



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

STEPHANIE BADARÓ GARCIA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO E MECANISMO DE AÇÃO DO
MEDIADOR LIPÍDICO PRÓ-RESOLUÇÃO RESOLVINA D2
EM MODELO DE ARTRITE GOTOSA INDUZIDA POR
CRISTAIS DE URATO MONOSSÓDICO**

Londrina
2018

STEPHANIE BADARÓ GARCIA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO E MECANISMO DE AÇÃO DO
MEDIADOR LIPÍDICO PRÓ-RESOLUÇÃO RESOLVINA D2
EM MODELO DE ARTRITE GOTOSA INDUZIDA POR
CRISTAIS DE URATO MONOSSÓDICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Patologia Experimental.

Orientador: Prof. Dr. Waldiceu Ap. Verri Jr.

Londrina
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Garcia, Stephanie Badaró.

Avaliação do efeito e mecanismo de ação do mediador lipídico pró-resolução resolvina D2 em modelo de artrite gotosa induzida por cristais de urato monossódico / Stephanie Badaró Garcia. - Londrina, 2018.
63 f. : il.

Orientador: Waldiceu Aparecido Verri Junior.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2018.

Inclui bibliografia.

1. Artrite - Tese. 2. Inflamação - Tese. 3. Dor - Tese. 4. Resolvina D2 - Tese. I. Verri Junior, Waldiceu Aparecido. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. III. Título.

STEPHANIE BADARÓ GARCIA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO E MECANISMO DE AÇÃO DO MEDIADOR
LIPÍDICO PRÓ-RESOLUÇÃO RESOLVINA D2 EM MODELO DE
ARTRITE GOTOSA INDUZIDA POR CRISTAIS DE URATO
MONOSSÓDICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Patologia Experimental.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Waldiceu Ap. Verri Jr.
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Dra. Larissa Staurengo Ferrari Raposo
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Graziela Scaliante Ceravolo
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 5 de abril de 2018.

À Deus,

E aos meus pais, Cristina e Alberto.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Cristina, por sempre acreditar em mim, por todo amor, apoio e incentivo. Obrigada por ser meu maior exemplo e meu alicerce. Ao meu pai, Alberto, por me incentivar a realizar os meus sonhos, por todo o seu esforço na minha criação e por todo apoio. A vocês o meu amor incondicional.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Waldiceu Ap. Verri Jr., pela orientação e oportunidade de trabalhar em seu laboratório durante este último ano.

Aos colegas do Laboratório de Dor, Inflamação, Neuropatia e Câncer: Allan, Amanda Dionísio, Amanda Zucoloto, Ana Carolina, Camila, Carina, Cássia, Ketlem, Fernanda Ambrósio, Fernanda Rasquel, João, Kenji, Larissa, Mariana, Marília, Miriam, Nayara, Sérgio, Rafaela, Renato, Tiago, Thacyana, Victor e Yuri, por contribuírem de alguma forma para a realização deste trabalho, pela agradável convivência e pelo bom humor.

Aos amigos de laboratório: Tiago, pela parceria e contribuição significativa nesse trabalho. Ao Victor, pela paciência e ensinamentos. À Larissa, pelos valiosos ensinamentos sobre cultura celular, pelo companheirismo, pela ajuda em diversos momentos e sobretudo pela grande amizade construída durante este último ano. À Mariana, pelos incentivos, palavras de apoio, ensinamentos, e por estar comigo sempre, desde os longos experimentos comportamentais até as inúmeras limpezas de biotério. À vocês, a minha eterna gratidão.

Às técnicas, Rosana e Cristina pelo apoio técnico durante a realização deste trabalho.

Às amigas do HUE HUE: Amanda, Ana Elisa, Ana Paula, Lorena, Mariana e Marina, pela amizade desde a graduação, pelos conselhos, momentos compartilhados e por serem a minha família em Londrina.

À minha grande amiga, Giovana, pelos conselhos na vida acadêmica e pessoal, por estar sempre presente. Por ser a minha amiga-irmã e a prova que a distância e o tempo não destroem verdadeiras amizades.

Aos membros da Banca Examinadora, Dr. Larissa Staurengo Ferrari Raposo e Prof. Dr. Graziela Scialanti Ceravolo, pela disponibilidade e por contribuírem para a construção dessa dissertação.

“A menos que modifiquemos a nossa
maneira de pensar, não seremos
capazes de resolver os problemas
causados pela forma como nos
acostumamos a ver o mundo”

(Albert Einstein)

GARCIA, Stephanie Badaró. **Avaliação do efeito e mecanismo de ação do mediador lipídico pró-resolução resolvina D2 em modelo de artrite gotosa induzida por cristais de urato monossódico**. 2018. 63f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

RESUMO

A artrite gotosa é um tipo de artrite inflamatória, caracterizada pelo acúmulo de cristais de urato monossódico (MSU) nas articulações, proporcionando episódios de dor intensa. Os tratamentos convencionais apresentam altos custos e vários efeitos colaterais, e possuem efeito analgésico limitado. Nesse contexto, o mediador lipídico pró-resolução (MLPR) Resolvina D2 (RvD2), derivado do ácido graxo poliinsaturado do ômega-3, originado do ácido docosahexaenóico (DHA), apresenta atividade em respostas inflamatórias sobre múltiplos alvos celulares. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito e mecanismo de ação da RvD2 em modelo experimental de artrite gotosa induzida por MSU *in vivo* e *in vitro*. Para experimentos de dose-resposta, camundongos foram tratados com RvD2 (0,3, 3 ou 30 ng/animal, i.p.) ou veículo (3,2% de etanol em salina, i.p.) 0.5 h antes da administração de MSU (100 µg/ 10 µl/ animal, i.a.). Para experimentos tempo-resposta, camundongos foram tratados com RvD2 (3 ng/animal, i.p.) ou veículo, 0.5, 24h, 48h, e 72h antes do estímulo. Por meio desses experimentos, o tratamento com RvD2 inibiu a hiperalgesia mecânica e edema induzidos por MSU de maneira dose e tempo dependente. RvD2 também reduziu o recrutamento de leucócitos, sinovite, estresse oxidativo e produção de citocinas pró-inflamatórias, IL-1 β e TNF- α *in vivo* e *in vitro*. Além disso, RvD2 reduziu a ativação do NF- κ B, aumentou a expressão de RNAm de *GPR18* e diminuiu a expressão dos componentes do inflamassoma (*Nlrp3*, *Asc*, *Pro-caspase-1* e *Pro-il-1 β*) e níveis de expressão de suas proteínas (NLRP3 e ASC) *in vitro*. Desta forma, considerando a atividade anti-inflamatória e analgésica de RvD2, este pode representar uma nova alternativa terapêutica para o tratamento da artrite gotosa.

Palavras-chave: Artrite gotosa. Ômega 3. Resolvina D2. Citocinas. Inflamassoma NLRP3.

GARCIA, Stephanie Badaró. **Evaluation of effects and mechanism of action of specialized pro-resolving lipid mediator Resolvin D2 in MSU-induced gout arthritis model in mice**. 2018. 63p. Dissertation (Master's degree in Experimental Pathology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

ABSTRACT

Gouty arthritis is one of the most common forms of inflammatory arthritis, characterized by the accumulation of crystals of monosodium urate (MSU) in the joints, generating acute episodes of intense pain. Conventional treatments are expensive and display several side effects, having limited analgesic effect. In this context, the lipid mediator Resolvin D2 (RvD2), derived from the polyunsaturated fatty acid of ω -3, originated from docosahexaenoic acid (DHA), has endogenous activity in inflammatory responses through multiple cellular targets. Thus, the objective of the present study was to evaluate the effect and mechanism of action of RvD2 on experimental model of MSU-induced gouty arthritis *in vivo* and *in vitro*. For dose-response experiments, mice were treated with RvD2 (0.3, 3 or 30 ng / animal, ip) or vehicle (3.2% ethanol in saline, i.p.) 0.5 h prior to administration of MSU (100 μ g / animal, ia). For time-response experiments, mice were treated with RvD2 (3 ng / animal, i.p.) or vehicle, 0.5, 24, 48, and 72 h prior to challenge. Treatment with RvD2 inhibited MSU-induced mechanical hyperalgesia and edema in a dose-dependent and time-dependent manner. RvD2 also reduced leukocyte recruitment, synovitis, oxidative stress and production of proinflammatory cytokines, IL-1 β and TNF- α *in vivo* and *in vitro*. In addition, RvD2 reduced the activation of NF- κ B, mRNA expression of *GPR18* and inflammatory components (*Nlrp3*, *Asc*, *Pro-caspase-1* and *Pro-il-1 β*) and levels of expression of its proteins (NLRP3 and ASC) *in vitro*. Thus, considering the anti-inflammatory and analgesic activity of the lipid mediator pro resolving RvD2, this may represent a new therapeutic alternative for the treatment of gouty arthritis.

