU através de receptores do tipo Fc γ , favorecendo a produção de IL-1 β e conseqüentemente a inflamação. Como os níveis de PTX3 foram encontrados aumentados tanto no plasma quanto no líquido sinovial de pacientes com gota aguda, esta proteína pode ajudar em um melhor diagnóstico da gota aguda. De forma geral, PTX3 parece ser um importante mediador no processo inicial da gota e poderia ser um alvo para controle da inflamação excessiva induzida pela deposição de cristais de MSU nas articulações.

Com relação ao microRNA-135b, sua expressão foi encontrada aumentada no contexto da gota experimental e foi demonstrado que a expressão deste microRNA é regulada por IL-1 β em macrófagos. De forma interessante, microRNA-135b atua como um regulador negativo da via de sinalização de IL-1, tendo como alvos MyD88 e IL-1RAcP. Esses dados sugerem que microRNA-135b é uma importante molécula regulatória no controle da inflamação articular na gota aguda.

Portanto, este trabalho identifica duas importantes moléculas regulatórias no desenvolvimento da resposta inflamatória por cristais de MSU com grande potencial terapêutico.

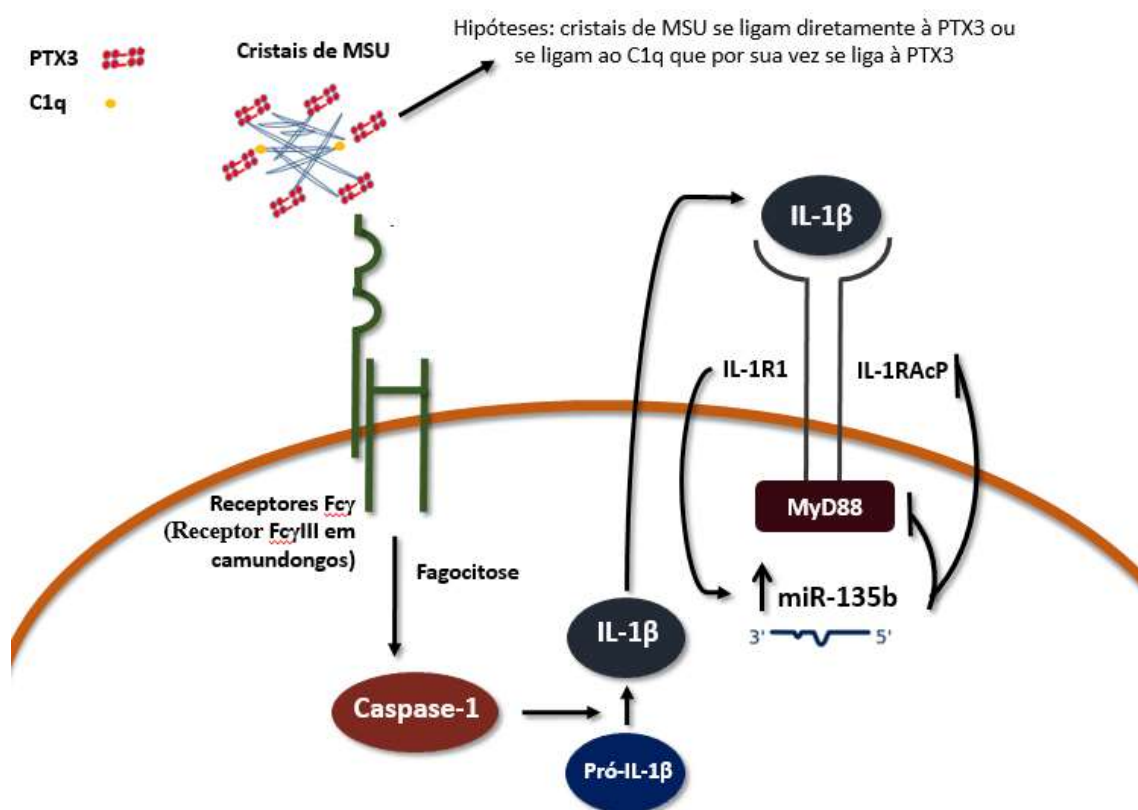


Figura 24: Esquema dos mecanismos propostos para PTX3 e microRNA-135b na inflamação induzida por cristais de MSU. PTX3 interage com cristais de MSU favorecendo sua fagocitose através de receptores do tipo Fc γ , resultando na ativação de caspase-1 e consequente produção da forma ativa de IL-1 β . Esta citocina, por sua vez, induz a expressão do microRNA-135b, de forma dependente da sinalização através do IL-1R1, que será responsável pelo controle negativo da via de sinalização de IL-1, tendo como alvos MyD88 e IL-1RAcP.