Keywords: Gouty arthritis. Omega 3. Resolvin D2. Cytokines. NLRP3 inflammasome.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Mecanismos da artrite gotosa	18
Figura 2 – Metabolismo dos ácidos graxos essenciais derivados do ômega-3	21
Figura 3 – Estrutura química de Resolvina D2	23

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASC	Proteína adaptadora de CARD
CXCL1	Ligante de quimiocina CXC 1
CXCL3	Ligante de quimiocina CXC 3
DAMP	Molécula padrão associada ao dano
DHA	Ácido docosahexaenóico
DSS	Dextran sulfato de sódio
EPA	Ácido eicosapentaenóico
ERO	Espécie reativa de oxigênio
GPCR	Receptor acoplado à proteína G
GPR18	Receptor associado à proteína G 18
IASP	Associação Internacional de Estudo da Dor
ICAM-1	Molécula de adesão intracelular-1
IL	Interleucina
LPS	Lipopolissacarídeo
mRNA	RNA mensageiro
MLPR	Mediador lipídico pró-resolução
MSU	Urato monossódico
Nav	Canal iônico de voltagem dependente de sódio
NET	Armadilhas extracelulares de neutrófilos
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NLR	Receptor semelhante a NOD
NLRP3	NLR família pyrin domínio contendo 3
PAMP	Molécula padrão associada a membrana de patógenos
PG	Prostaglandina
PRR	Receptores de reconhecimento de padrão
RvD2	Resolvina D2
TLR	Receptor do tipo Toll
TNF-α	Fator de necrose tumoral-alpha
TRPA1	Receptor de Potencial Transitório Anquirina 1
TRPV1	Receptor de Potencial Transitório Vanilóide 1
VCAM-1	Molécula de adesão da célula vascular 1

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	MECANISMOS GERAIS DA INFLAMAÇÃO.....	11
1.2	DOR INFLAMATÓRIA	13
1.3	ARTRITE GOTOSA.....	15
1.4	MEDIADORES LIPÍDICOS PRÓ-RESOLUÇÃO.....	19
1.5	RESOLVINA D2.....	21
2	OBJETIVOS	24
2.1	OBJETIVO GERAL	24
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
	REFERÊNCIAS	25
3	ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO (British Journal of Pharmacology)	32
4	CONCLUSÃO	60
	ANEXOS	61
	ANEXO A - Endereço eletrônico do guia para autores da revista científica <i>British Journal of Pharmacology</i>	62
	ANEXO B - Parecer de aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Londrina.....	63

1 INTRODUÇÃO

1.1 MECANISMOS GERAIS DA INFLAMAÇÃO

A inflamação é uma resposta imunológica orquestrada por células do sistema imune mediante a lesão tecidual ou estímulo nocivo (microrganismos, células necróticas, mudanças de pH, ou temperatura e pressão) envolvendo migração de leucócitos para o local da infecção (Medzhitov, 2008). Definida por Celsius, em 3.000 a.C., as características clínicas da inflamação ou sinais cardinais incluem: rubor (vermelhidão), tumor (inchaço), calor (aquecimento), dor (dor) e algumas vezes perda de função, sendo o último sinal cardinal definido por Virchow no século XIX (Freire e Van Dyke, 2013).

De maneira geral, a resposta inflamatória consiste em duas fases principais: a fase vascular, na qual ocorre o aumento da permeabilidade vascular seguido pelo extravasamento de proteínas, como anticorpos e componentes do sistema complemento, resultando em edema; e a fase celular, caracterizada pela quimiotaxia de leucócitos para o local da inflamação devido a expressão de moléculas de adesão e quimiocinas (Kumar *et al.*; Boxer e Dale, 2002). A resposta imune é desencadeada pelo reconhecimento de moléculas específicas, denominadas padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), provenientes de microrganismos; ou padrões moleculares associados ao dano (DAMPs), liberados pelo próprio hospedeiro, por células do sistema imune inato, como macrófagos. Ambos padrões moleculares atuam como agonistas de diversas classes de receptores de reconhecimento padrão (PRRs), como os receptores do tipo Toll (TLRs) e do tipo NOD (NLRs) (Medzhitov, 2008; Takeuchi e Akira, 2010).

O reconhecimento desses padrões moleculares por células residentes desencadeia à ativação de cascatas de sinalização intracelulares resultando na produção e liberação de mediadores pró-inflamatórios, como citocinas, quimiocinas, aminas vasoativas e eicosanóides, amplificando assim a resposta inflamatória. Tais mediadores são essenciais para as etapas de migração celular e posterior ativação das células recrutadas (Wyble *et al.*, 1997). Nesse contexto, citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e TNF- α , são liberadas por células residentes ativadas e se ligam a seus respectivos receptores na superfície de células endoteliais levando à secreção de quimiocinas e expressão de moléculas de adesão como E-selectinas e ICAM-1 (molécula de adesão intercelular 1) (Wyble *et al.*, 1997; Medzhitov, 2008). Os neutrófilos são as primeiras células recrutadas e responsáveis pela eliminação do agente nocivo, e são gradativamente substituídos por macrófagos devido a mudança de perfil de quimiocinas promovido por IL-6 e por entrarem em apoptose no microambiente inflamatório (Kaplanski *et al.*, 2003).

Uma das vias de sinalização ativadas por PRRs é a ativação clássica do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B). NF- κ B consiste em um grupo de dímeros, sendo o heterodímero p50-65 de grande importância na resposta inflamatória aguda. A ativação de NF- κ B é crucial para a maioria dos eventos inflamatórios agudos, desde a ativação endotelial à sobrevivência dos leucócitos no microambiente inflamatório (Ghosh e Hayden, 2008). Ambas as células matam patógenos por mecanismos que incluem a produção de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico, e quando fortemente ativados podem provocar lesão tecidual (Abbas, 2010).

Sob condições normais, o processo inflamatório é solucionado quando ocorre a remoção do agente nocivo (Medzhitov, 2008). A resolução do processo inflamatório resulta na eliminação do agente infeccioso seguida pela fase de

resolução e reparo tecidual, o qual é mediado por células residentes como macrófagos (Serhan, Chiang, *et al.*, 2015). A mudança do perfil dos mediadores lipídicos pró-inflamatórios (prostaglandinas) para anti-inflamatórios (lipoxinas), é crucial para a transição da inflamação à resolução (Serhan, 2014). As lipoxinas inibem o recrutamento dos neutrófilos e promovem o recrutamento de monócitos, que removem as células mortas e iniciam a remodelação do tecido. As resolvinas e protectinas, que constituem outra classe de mediadores lipídicos, também têm um papel crucial na resolução da inflamação no início do reparo tecidual. Com a alteração do perfil destes mediadores, ocorre a ativação de macrófagos não flogísticos, ou também conhecidos como M2, e eferocitose de corpos apoptóticos de neutrófilos por macrófagos afim de restaurar a homeostase tecidual (Serhan e Savill, 2005; Serhan, Dalli, *et al.*, 2015).