8. Referências bibliográficas

- ABDELLATIF, M. Differential Expression of MicroRNAs in Different Disease States. **Circulation Research**, v. 110, n. 4, p. 638–650, 2012.
- AKAHOSHI, T.; MURAKAMI, Y.; KITASATO, H. Recent advances in crystal-induced acute inflammation. **Current opinion in rheumatology**, v. 19, n. 2, p. 146–50, 2007.
- ALMEIDA, M. I. *et al.* MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. **Cell**, v. 33, n. 1, p. 4663–4670, 2015.
- 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.
- BAEK, D. *et al.* The impact of microRNAs on protein output. **Nature**, v. 455, n. 7209, p. 64–71, 2008.
- BARABE, F. *et al.* Crystal-induced neutrophil activation VI. Involvement of Fc{gamma}RIIIB (CD16) and CD11b in response to inflammatory microcrystals. **Faseb J**, v. 12, n. 2, p. 209–220, 1998.
- BARDIN, T.; RICHETTE, P. Definition of hyperuricemia and gouty conditions. **Cor**, v. 26, n. 2, p. 186–91, 2014.
- BAUERNFEIND, F. *et al.* NLRP3 inflammasome activity is negatively controlled by miR-223. **Journal of Immunology**, v. 189, p. 4175–4181, 2012.
- BOTTAZZI, B. *et al.* The long pentraxin PTX3 as a prototypic humoral pattern recognition receptor: Interplay with cellular innate immunity. **Immunological Reviews**, v. 227, n. 1, p. 9–18, 2009.
- _____. The pentraxins PTX3 and SAP in innate immunity, regulation of inflammation and tissue remodelling. **Journal of Hepatology**, v. 64, n. 6, p. 1416–1427, 2016.
- BOZZA, S. *et al.* Pentraxin 3 protects from MCMV infection and reactivation through TLR sensing pathways leading to IRF3 activation. **Blood**, v. 108, n. 10, p. 3387–3396, 2006.
- BURNS, K.; MARTINON, F.; TSCHOPP, J. New insights into the mechanism of IL-1beta maturation. **Current opinion in immunology**, v. 15, n. 1, p. 26–30, 2003.
- C.E., H. *et al.* Fcgamma receptors: Genetic variation, function, and disease. **Immunological Reviews**, v. 268, n. 1, p. 6–24, 2015.
- CEPPI, M. *et al.* MicroRNA-155 modulates the interleukin-1 signaling pathway in activated human monocyte-derived dendritic cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 8, p. 2735–2740, 2009.
- CHEN, C. J. *et al.* MyD88-dependent IL-1 receptor signaling is essential for gouty inflammation stimulated by monosodium urate crystals. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 8, p. 2262–2271, 2006.
- CHEN, Q. *et al.* Inducible microRNA-223 down-regulation promotes TLR-triggered IL-6 and IL-1?? production in macrophages by targeting STAT3. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, p. 1–12, 2012.

CHEN, Z. *et al.* Oxidative stress activates endothelial innate immunity via sterol regulatory element binding protein 2 (SREBP2) transactivation of MicroRNA-92a. **Circulation**, v. 131, n. 9, p. 805–814, 2015.

CHERIAN, P.; SCHUMACHER, H. J. Immunochemical and ultrastructural characterization of serum proteins associated with monosodium urate crystals (MSU) in synovial fluid cells from patients with gout. **Ultrastructural pathology**, v. 10, n. 3, p. 209–19, 1986.

CHRISTOPHER, A. *et al.* MicroRNA therapeutics: Discovering novel targets and developing specific therapy. **Perspectives in Clinical Research**, v. 7, n. 2, p. 68, 2016.

DAIGO, K. *et al.* Pentraxins in the activation and regulation of innate immunity. **Immunological Reviews**, v. 274, n. 1, p. 202–217, 2016.

DALBETH, N. *et al.* Role of miR-146a in regulation of the acute inflammatory response to monosodium urate crystals. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 74, n. 4, p. 786–90, 2015.

DAVIS, S. *et al.* Improved targeting of miRNA with antisense oligonucleotides. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. 8, p. 2294–2304, 2006.

DEBAN, L. *et al.* Regulation of leukocyte recruitment by the long pentraxin PTX3. **Nature immunology**, v. 11, n. 4, p. 328–334, 2010.

_____. Pentraxins in innate immunity: Lessons from PTX3. **Cell and Tissue Research**, v. 343, n. 1, p. 237–249, 2011.

DIAS, A A *et al.* TSG-14 transgenic mice have improved survival to endotoxemia and to CLP-induced sepsis. **Journal of leukocyte biology**, v. 69, n. 6, p. 928–936, 2001.

DIETRICH, D.; GABAY, C. Inflammation: IL-36 has proinflammatory effects in skin but not in joints. **Nature reviews. Rheumatology**, v. 10, n. 11, p. 639–40, 2014.

DINARELLO, C. A. Interleukin-1 beta, interleukin-18, and the interleukin-1 beta converting enzyme. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 856, n. 1 MOLECULAR MEC, p. 1–11, 1998.

DINARELLO, C. A. An expanding role for interleukin-1 blockade from gout to cancer. **Molecular medicine (Cambridge, Mass.)**, v. 20 Suppl 1, p. S43-58, 2014.

DINIZ, S. N. *et al.* PTX3 function as an opsonin for the dectin-1-dependent internalization of zymosan by macrophages. **Journal of leukocyte biology**, v. 75, n. 4, p. 649–656, 2004.

DORHOI, A. *et al.* MicroRNA-223 controls susceptibility to tuberculosis by regulating lung neutrophil recruitment. **Journal of Clinical Investigation**, v. 123, n. 11, p. 4836–4848, 2013.

ERSON, A. E.; PETTY, E. M. MicroRNAs in development and disease. **Clinical Genetics**, v. 74, n. 4, p. 296–306, 2008.

F., W. *et al.* MicroRNAs Are Differentially Expressed in Ulcerative Colitis and Alter Expression of Macrophage Inflammatory Peptide-2alpha. **Gastroenterology**, v. 135, n. 5, p. 1624, 2008.

FAM, A. G. Gout: Excess calories, purines, and alcohol intake and beyond. Response to a urate-lowering diet. **Journal of Rheumatology**, v. 32, n. 5, p. 773–777, 2005.

FUTOSI, K.; FODOR, S.; MÓCSAI, A. Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. **International Immunopharmacology**, v. 17, n. 3, p. 638–650, 2013.

GARCÍA-MIGUEL, M. *et al.* Innate immunity modulation by the IL-33/ST2 system in intestinal mucosa. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.

GARLANDA, C. *et al.* Non-redundant role of the long pentraxin PTX3 in anti-fungal innate immune response. **Nature**, v. 420, n. 6912, p. 182–186, 2002.

_____. Pentraxins at the crossroads between innate immunity, inflammation, matrix deposition, and female fertility. **Annual review of immunology**, v. 23, n. 8, p. 337–366, 2005.

GAZIANO, R. *et al.* Anti-*Aspergillus fumigatus* efficacy of pentraxin 3 alone and in combination with antifungals. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 11, p. 4414–4421, 2004.

GETTING, S. J. *et al.* Molecular Determinants of Monosodium Urate Crystal-Induced Murine Peritonitis: A Role for Endogenous Mast Cells and a Distinct Requirement for Endothelial-Derived Selectins 1. **The Journal of Pharmacology**, v. 283, n. 1, p. 123–130, 1997.