1.2 DOR INFLAMATÓRIA

A dor, um dos cinco sinais cardinais da inflamação, é fundamental para a sobrevivência e manutenção da integridade do organismo, cujo propósito é detectar estímulos nocivos que podem acarretar lesões teciduais ou desencadear comportamentos de proteção de um tecido lesado (Bingham *et al.*, 2009). Segundo a Associação Internacional de Estudo da Dor (IASP), dor é definida como “uma experiência sensitiva e emocional desagradável associada ou relacionada a lesão real ou potencial dos tecidos”. É uma resposta protetora que envolve células imunes, vasos sanguíneos e mediadores inflamatórios (Ji *et al.*, 2016).

A percepção consciente da dor é o resultado da ativação de receptores específicos e vias neuroanatômicas que fazem a comunicação entre o sistema nervoso periférico e o sistema nervoso central (Peirs e Seal, 2016). A condução do estímulo doloroso tem início com a ativação das terminações nervosas livres de

neurônios aferentes primários, ou nociceptores, cujos corpos celulares se localizam no gânglio da raiz dorsal ou no gânglio trigeminal, dependendo da localização da interação estímulo/sistema (Dubin e Patapoutian, 2010). Esses neurônios dirigem-se ao corno dorsal da medula espinal, onde fazem sinapse com interneurônios ou neurônios de segunda ordem, responsáveis por levar a informação nociceptiva através de diferentes tratos supra espinais até o córtex cerebral (Todd, 2010). Nesse sentido, enquanto percorre esse caminho, a informação nociceptiva pode ser modulada em diferentes níveis moleculares e transcricionais (Bingham *et al.*, 2009).

A dor pode ser classificada como: nociceptiva, quando gerada por um estímulo nocivo; inflamatória quando resultante de injúria tecidual e/ou ativação das células imunes, e neuropática, quando ocorre uma lesão e má adaptação do sistema nervoso (Woolf e Salter, 2000). A dor de origem inflamatória resulta da interação entre as células do tecido danificado, as células do sistema imune e os neurônios sensoriais nociceptivos periféricos e centrais, por mediadores inflamatórios (Basbaum e Woolf, 1999). A liberação de mediadores inflamatórios segue uma sequência temporal de liberação e ação, sendo estes mediadores subdivididos em mediadores hiperalgésicos intermediários (citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β e IL-8, e quimiocinas); ou finais, como por exemplo prostaglandinas (PGs) e as aminas simpatomiméticas, as quais interagem com seus receptores específicos nos neurônios aferentes primários, promovendo as modificações moleculares responsáveis por sua sensibilização (Sachs *et al.*, 2002).

Após a indução da inflamação, ocorre a liberação de TNF- α , primeira citocina a ser liberada, levando a indução da secreção de IL-1 β pelas células locais e, conseqüentemente, de PGs, bradicinina e aminas simpatomiméticas, que são elementos importantes para a indução de hiperalgesia inflamatória por

sensibilizarem diretamente nociceptores (Cunha *et al.*, 1992; Calil *et al.*, 2014). Após a ligação destes mediadores finais, ocorre a fosforilação de canais iônicos, como por exemplo TRPV1, TRPA1, Nav1.7, Nav1.8 e Nav1.9, levando a mudanças nas propriedades da membrana, aumentando o seu potencial de ação, que é conduzido dos axônios para os corpos celulares nos gânglios da raiz dorsal ou trigeminal e transmitido para outros neurônios nociceptivos, intensificando a transmissão nociceptiva e conseqüentemente, aumentando a sensibilidade à estímulos mecânicos ou térmicos (Todd, 2010; Pinho-Ribeiro *et al.*, 2017).

Desta forma, a dor inflamatória envolve a modulação recíproca entre células do sistema nervoso central, sobretudo nociceptores, e células do sistema imunológico. A persistência do estímulo nocivo ou o comprometimento dos mecanismos de resolução são essenciais para a manutenção da resposta inflamatória, contribuindo para o dano tecidual e cronificação da dor, que pode ser observada em quadros de artrite gotosa (Abhishek, 2017).

1.3 ARTRITE GOTOSA

A artrite gotosa ou gota é um dos tipos de artrite inflamatória mais comum, causada pelo aumento das concentrações séricas de urato (> 7.0 mg/dL) nas articulações (So e Martinon, 2017). Os cristais de urato monossódico são a forma sólida do ácido úrico, produto final do metabolismo das purinas (George e Struthers, 2009). Na formação de urato, os compostos são metabolizados em xantina que é oxidada de forma irreversível para produzir ácido úrico pela enzima xantina oxidase (Sautin e Johnson, 2008). Disfunções no metabolismo das purinas, no processo de excreção do ácido úrico ou aumento na ingestão proteica contribuem para a elevação de urato monossódico circulante, o que pode ocasionar na formação e deposição de cristais de urato monossódico (MSU) nas articulações (So e Martinon,

2017).

Estima-se que cerca de 0,1-10% da população mundial seja acometida por esta doença, e sua prevalência é maior em países desenvolvidos (Kuo *et al.*, 2015). No Brasil ainda existe uma carência na epidemiologia acerca da gota. Sua incidência é maior em homens, afetando duas vezes mais indivíduos do sexo masculino. Os fatores de risco que influenciam no desenvolvimento da artrite gotosa incluem: hiperuricemia, fatores genéticos, hábitos alimentares, consumo de bebidas alcoólicas, síndrome metabólica, doenças renais e osteoartrite (Roddy e Doherty, 2010).

A gota pode ser classificada em quatro diferentes estágios. Inicialmente ocorre a fase de hiperuricemia assintomática, na qual é detectado altos níveis de ácido úrico com ausência de sintomas. A segunda fase é chamada de aguda, com a presença de ataques agudos de dor intensa e de edema, com duração aproximada de dez dias (Eggebeen, 2007; Dalbeth *et al.*, 2016). Em seguida, ocorre um período intercrítico, no qual há a ausência de sintomas; e por fim a fase crônica com presença de tofos (depósito de urato) em vários tecidos, principalmente subcutâneo periarticular e articular em pacientes após recorrentes episódios de ataques agudos de artrite, levando a destruição do tecido cartilaginoso e ósseo pela interação dos cristais de MSU e condrócitos (Saigal e Agrawal, 2015)

Os leucócitos possuem papel crucial no desenvolvimento da artrite gotosa. Assim que o processo inflamatório é deflagrado, os neutrófilos são as primeiras células recrutadas, os quais são atraídos para o local da inflamação e se acumulam nos fluidos articulares e na membrana sinovial. Ao fagocitar os cristais de MSU, estas sofrem NETose, que é caracterizada pela formação de armadilhas extracelulares (Schett *et al.*, 2015). Estas células possuem papel importante como

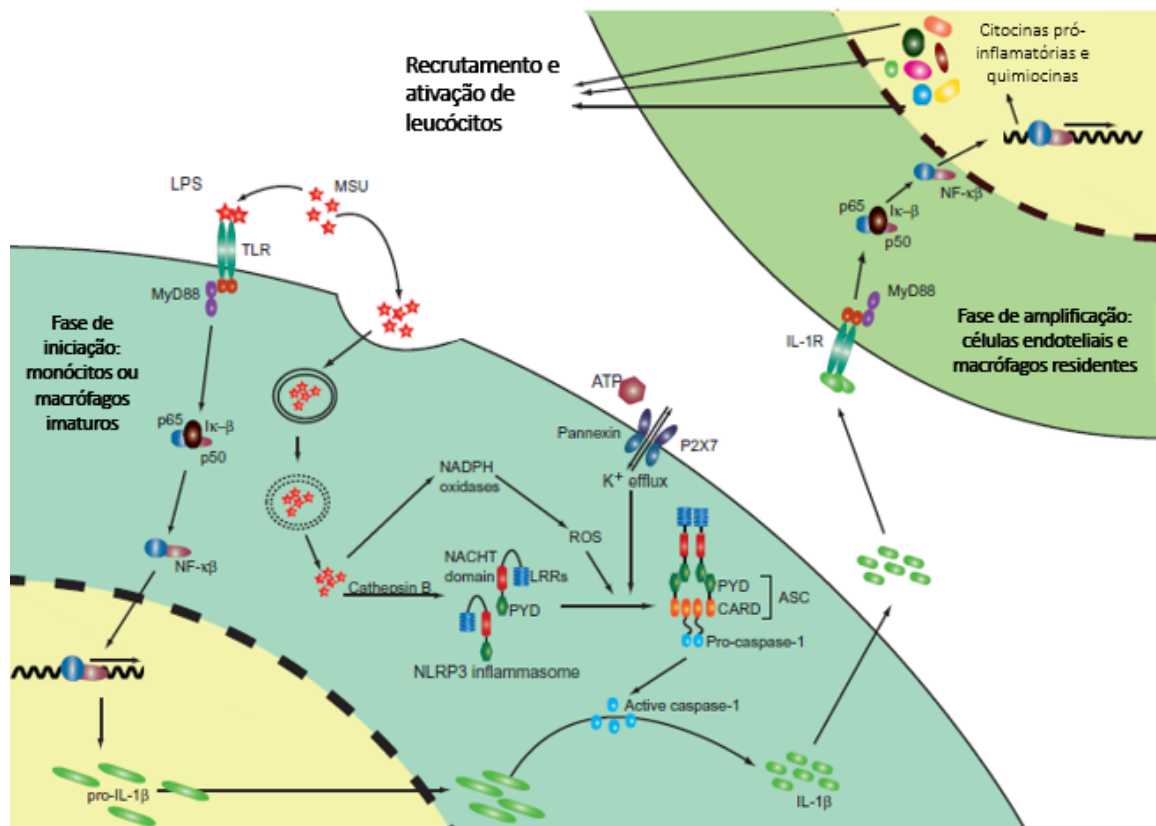
produtores de ânion superóxido e outros radicais livres, citocinas pró-inflamatórias e metaloproteinases (Liu-Bryan *et al.*, 2005; Chia *et al.*, 2008).

Fagócitos mononucleares desempenham papel essencial em todos os estágios da inflamação desde o reconhecimento dos cristais de MSU e ativação do complexo inflamassoma NLRP3 (NLR family pyrin domain containing 3) até o processo resolutivo (Guo *et al.*, 2015). O inflamassoma NLRP3 necessita de um *priming* para ser ativado. O *priming*, ou sinal 1, controla a expressão de todos os componentes necessários para a montagem e ativação do inflamassoma, e contribui para a expressão de proteínas precursoras. Envolve um sinal de inicialização ou iniciação por PAMPs ou DAMPs que são reconhecidos por TLR, levando a ativação da sinalização mediada por NF- κ B, que por sua vez regula a transcrição de componentes relacionados ao inflamassoma, incluindo NLRP3 inativo, pro-IL-1 β e pro-IL-18 (Bauernfeind *et al.*, 2009). Cristais de MSU fornecem o sinal 2, que consiste na oligomerização de NLRP3 e posterior montagem de NLRP3, ASC e pro-caspase-1 via domínios PYD-PYD e CARD-CARD. Isso desencadeia a transformação da pro-caspase-1 em caspase-1, bem como a produção e secreção de IL-1 β madura. Além de promover a ativação do NLRP3, a interação dos cristais MSU com a membrana plasmática promove o efluxo de potássio através de canais iônicos e perturbações mitocondriais levando à produção e liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs) no citosol (So e Martinon, 2017) (Figura 1).

As terapias atuais utilizadas para o tratamento da artrite gotosa são restrita à colchicina, anti-inflamatórios não esteroidais, glicocorticóides (Wortmann, 2005; Schlesinger, 2011) e antagonistas de receptor da IL-1 (Anakinra) (So *et al.*, 2007). Embora sejam relativamente eficazes para muitos pacientes, apresentam efeitos adversos como a toxicidade, úlceras gastrointestinais (inibição da ciclooxigenase-1),

doenças cardiovasculares (inibição da ciclooxigenase-2), desregulação hormonal, além de alto custo e desenvolvimento de anticorpos anti-imunobiológico, no caso da Anakira (Keith e Gilliland, 2007). Desta forma, as terapias convencionais disponíveis são muitas vezes inadequadas, principalmente devido ao fato que pacientes com artrite gotosa são, na maioria dos casos, idosos e apresentam co-morbidades tais como a hipertensão, diabetes mellitus, doenças cardiovasculares, comprometimento da função renal e distúrbios gastrointestinais, o que restringe as opções de tratamento (Schlesinger, 2011). Sendo assim, se faz necessário o desenvolvimento de novas terapias capazes de reduzir a inflamação e dor articular, controlar a doença e melhorar na qualidade de vida dos pacientes.

Figura 1 - Mecanismos da artrite gotosa.



Fonte: Adaptado de Kingsbury *et al*, 2011.

1.4 MEDIADORES LIPÍDICOS PRÓ-RESOLUÇÃO

Mediadores lipídicos pró-resolução (MLPR) são uma nova classe de mediadores que ativamente induzem a resolução do processo inflamatório (Arnardottir et al., 2016). Embora tenham sido primeiramente descritos na resolução do processo inflamatório, os MLPR desempenham papel crucial na defesa do hospedeiro, diminuem a infiltração de leucócitos, promovem eferocitose, diminuem a produção de citocinas pró-inflamatórias, além de promover o remodelamento tecidual (Serhan, 2014). Esta classe de MLPR inclui moléculas derivadas da transformação dos ácidos graxos essenciais do ômega-3, como ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosaexaenóico (DHA) e são subdivididos em famílias das lipoxinas, resolvinas, protectinas e maresinas (Serhan e Chiang, 2008; Serhan, 2014).

Por desempenharem um papel endógeno regulador essencial, são encontrados em baixos níveis em diversas doenças como: asma, artrite reumatoide e Alzheimer (Fraga *et al.*, 2017). A presença em maiores níveis de mediadores lipídicos pró-resolução no líquido sinovial de pacientes com artrite reumatoide, é inversamente proporcional a dor relatada pelos pacientes (Barden *et al.*, 2016) indicando seu papel endógeno regulador importante.

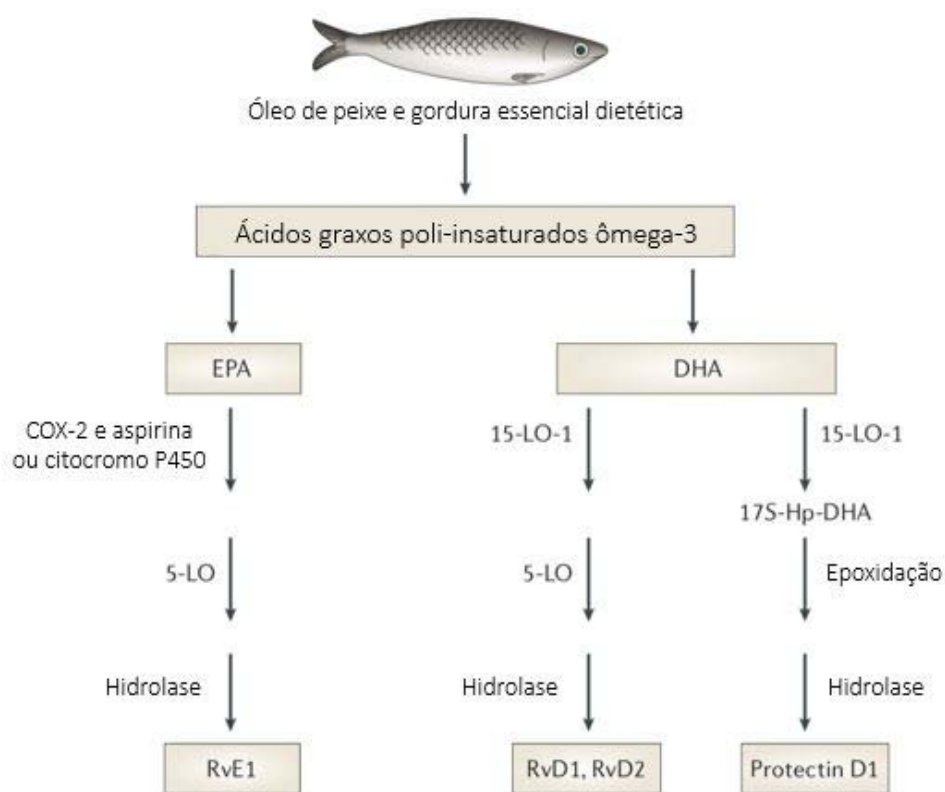
Além disso, ensaios clínicos demonstraram que a suplementação com ômega-3 (precursor dos mediadores lipídicos pró-resolução) reduz a dor reportada em pacientes com artrite reumatoide (Fattori *et al.*, 2016). Os mecanismos de ação envolvidos no efeito analgésico dos MLPR incluem a inibição do NF- κ B e consequentemente inibição de componentes pró-inflamatórios derivados desse fator de transcrição, como citocinas (IL-1 β , TNF- α , IL-6) e quimiocinas (IL-8, CXCL1, CXCL3). Estes mecanismos culminam na inibição do recrutamento de neutrófilos e