GHAEMI-OSKOUIE, F.; SHI, Y. The role of uric acid as an endogenous danger signal in immunity and inflammation. **Current Rheumatology Reports**, v. 13, n. 2, p. 160–166, 2011.

GNANENTHIRAN, S. R. *et al.* Acute gout management during hospitalization: A need for a protocol. **Internal Medicine Journal**, v. 41, n. 8, p. 610–617, 2011.

GREENFEDER, S. A. *et al.* Molecular cloning and characterization of a second subunit of the interleukin 1 receptor complex. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 23, p. 13757–13765, 1995.

GU, S. *et al.* Biological basis for restriction of microRNA targets to the 3' untranslated region in mammalian mRNAs. **Nat Struct Mol Biol**, v. 16, n. 2, p. 144–150, 2009.

HALAPPANAVAR, S. *et al.* IL-1 receptor regulates microRNA-135b expression in a negative feedback mechanism during cigarette smoke-induced inflammation. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 190, n. 7, p. 3679–86, 2013.

HANEKLAUS, M. *et al.* Cutting edge: miR-223 and EBV miR-BART15 regulate the NLRP3 inflammasome and IL-1 β production. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 189, n. 8, p. 3795–9, 2012.

HORNUNG, V. *et al.* Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. **Nature immunology**, v. 9, n. 8, p. 847–56, 2008.

INFORZATO, A. *et al.* Structure and function of the long pentraxin PTX3 glycosidic moiety: Fine-tuning of the Interaction with C1q and Complement Activation. **Biochemistry**, v. 45, n. 38, p. 11540–11551, 2006.

_____. PTX3 as a paradigm for the interaction of pentraxins with the Complement system. **Seminars in Immunology**, v. 25, n. 1, p. 79–85, 2013.

JAILLON, S. *et al.* The humoral pattern recognition receptor PTX3 is stored in neutrophil granules and localizes in extracellular traps. **The Journal of experimental medicine**, v. 204, n. 4, p. 793–804, 2007.

JAILLON, S. *et al.* Endogenous PTX3 translocates at the membrane of late apoptotic human neutrophils and is involved in their engulfment by macrophages. **Cell death and differentiation**, v. 16, n. 3, p. 465–74, 2009.

JAILLON, S. *et al.* The humoral pattern recognition molecule PTX3 is a key component of innate immunity against urinary tract infection. **Immunity**, v. 40, n. 4, p. 621–632, 2014.

JEANNIN, P.; JAILLON, S.; DELNESTE, Y. Pattern recognition receptors in the immune response against dying cells. **Current Opinion in Immunology**, v. 20, n. 5, p. 530–537, 2008.

JIN, H. M. *et al.* MicroRNA-155 as a proinflammatory regulator via SHIP-1 down-regulation in acute gouty arthritis. **Arthritis research & therapy**, v. 16, n. 2, p. R88, 2014a.

_____. MicroRNA-155 as a proinflammatory regulator via SHIP-1 down-regulation in acute gouty arthritis. **Arthritis research & therapy**, v. 16, n. 2, p. R88, 2014b.

JOHN, B. *et al.* Human MicroRNA targets. **PLoS biology**, v. 2, n. 11, p. e363, 2004.

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 and Rheumatism**, v. 62, n. 11, p. 3237–3248, 2010.

KINGSBURY, S. R.; CONAGHAN, P. G.; MCDERMOTT, M. F. The role of the NLRP3 inflammasome in gout. **Journal of Inflammation Research**, v. 4, n. 1, p. 39–49, 2011.

KOLLIAS, G. *et al.* Animal models for arthritis: innovative tools for prevention and treatment. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 70, n. 8, p. 1357–1362, 2011.

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.

LAMKANFI, M. Emerging inflammasome effector mechanisms. **Nature reviews. Immunology**, v. 11, n. 3, p. 213–20, 2011.

LAMKANFI, M.; DIXIT, V. M. The inflammasomes. **PLoS Pathog**, v. 5, n. 12, p. e1000510, 2009.

LATINI, R. *et al.* Prognostic significance of the long pentraxin PTX3 in acute myocardial infarction. **Circulation**, v. 110, n. 16, p. 2349–2354, 2004.