ativação de células da glia como astrócitos e micróglia (Serhan e Petasis, 2011; Buckley *et al.*, 2014)

Assim, acompanhado da inibição da resposta pró-inflamatória, os mediadores lipídicos pró-resolução aumentam a resposta anti-inflamatória e de regeneração tecidual. Esse mecanismo é decorrente do aumento da expressão da enzima heme-oxigenase 1, aumento da produção de IL-10, IL-1ra (antagonista de receptor da IL-1), e adiponectina, além do aumento da eferocitose e capacidade de eliminar bactérias por macrófagos. Ademais, os mediadores lipídicos pró-resolução agem em receptores presente em neurônios sensoriais, como o TRPV1, diminuindo seu limiar de ativação (Buckley *et al.*, 2014; Serhan, Chiang, *et al.*, 2015).

Dentre os MLPR, as resolvinas da série D, que possuem como substrato para sua biossíntese o DHA, demonstram potentes ações anti-inflamatórias, de pró-resolução e citoprotetoras (Serhan *et al.* 2000). São divididas em dois grupos: as resolvinas D17S e D17R, de acordo com a rota biossintética em que são produzidas em exsudatos inflamatórios durante a resolução da inflamação. A D17S é convertida em resolvinas da série D (RvD1-RvD6) através de vias bioquímicas distintas, envolvendo etapas de lipoxigenação, formação de epóxido, e hidrolises enzimáticas. A conversão de D17R em resolvinas da série D (AT- RvD1-4), é desencadeada pelo ácido acetilsalicílico, através da ciclooxigenase-2 acetilada ou pela via P450 e subsequentes transformações enzimáticas (Serhan e Chiang, 2008; Seki *et al.*, 2010).

Figura 2 – Metabolismo dos ácidos graxos essenciais derivados do ômega-3.



Fonte: Ji *et al*, 2014.

1.5 RESOLVINA D2

A resolvina D2 (7S,16R,17S-trihydroxy-4Z,8E,10Z,12E,14E,19Z-docosahexaenoic acid, RvD2) é um mediador lipídico pró-resolução produzido fisiologicamente pela oxigenação de DHA por ação das enzimas 15-lipoxigenase e 5-lipoxigenase (Serhan e Petasis, 2011), que desempenha um papel endógeno importante em ações anti-inflamatórias e pró-resolução (Serhan e Chiang, 2008) (Figura 3). A RvD2 liga-se a um GPCR (receptor acoplado à proteína G) de superfície celular específico recentemente identificado, o GPR18 (receptor acoplado à proteína G 18), expresso em leucócitos, incluindo neutrófilos, monócitos e macrófagos. O eixo RvD2-GPR18 estimula assim funções fagocíticas e resolução

de infecções bacterianas, promovendo a proteção de órgãos afetados (Chiang *et al.*, 2015).

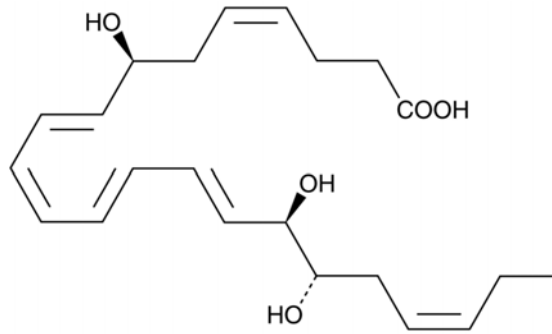
Indivíduos saudáveis sob suplementação de ômega-3 apresentam concentrações elevadas de RvD2 no sangue periférico, potencializando assim atividades anti-inflamatórias e pró-resolutivas (Mas *et al.*, 2012). Tian e colaboradores (2015) relataram que o tratamento intratecal com RvD2 é capaz de reduzir lesões de fibras nervosas e a liberação de citocinas inflamatórias via do TLR4/NF- κ B em modelo animal de doença de Parkinson induzida por LPS, sugerindo assim, a RvD2 como uma nova perspectiva terapêutica para o tratamento de doenças neurodegenerativas (Tian *et al.*, 2015). Em modelo de sepse, RvD2 reduz a migração leucocitária para o foco da inflamação, aumenta a fagocitose de *Escherichia coli* e controla a sepse microbiana (Spite *et al.*, 2009), sugerindo um papel crucial da RvD2 na resolução de infecções bacterianas e inflamação estéril.

Além disso, RvD2 reduz a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-1 β e a expressão de moléculas de adesão VCAM-1 (molécula de adesão da célula vascular 1) e ICAM-1 nos modelos de colite induzida por dextran sulfato de sódio (DSS) (Bento *et al.*, 2011). Klein e colaboradores também demonstraram o efeito da RvD2 sob a inibição de citocinas pró-inflamatórias, utilizando modelo de fibromialgia induzida por reserpina (Klein *et al.*, 2014).

Estudos recentes apontam a RvD2 como um potente inibidor endógeno para TRPV1 e TRPA1 e dor inflamatória, porém, seus mecanismos analgésicos ainda não foram bem estabelecidos. Assim, considerando a ineficácia das terapias atuais e o potencial anti-inflamatório do mediador lipídico pró-resolução RvD2, esta pode representar uma nova alternativa terapêutica para o tratamento de artropatias. Desta forma, buscamos avaliar, no presente trabalho, o efeito e mecanismo de ação de

RvD2 em modelo experimental de artrite induzida por cristais de MSU em camundongos.

Figura 3 - Estrutura química de Resolvina D2.



Fonte: NIH PubChem (2018).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito e mecanismo de ação do mediador lipídico pró resolução RvD2 em modelo de artrite gotosa induzida por cristais de monourato de sódio em camundongos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito de RvD2 sobre a hiperalgesia mecânica e edema induzidos por MSU;
- Avaliar o efeito de RvD2 sobre a migração leucocitária na cavidade articular;
- Avaliar o efeito de RvD2 sobre alterações histológicas no tecido articular;
- Avaliar o efeito de RvD2 sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias *in vivo* e *in vitro*;
- Avaliar o mecanismo de ação de RvD2 sobre a ativação de NF- κ B *in vivo* e *in vitro*;
- Avaliar o mecanismo de ação de RvD2 sobre o estresse oxidativo no tecido articular;
- Avaliar o mecanismo de ação de RvD2 sobre expressão de RNAm para componentes do inflamassoma NLRP3 e receptor GPR18;
- Avaliar o mecanismo de ação de RvD2 sobre a produção de NLRP3 e ASC por Western Blot.

REFERÊNCIAS

ABBAS, Abul K; FAUSTO, Nelson; KUMAR, Vinay; COTRAN, Ramzi S; ASTER, Jon C; ROBBINS, Stanley L.: Robbins e Cotran: Patologia - Bases patológicas das doenças. 8. ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2010. 1458 p.