LENNOX, K. A.; BEHLKE, M. A. Chemical modification and design of anti-miRNA oligonucleotides. **Gene therapy**, v. 18, n. 12, p. 1111–1120, 2011.

LI, X.; TIAN, F.; WANG, F. Rheumatoid arthritis-associated microrna-155 targets socs1 and upregulates TNF- α and IL-1 β in PBMCs. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 12, p. 23910–23921, 2013.

LIN, C. W. *et al.* MicroRNA-135b promotes lung cancer metastasis by regulating multiple targets in the Hippo pathway and LZTS1. **Nat Commun**, v. 4, n. May, p. 1877, 2013.

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.

LU, J. *et al.* Structural recognition and functional activation of Fc γ R by innate pentraxins.

Nature, v. 456, n. 7224, p. 989–92, 2008.

LUCHETTI, M. M. *et al.* Expression and production of the long pentraxin PTX3 in rheumatoid arthritis (RA). **Clinical and Experimental Immunology**, v. 119, n. 1, p. 196–202, 2000.

MA, Y. J. *et al.* Synergy between ficolin-2 and pentraxin 3 boosts innate immune recognition and complement deposition. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 41, p. 28263–28275, 2009.

_____. Heterocomplexes of mannose-binding lectin and the pentraxins PTX3 or serum amyloid P component trigger cross-activation of the complement system. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 5, p. 3405–3417, 2011.

MANTOVANI, A. *et al.* Pentraxins in innate immunity: From C-reactive protein to the long pentraxin PTX3. **Journal of Clinical Immunology**, v. 28, n. 1, p. 1–13, 2008.

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.

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. **J Clin Invest**, v. 116, n. 8, p. 2073–2075, 2006.

MIGUELEZ, R. *et al.* Anti-inflammatory effect of a PAF receptor antagonist and a new molecule with antiproteinase activity in an experimental model of acute urate crystal arthritis. **Journal of Lipid Mediators and Cell Signalling**, v. 13, n. 1, p. 35–49, 1996.

MITROULIS, I.; SKENDROS, P.; RITIS, K. Targeting IL-1?? in disease; the expanding role of NLRP3 inflammasome. **European Journal of Internal Medicine**, v. 21, n. 3, p. 157–163, 2010.

MOALLI, F. *et al.* Role of complement and Fc?? receptors in the protective activity of the long pentraxin PTX3 against *Aspergillus fumigatus*. **Blood**, v. 116, n. 24, p. 5170–5180, 2010.

MUCSI, A. D. Monosodium urate crystals in inflammation and immunity 2010.pdf. v. 233, p. 203–217, 2010.

MULAY, S. R. *et al.* C-reactive protein: a critical update. **Nature Communications**, v. 7, n. 12, p. 10274, 2016.

NAGASE, M.; BAKER, D. O.; SCHUMACHER, H. R. Immunoglobulin G coating on crystals and ceramics enhances polymorphonuclear cell superoxide production: Correlation with immunoglobulin G adsorbed. **Journal of Rheumatology**, v. 16, n. 7, p. 971–976, 1989.

NAUTA, A. J. *et al.* Biochemical and functional characterization of the interaction between pentraxin 3 and C1q. **European Journal of Immunology**, v. 33, n. 2, p. 465–473, 2003a.

_____. **Biochemical and functional characterization of the interaction between pentraxin 3 and C1q** **European Journal of Immunology**, 1 fev. 2003b.

NETEA, M. G. *et al.* Inflammasome-Independent Regulation of IL-1-Family Cytokines. **Annu. Rev. Immunol**, v. 33, p. 49–77, 2015.