ABHISHEK, A. Managing Gout Flares in the Elderly: Practical Considerations. **Drugs Aging**, v. 34, n. 12, p. 873-880, Dec 2017. ISSN 1179-1969 (Electronic) 1170-229X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29214511> >.

ARNARDOTTIR, H. H. et al. Resolvin D3 Is Dysregulated in Arthritis and Reduces Arthritic Inflammation. **J Immunol**, v. 197, n. 6, p. 2362-8, Sep 15 2016. ISSN 1550-6606 (Electronic) 0022-1767 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27534559> >.

BARDEN, A. E. et al. Specialised pro-resolving mediators of inflammation in inflammatory arthritis. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 107, p. 24-9, Apr 2016. ISSN 1532-2823 (Electronic) 0952-3278 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27033423> >.

BASBAUM, A. I.; WOOLF, C. J. Pain. **Curr Biol**, v. 9, n. 12, p. R429-31, Jun 17 1999. ISSN 0960-9822 (Print) 0960-9822 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10375535> >.

BAUERNFEIND, F. G. et al. Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. **J Immunol**, v. 183, n. 2, p. 787-91, Jul 15 2009. ISSN 1550-6606 (Electronic) 0022-1767 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19570822> >.

BENTO, A. F. et al. Omega-3 fatty acid-derived mediators 17(R)-hydroxy docosahexaenoic acid, aspirin-triggered resolvin D1 and resolvin D2 prevent experimental colitis in mice. **J Immunol**, v. 187, n. 4, p. 1957-69, Aug 15 2011. ISSN 1550-6606 (Electronic) 0022-1767 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21724996> >.

BINGHAM, B. et al. The molecular basis of pain and its clinical implications in rheumatology. **Nat Clin Pract Rheumatol**, v. 5, n. 1, p. 28-37, Jan 2009. ISSN 1745-8390 (Electronic) 1745-8382 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19098926> >.

BOXER, L.; DALE, D. C. Neutropenia: causes and consequences. **Semin Hematol**, v. 39, n. 2, p. 75-81, Apr 2002. ISSN 0037-1963 (Print)
0037-1963 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11957188> >.

BUCKLEY, C. D.; GILROY, D. W.; SERHAN, C. N. Proresolving lipid mediators and mechanisms in the resolution of acute inflammation. **Immunity**, v. 40, n. 3, p. 315-27, Mar 20 2014. ISSN 1097-4180 (Electronic)
1074-7613 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24656045> >.

CALIL, I. L. et al. Lipopolysaccharide induces inflammatory hyperalgesia triggering a TLR4/MyD88-dependent cytokine cascade in the mice paw. **PLoS One**, v. 9, n. 3, p. e90013, 2014. ISSN 1932-6203 (Electronic)
1932-6203 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24595131> >.

CHIA, E. W. et al. Synthesis and anti-inflammatory structure-activity relationships of thiazine-quinoline-quinones: inhibitors of the neutrophil respiratory burst in a model of acute gouty arthritis. **Bioorg Med Chem**, v. 16, n. 21, p. 9432-42, Nov 1 2008. ISSN 1464-3391 (Electronic)
0968-0896 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18835721> >.

CHIANG, N. et al. Identification of resolvin D2 receptor mediating resolution of infections and organ protection. **J Exp Med**, v. 212, n. 8, p. 1203-17, Jul 27 2015. ISSN 1540-9538 (Electronic)
0022-1007 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26195725> >.

CUNHA, F. Q. et al. The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. **Br J Pharmacol**, v. 107, n. 3, p. 660-4, Nov 1992. ISSN 0007-1188 (Print)
0007-1188 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1472964> >.

DALBETH, N.; MERRIMAN, T. R.; STAMP, L. K. Gout. **Lancet**, v. 388, n. 10055, p. 2039-2052, Oct 22 2016. ISSN 1474-547X (Electronic)
0140-6736 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27112094> >.

DUBIN, A. E.; PATAPOUTIAN, A. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. **J Clin Invest**, v. 120, n. 11, p. 3760-72, Nov 2010. ISSN 1558-8238 (Electronic)
0021-9738 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21041958> >.

EGGEBEEN, A. T. Gout: an update. **Am Fam Physician**, v. 76, n. 6, p. 801-8, Sep 15 2007. ISSN 0002-838X (Print)
0002-838X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17910294> >.

FATTORI, V.; AMARAL, F. A.; VERRI, W. A., JR. Neutrophils and arthritis: Role in disease and pharmacological perspectives. **Pharmacol Res**, v. 112, p. 84-98, Oct 2016. ISSN 1096-1186 (Electronic)

1043-6618 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26826283> >.

FRAGA, V. G. et al. Resolution of inflammation, n-3 fatty acid supplementation and Alzheimer disease: A narrative review. **J Neuroimmunol**, v. 310, p. 111-119, Sep 15 2017. ISSN 1872-8421 (Electronic)

0165-5728 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28778434> >.

FREIRE, M. O.; VAN DYKE, T. E. Natural resolution of inflammation. **Periodontol 2000**, v. 63, n. 1, p. 149-64, Oct 2013. ISSN 1600-0757 (Electronic)

0906-6713 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23931059> >.

GEORGE, J.; STRUTHERS, A. D. Role of urate, xanthine oxidase and the effects of allopurinol in vascular oxidative stress. **Vasc Health Risk Manag**, v. 5, n. 1, p. 265-72, 2009. ISSN 1178-2048 (Electronic)

1176-6344 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19436671> >.

GHOSH, S.; HAYDEN, M. S. New regulators of NF-kappaB in inflammation. **Nat Rev Immunol**, v. 8, n. 11, p. 837-48, Nov 2008. ISSN 1474-1741 (Electronic)

1474-1733 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18927578> >.

GUO, H.; CALLAWAY, J. B.; TING, J. P. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. **Nat Med**, v. 21, n. 7, p. 677-87, Jul 2015. ISSN 1546-170X (Electronic)

1078-8956 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26121197> >.

JI, R. R.; CHAMESSIAN, A.; ZHANG, Y. Q. Pain regulation by non-neuronal cells and inflammation. **Science**, v. 354, n. 6312, p. 572-577, Nov 4 2016. ISSN 1095-9203 (Electronic)

0036-8075 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27811267> >.

KAPLANSKI, G. et al. IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. **Trends Immunol**, v. 24, n. 1, p. 25-9, Jan 2003. ISSN 1471-4906 (Print)

1471-4906 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12495721> >.

KEITH, M. P.; GILLILAND, W. R. Updates in the management of gout. **Am J Med**, v. 120, n. 3, p. 221-4, Mar 2007. ISSN 1555-7162 (Electronic)

0002-9343 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17349440> >.

KLEIN, C. P. et al. Effects of D-series resolvins on behavioral and neurochemical changes in a fibromyalgia-like model in mice. **Neuropharmacology**, v. 86, p. 57-66, Nov 2014. ISSN 1873-7064 (Electronic)

0028-3908 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24929111> >.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. **Robbins and Cotran pathologic basis of disease**. Ninth edition. xvi, 1391 pages.

KUO, C. F. et al. Global epidemiology of gout: prevalence, incidence and risk factors. **Nat Rev Rheumatol**, v. 11, n. 11, p. 649-62, Nov 2015. ISSN 1759-4804 (Electronic)

1759-4790 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26150127> >.

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 Rheum**, v. 52, n. 9, p. 2936-46, Sep 2005. ISSN 0004-3591 (Print)

0004-3591 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16142712> >.

MAS, E. et al. Resolvins D1, D2, and other mediators of self-limited resolution of inflammation in human blood following n-3 fatty acid supplementation. **Clin Chem**, v. 58, n. 10, p. 1476-84, Oct 2012. ISSN 1530-8561 (Electronic)

0009-9147 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22912397> >.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 428-35, Jul 24 2008. ISSN 1476-4687 (Electronic)

0028-0836 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18650913> >.

PEIRS, C.; SEAL, R. P. Neural circuits for pain: Recent advances and current views. **Science**, v. 354, n. 6312, p. 578-584, Nov 04 2016. ISSN 1095-9203 (Electronic)

0036-8075 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27811268> >.