- NG, G. *et al.* Receptor-Independent, Direct Membrane Binding Leads to Cell-Surface Lipid Sorting and Syk Kinase Activation in Dendritic Cells. **Immunity**, v. 29, n. 5, p. 807–818, 2008.
- NUKI, G.; SIMKIN, P. A. A concise history of gout and hyperuricemia and their treatment. **Arthritis research & therapy**, v. 8 Suppl 1, n. Suppl 1, p. S1, 2006.
- O'CONNELL, R. M. *et al.* MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 5, p. 1604–9, 2007.
- O'CONNELL, R. M. *et al.* MicroRNA-155 promotes autoimmune inflammation by enhancing inflammatory T cell development. **Immunity**, v. 33, n. 4, p. 607–619, 2010.
- ORTIZ???BRAVO, E.; SIECK, M. S.; RALPH SCHUMACHER, H. Changes in the proteins coating monosodium urate crystals during active and subsiding inflammation. immunogold studies of synovial fluid from patients with gout and of fluid obtained using the rat subcutaneous air pouch model. **Arthritis & Rheumatism**, v. 36, n. 9, p. 1274–1285, 1993.
- PADEH, S. *et al.* Pentraxin 3 is a marker of early joint inflammation in patients with juvenile idiopathic arthritis. **Immunologic Research**, v. 56, n. 2–3, p. 444–450, 2013.
- PASCUAL, E.; PERDIGUERO, M. Gout, diuretics and the kidney. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 65, n. 8, p. 981–2, 2006.
- PASQUINELLI, A. E. MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. **Nature reviews. Genetics**, v. 13, n. 4, p. 271–82, 2012.
- PUNZI, L. *et al.* Gout as autoinflammatory disease: New mechanisms for more appropriated treatment targets. **Autoimmunity Reviews**, v. 12, n. 1, p. 66–71, 2012.
- RAVETCH, J. V; KINET, J.-P. Fc Receptors. **Annual Reviews Immunology**, v. 9, p. 457–492, 1991.
- READING, P. C. *et al.* Antiviral activity of the long chain pentraxin PTX3 against influenza viruses. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 180, n. 5, p. 3391–8, 2008.
- REAL, J. M. *et al.* Pentraxin 3 accelerates lung injury in high tidal volume ventilation in mice. **Molecular Immunology**, v. 51, n. 1, p. 82–90, 2012.
- REBER, L. L. *et al.* Contribution of mast cell-derived interleukin-1?? to uric acid crystal-induced acute arthritis in mice. **Arthritis and Rheumatology**, v. 66, n. 10, p. 2881–2891, 2014.
- REES, F.; HUI, M.; DOHERTY, M. Optimizing current treatment of gout. **Nature reviews. Rheumatology**, v. 10, n. 5, p. 271–83, 2014.
- 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.
- 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, 2013.
- RODDY, E.; CHOI, H. K. Epidemiology of gout. **Rheumatic Disease Clinics of North America**, v. 40, n. 2, p. 155–175, 2014.
- ROSE, D. M.; LIU-BRYAN, R. Innate immunity in triggering and resolution of acute gouty

- inflammation. **Current Rheumatology Reports**, v. 8, n. 3, p. 209–214, 2006.
- ROSSUM, A. P. VAN *et al.* The prototypic tissue pentraxin PTX3, in contrast to the short pentraxin serum amyloid P, inhibits phagocytosis of late apoptotic neutrophils by macrophages. **Arthritis and Rheumatism**, v. 50, n. 8, p. 2667–2674, 2004.
- ROVERE, P. *et al.* The long pentraxin PTX3 binds to apoptotic cells and regulates their clearance by antigen-presenting dendritic cells. **Blood**, v. 96, n. 13, p. 4300–6, 2000.
- RYCKMAN, C. *et al.* Role of S100A8 and S100A9 in neutrophil recruitment in response to monosodium urate monohydrate crystals in the air-pouch model of acute gouty arthritis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 48, n. 8, p. 2310–2320, 2003.
- SALIO, M. *et al.* Cardioprotective function of the long pentraxin PTX3 in acute myocardial infarction. **Circulation**, v. 117, n. 8, p. 1055–1064, 2008.
- SALVATORI, G.; CAMPO, S. Current understanding of PTX3 protective activity on *Aspergillus fumigatus* infection. **Medical mycology**, v. 50, n. 3, p. 225–33, 2012.
- SCHLESINGER, N. *et al.* Canakinumab for acute gouty arthritis in patients with limited treatment options: results from two randomised, multicentre, active-controlled, double-blind trials and their initial extensions. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 71, n. 11, p. 1839–48, 2012.
- SCHORN, C. *et al.* Monosodium urate crystals induce extracellular DNA traps in neutrophils, eosinophils, and basophils but not in mononuclear cells. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. SEP, 2012.
- SCHUMACHER, H. R. *et al.* Rilonacept (interleukin-1 trap) in the prevention of acute gout flares during initiation of urate-lowering therapy: Results of a phase II randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Arthritis and Rheumatism**, v. 64, n. 3, p. 876–884, 2012.
- SCOTT, P. *et al.* Engagement of CD14 mediates the inflammatory potential of monosodium urate crystals. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 177, n. 9, p. 6370–8, 2006.
- SEBESTA, I. Genetic Disorders Resulting in Hyper- or Hypouricemia. **Advances in Chronic Kidney Disease**, v. 19, n. 6, p. 398–403, 2012.
- SINGH, J. A. Racial and gender disparities among patients with gout. **Current Rheumatology Reports**, v. 15, n. 2, 2013.
- SOUZA, D. G. *et al.* The long pentraxin PTX3 is crucial for tissue inflammation after intestinal ischemia and reperfusion in mice. **The American journal of pathology**, v. 174, n. 4, p. 1309–1318, 2009.
- TERKELTAUB, R. *et al.* Plasma protein binding by monosodium urate crystals. Analysis by two-dimensional gel electrophoresis. **Arthritis and rheumatism**, v. 26, n. 6, p. 775–83, 1983.
- 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.
- TORRES, R. *et al.* Hyperalgesia, synovitis and multiple biomarkers of inflammation are suppressed by interleukin 1 inhibition in a novel animal model of gouty arthritis. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 68, n. 10, p. 1602–8, 2009.

- TRAMONTINI, N. *et al.* Central role of complement membrane attack complex in monosodium urate crystal-induced neutrophilic rabbit knee synovitis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 50, n. 8, p. 2633–2639, 2004.
- VALERI, N. *et al.* MicroRNA-135b promotes cancer progression by acting as a downstream effector of oncogenic pathways in colon cancer. **Cancer Cell**, v. 25, n. 4, p. 469–483, 2014.
- VOLINIA, S. *et al.* A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. **Pnas**, v. 103, p. 2257–2261, 2005.
- WANG, Y. *et al.* Could MicroRNAs be Regulators of Gout Pathogenesis? **Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology**, v. 36, n. 6, p. 2085–2092, 2015.
- WIGHTMAN, B.; HA, I.; RUVKUN, G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. **Cell**, v. 75, n. 5, p. 855–862, 1993.
- WILLIAMS, M. R. *et al.* Emerging mechanisms of neutrophil recruitment across endothelium. **Trends in Immunology**, v. 32, n. 10, p. 461–469, 2011.
- WU, L.; BELASCO, J. G. Let Me Count the Ways: Mechanisms of Gene Regulation by miRNAs and siRNAs. **Molecular Cell**, v. 29, n. 1, p. 1–7, 2008.
- YANG, C. R. *et al.* Denbinobin upregulates miR-146a expression and attenuates IL-1 β -induced upregulation of ICAM-1 and VCAM-1 expressions in osteoarthritis fibroblast-like synoviocytes. **Journal of Molecular Medicine**, v. 92, n. 11, p. 1147–1158, 2014.
- YIN, Q. *et al.* MicroRNA-155 is an Epstein-Barr virus-induced gene that modulates Epstein-Barr virus-regulated gene expression pathways. **Journal of virology**, v. 82, n. 11, p. 5295–306, 2008.
- 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 (London, England)**, v. 12, p. 30, 2015.

9. Anexos

Mini Review

Gouty Arthritis: New Targets for Future Therapies

Batista NV, Teixeira MM, and Amaral FA*

Departament of Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil

*Corresponding author

Flavio Almeida Amaral, Department of Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av Antônio Carlos, 6627, Bloco O4, Sala 202 - Belo Horizonte/Minas Gerais/Brazil, Email: famaral@icb.ufmg.br

Submitted: 21 June 2016

Accepted: 18 July 2016

Published: 20 July 2016

Copyright

© 2016 Amaral et al.