PINHO-RIBEIRO, F. A.; VERRI, W. A., JR.; CHIU, I. M. Nociceptor Sensory Neuron-Immune Interactions in Pain and Inflammation. **Trends Immunol**, v. 38, n. 1, p. 5-19, Jan 2017. ISSN 1471-4981 (Electronic)

1471-4906 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27793571> >.

RODDY, E.; DOHERTY, M. Epidemiology of gout. **Arthritis Res Ther**, v. 12, n. 6, p. 223, 2010. ISSN 1478-6362 (Electronic)

1478-6354 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21205285> >.

SACHS, D. et al. Tumour necrosis factor-alpha, interleukin-1beta and interleukin-8 induce persistent mechanical nociceptor hypersensitivity. **Pain**, v. 96, n. 1-2, p. 89-97, Mar 2002. ISSN 0304-3959 (Print)
 0304-3959 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11932065> >.

SAIGAL, R.; AGRAWAL, A. Pathogenesis and Clinical Management of Gouty Arthritis. **J Assoc Physicians India**, v. 63, n. 12, p. 56-63, Dec 2015. ISSN 0004-5772 (Print)
 0004-5772 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27666904> >.

SAUTIN, Y. Y.; JOHNSON, R. J. Uric acid: the oxidant-antioxidant paradox. **Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids**, v. 27, n. 6, p. 608-19, Jun 2008. ISSN 1532-2335 (Electronic)
 1525-7770 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18600514> >.

SCHETT, G. et al. Why does the gout attack stop? A roadmap for the immune pathogenesis of gout. **RMD Open**, v. 1, n. Suppl 1, p. e000046, 2015. ISSN 2056-5933 (Print)
 2056-5933 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26557370> >.

SCHLESINGER, N. Difficult-to-treat gouty arthritis: a disease warranting better management. **Drugs**, v. 71, n. 11, p. 1413-39, Jul 30 2011. ISSN 1179-1950 (Electronic)
 0012-6667 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21812506> >.

SEKI, H. et al. Resolvins as regulators of the immune system. **ScientificWorldJournal**, v. 10, p. 818-31, May 4 2010. ISSN 1537-744X (Electronic)
 1537-744X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20454764> >.

SERHAN, C. N. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. **Nature**, v. 510, n. 7503, p. 92-101, Jun 05 2014. ISSN 1476-4687 (Electronic)
 0028-0836 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24899309> >.

SERHAN, C. N.; CHIANG, N. Endogenous pro-resolving and anti-inflammatory lipid mediators: a new pharmacologic genus. **Br J Pharmacol**, v. 153 Suppl 1, p. S200-15, Mar 2008. ISSN 0007-1188 (Print)
 0007-1188 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17965751> >.

SERHAN, C. N.; CHIANG, N.; DALLI, J. The resolution code of acute inflammation: Novel pro-resolving lipid mediators in resolution. **Semin Immunol**, v. 27, n. 3, p. 200-15, May 2015. ISSN 1096-3618 (Electronic)

1044-5323 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25857211> >.

SERHAN, C. N. et al. Protectins and maresins: New pro-resolving families of mediators in acute inflammation and resolution bioactive metabolome. **Biochim Biophys Acta**, v. 1851, n. 4, p. 397-413, Apr 2015. ISSN 0006-3002 (Print)

0006-3002 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25139562> >.

SERHAN, C. N.; PETASIS, N. A. Resolvins and protectins in inflammation resolution. **Chem Rev**, v. 111, n. 10, p. 5922-43, Oct 12 2011. ISSN 1520-6890 (Electronic)

0009-2665 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21766791> >.

SERHAN, C. N.; SAVILL, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. **Nat Immunol**, v. 6, n. 12, p. 1191-7, Dec 2005. ISSN 1529-2908 (Print)

1529-2908 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16369558> >.

SO, A. et al. A pilot study of IL-1 inhibition by anakinra in acute gout. **Arthritis Res Ther**, v. 9, n. 2, p. R28, 2007. ISSN 1478-6362 (Electronic)

1478-6354 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17352828> >.

SO, A. K.; MARTINON, F. Inflammation in gout: mechanisms and therapeutic targets. **Nat Rev Rheumatol**, v. 13, n. 11, p. 639-647, Nov 2017. ISSN 1759-4804 (Electronic)

1759-4790 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28959043> >.

SPITE, M. et al. Resolvin D2 is a potent regulator of leukocytes and controls microbial sepsis. **Nature**, v. 461, n. 7268, p. 1287-91, Oct 29 2009. ISSN 1476-4687 (Electronic)

0028-0836 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19865173> >.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern recognition receptors and inflammation. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 805-20, Mar 19 2010. ISSN 1097-4172 (Electronic)

0092-8674 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20303872> >.

TIAN, Y. et al. Resolvin D2 recovers neural injury by suppressing inflammatory mediators expression in lipopolysaccharide-induced Parkinson's disease rat model. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 460, n. 3, p. 799-805, May 8 2015. ISSN 1090-2104 (Electronic)

0006-291X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25824039> >.

TODD, A. J. Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. **Nat Rev Neurosci**, v. 11, n. 12, p. 823-36, Dec 2010. ISSN 1471-0048 (Electronic) 1471-003X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21068766> >.

WOOLF, C. J.; SALTER, M. W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. **Science**, v. 288, n. 5472, p. 1765-9, Jun 09 2000. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10846153> >.

WORTMANN, R. L. Recent advances in the management of gout and hyperuricemia. **Curr Opin Rheumatol**, v. 17, n. 3, p. 319-24, May 2005. ISSN 1040-8711 (Print) 1040-8711 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15838244> >.

WYBLE, C. W. et al. TNF-alpha and IL-1 upregulate membrane-bound and soluble E-selectin through a common pathway. **J Surg Res**, v. 73, n. 2, p. 107-12, Dec 1997. ISSN 0022-4804 (Print) 0022-4804 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9441802> >.

3 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO (British Journal of Pharmacology)

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Dor, Inflamação, Neuropatia e Câncer, da Universidade Estadual de Londrina. Os resultados parciais estão descritos no artigo intitulado “Resolvin D2 ameliorates experimental gouty arthritis in a NLRP3 inflammasome-dependent manner”, apresentado de acordo com as normas da revista *British Journal of Pharmacology* (Anexo A).

Resolvin D2 ameliorates experimental gouty arthritis in a NLRP3 inflammasome-dependent manner.

Running title: Resolvin D2 ameliorates gouty arthritis

Stephanie Badaro-Garcia^{1,a}, Tiago H. Zaninelli^{1,a}, Victor Fattori¹, Larissa Staurengo-Ferrari¹, Mariana M. Bertozzi¹, Sergio M Borghi¹, Ana C. Rossaneis¹, Rubia Casagrande², Waldiceu A. Verri Jr^{1*}.

¹ Department of General Pathology, Biological Sciences Center, Londrina State University, Rod. Celso Garcia Cid PR 445, Km 380 Cx. Postal 10.011, 86057-970, Londrina, Paraná Brazil.

² Department of Pharmaceutical Sciences, University Hospital (Health Science Center), Londrina State University, Av. Robert Koch 60, 86038-350, Paraná, Brazil.

^a These authors contributed equally.

* Corresponding author

Correspondence: Waldiceu A. Verri Jr, Department of General Pathology, Biological Sciences Center, Londrina State University, Rod. Celso Garcia Cid PR 445, Km 380 Cx. Postal 10.011, 86057-970, Londrina, Paraná, Brazil. E-mail addresses: waverri@uel.br, waldiceujr@yahoo.com.br

ABSTRACT

Background and purpose: Gouty arthritis (GA) is a common inflammatory arthritis due to monosodium urate (MSU) crystals accumulation within the joint. Current treatment display many side effects and ineffective analgesic effects. Resolvin D2 (RvD2) derived from omega-3 fatty acids presents potent activity in inflammatory responses via multiple cellular targets. Thus, this study investigated the effects of RvD2 in experimental model of GA *in vivo* and *in vitro*.