OPEN ACCESS

Keywords

- Gout
- Inflammasome
- IL-1 β
- Pain
- Neutrophil

Abstract

Gout is a very painful arthritis that affects millions of people around the world. In the last decade, various mechanisms associated to uric acid crystals-induced joint inflammation have been described, including details related to the activation of the cytoplasmic sensor NLRP3 inflammasome that eventually leads to the maturation and release the cytokine IL-1 β . The identification of these signalling pathways opens new therapeutic opportunities for the treatment of gout and other related diseases. Here, we review the main inflammatory characteristics of gout, exploring the main intracellular signalling molecules and cell types involved in this disease and point out potential targets to improve the therapeutic options for joint inflammation in gout.

INTRODUCTION

Gout is the most common form of arthritis worldwide [1]. It is a consequence of the deposition of monosodium urate (MSU) crystals in the joints, mainly in individuals with chronic hyperuricemia. In these individuals, there may be oversaturation of urate and precipitation of crystals predominantly in peripheral joints and surrounding tissues. Acute gout attacks are extremely painful and lead to joint disability, although with self-limited inflammation. However, continuing and prolonged deposition of MSU crystals can result in irreversible joint damage, bone erosion, development of disfiguring subcutaneous tophi and permanent disability [2]. Moreover, gout is associated with several other conditions that affect longevity and well-being of patients, including the metabolic syndrome [3], and cardiovascular [4-6], and renal diseases [7], evidencing the complexity and severity of this inflammatory condition.

Multiple risk factors are associated with the incidence of gout, including sustained hyperuricemia due to genetic factors [8], or medication [9], that impair renal excretion of uric acid; purine-rich diet and alcohol consumption [10], age and sex, with higher prevalence in elderly individuals and men [11], comorbid conditions, such as obesity and chronic renal disorder [9], and local tissue characteristics, exemplified by the increased propensity for nucleation and growth of MSU crystals in osteoarthritis joints [12]. Here, we focus our attention on the main mechanisms associated to joint inflammation in gout, exploring the strategies for experimental studies and the new possibilities for the treatment of acute gout.

Pathogenesis of acute gout: mechanisms based on IL-1 β production

The deposition of MSU crystals in the joints and surrounding

tissues is the initial event for the gout attack, since the crystals are rapidly recognized by innate immune cells culminating in the release of several inflammatory mediators and chemoattractant molecules. MSU crystals-induced inflammation is driven mainly by the release of the mature form of the cytokine interleukin (IL)-1 β by synoviocytes (fibroblasts and macrophages) [13]. In *in vivo* conditions, these cells store pro-IL-1 β (inactive form) in their cytoplasm and the active form is processed and released after the phagocytosis of MSU crystals. Importantly, the investigation of MSU crystals-induced IL-1 β release in *in vitro* studies normally needs previously *de novo* synthesis of pro-IL-1 β by the cells through Pattern Recognition Receptors (PRR) activation, such as lipopolysaccharides from Gram-negative bacteria binding to Toll-like receptor (TLR)-4 (priming process). Recently, we demonstrated that the cytokines TNF- α and MIF have important contribution to MSU crystals-induced inflammation through the production of pro-IL-1 β both *in vitro* and *in vivo* [14,15]. Furthermore, the production of mature form of IL-1 β by human fibroblasts was dependent on previous priming with serum amyloid A protein upon MSU crystals stimulation [16].

The most important machinery for the cleavage of pro-IL-1 β is the assembly of the cytoplasmic macromolecular complex termed inflammasome. In gout, the oligomerization of the inflammasome NLRP3 (nucleotide binding domain and leucine rich repeat containing proteins - prototype NLRP3) occurs after the phagocytosis of MSU crystals, culminating in the recruitment of the adaptor protein ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing CARD), which lead to the cleavage and activation of caspase-1 and subsequently the cleavage of pro-IL-1 β [17,18]. Experimentally, macrophages obtained from mice deficient in components of NLRP3 inflammasome (NLRP3, ASC, or caspase-1) were unable to process and release active IL-1 β in response to MSU crystals [19]. In addition, the injection of MSU