Experimental approach: Dose- and time-dependent experiments were performed to assess mechanical hyperalgesia and oedema. After selected the best dose and time of treatment, mice were treated with RvD2 (3 ng/animal, i.p.) 72 h before stimulus to

evaluate leukocyte recruitment, cytokine production and oxidative stress. Cytokine production, NF- κ B activation, GPR18 and inflammasome components mRNA expression and its correspondent protein were determined in lipopolysaccharide-primed macrophages challenged with MSU.

Key results: RvD2 inhibited MSU-induced mechanical hyperalgesia and oedema in a time-dependent manner. RvD2 reduced leukocyte recruitment into the knee joint, TNF- α and IL-1 β production, NF- κ B activation, superoxide anion production and GSH levels *in vivo*. RvD2 treatment decreased cytokines production, NF- κ B activation, mRNA expression of inflammasome components and their correspondent proteins *in vitro*.

Conclusions and implications: RvD2 reduces inflammatory and oxidative parameters by targeting inflammasome components. Our data suggests RvD2 as a novel safe approach for GA treatment.

INTRODUCTION

Gouty arthritis (GA) is one of the most common forms of inflammatory arthritis caused by the deposition of crystals of monosodium urate (MSU) within the joints due to increased production or low excretion of uric acid (So and Martinon, 2017). The accumulation of MSU crystals in the joints triggers an inflammatory response leading to acute flare, which is considered one of the most painful acute conditions experienced by human beings (Bardin *et al.*, 2015; Abhishek, 2017). The world prevalence of GA ranges from 0.1-10%, however, recent studies have been demonstrating the increase of its prevalence in developing countries (Kuo *et al.*, 2015).

Gout mechanism consists in MSU crystals assembly by phagocytic cells, which triggers NLRP3 inflammasome activation. The activation of NLRP3

inflammasome, which is formatted by an adaptor protein ASC and the inflammatory protease caspase-1, leads to processing and release of active IL-1 β (Davis *et al.*, 2011). The production of IL-1 β is the main feature of the development of inflammation and pain in GA. Furthermore, IL-1 β activates IL-1R on endothelial cells and resident macrophages within the joint, resulting in signal transduction and gene activation and leading to the secretion of an array of pro-inflammatory cytokines and chemokines (Martinon *et al.*, 2006a). The presence of MSU crystals also prompts oxidative stress increasing the production of reactive oxygen species, and consequently exacerbating the inflammatory response (Zamudio-Cuevas *et al.*, 2015). Currently, the therapeutic approach is restricted to colchicine, non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), and glucocorticoids. Despite these traditional agents act on NLRP3 inflammasome, their mechanisms of action are not precise, and their actions complex and wide-ranging (Cronstein *et al.*, 2013). Although inhibition of inflammatory upstream pathway is effective in reduce pain and inflammation for most patients with acute GA, the benefit-risk margin of these agents is generally low and varies substantially from one individual to another (Martinon *et al.*, 2006b). Additionally, although effective, those drugs display several side effects and exhibit contraindications to comorbidities associated to GA, for instance cardiovascular disease and hypertension (Wortmann, 2005). In this sense, the development of novel analgesic drugs for gout pain management is very important.

Resolvin D2 (7S,16R,17S-trihydroxy-4Z,8E,10Z,12E,14E,19Z-docosahexaenoic acid, RvD2), one of the members of specialized pro-resolving lipid mediators (SPMs) family, is derived from the ω 3-polyunsaturated fatty acid, docosahexaenoic acid (DHA), as a result of a series of reactions catalyzed by lipoxygenases. Previous data have demonstrated that RvD2 attenuates pain in a

fibromyalgia and in an inflammatory pain model in mice and suppress tumor progression (Spite *et al.*, 2009; Klein *et al.*, 2014; Sulciner *et al.*, 2018). Moreover, RvD2 promotes revascularization in a model of hind limb ischemia, and was able to inhibit microglial activation in lipopolysaccharide-induced Parkinson's disease, reducing pro-inflammatory cytokines and NF- κ B activation (Tian *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2016). Despite these previous evidence, the effect of RvD2 in gout pathogenesis remains to be appraised.

In this regard, the aim of this study was to investigate the potential anti-inflammatory and antioxidants effects of the treatment with RvD2 in an experimental model of GA in mice.

METHODS

Experimental design

Mice were pretreated with RvD2 (0.3, 3 and 30 ng/animal, i.p.) or vehicle (3.2% ethanol in saline) 0.5 h before MSU injection (100 μ g/10 μ L, i.a.). Mechanical hyperalgesia and joint oedema were assessed 1, 3, 5, 7 and 15 h after stimulus. The dose of 3 ng of RvD2 was selected for a time-dependent experiment. Further, mice were treated with RvD2 (3 ng/animal, i.p.) or vehicle 0.5, 24, 48 or 72 h before MSU injection. The dose of 3 ng and pre-treatment of 72 h were chosen for subsequent experiments: leukocyte migration into knee, histopathological analysis (HE staining), cytokines assay and NF- κ B activation by ELISA, mRNA expression of GPR18, superoxide anion production and reduced glutathione (GSH) assays. For *in vitro* experiments, bone marrow-derived macrophages (BMDMs) were treated 0.5 h before LPS (500 ng/mL) priming, or signal 1, for 3 h followed by MSU stimulus, or signal 2. Supernatant was harvest 5 h after MSU stimulus and then cytokines levels, NF- κ B

activation, mRNA expression of GPR18, NLRP3, ASC, pro-caspase-1 and pro-IL-1 β were assessed. Time points of sample collection were based on previous studies in our laboratory (Ruiz-Miyazawa *et al.*, 2017).

Animals

Male Swiss and C57BL/6 (20-25 g) mice from Londrina State University, Parana, Brazil, were used in this study. Mice were housed in standard clear plastic cages, and received food and water *ad libitum* under a 12:12 h light/dark cycle at 23 °C. At the end of experiments, mice were anesthetized with isoflurane 3% to minimize suffering (Abbott Park, IL, USA) and euthanized by cervical dislocation followed by decapitation. Animal care and handling procedures were in accordance with International Association for Study of Pain (IASP) guidelines and were approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) of the Londrina State University (process number 22186.2016.37).

Drugs

The following materials were purchased from the following sources: Resolvin D2 (7S,16R,17S-trihydroxy-4Z,8E,10Z,12E,14E,19Z-docosahexaenoic acid) at 95% of purity (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA), Uric acid (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), NaCl 0.9% (Fresenius Kabi Brasil Ltda. Aquiraz, CE, Brazil), Lipopolissacarídeo (LPS) (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), Fetal bovine serum (FBS) and RPMI 1640 media from Gibco, Waltham, MA, USA.

MSU crystal preparation

MSU crystals were made according to a method previously described (Nishimura *et al.*, 1997). In short, 800 mg of monosodium urate was dissolved in 155 mL of boiling

water containing 5 mL of 1 N NaOH. Afterwards, the pH was adjusted to 7.2, and the solution was gradually chilled by stirring at room temperature. The crystals were obtained by centrifugation at 3.000 g for 2 min at 4°C. The crystals were evaporated and sterilized by heating at 180°C for 2 hours and stored until use.

Electronic pressure meter test

Mechanical hyperalgesia was evaluated by an electronic version of von Frey filaments as previously described (Pinto *et al.*, 2010). It consists of a hand-held force transducer fitted with a polypropylene tip (Electronic analgesimeter; Insight, Ribeirão Preto, SP, Brazil) adapted with a large tip 4.15mm² to the probe. An increasing perpendicular force was applied to the central area of the plantar surface of the hind paw to induce flexion of the femur-tibial joint followed by paw withdrawal. The intensity of the pressure applied at the moment of paw withdrawal was automatically registered. The flexion-elicited mechanical threshold is expressed in grams (g).

Oedema

The joint oedema was measured with a caliper (Mitutoyo, Suzano, SP, Brazil) before (basal, time 0) and 1, 3, 5, 7 and 15 h after intra-articular stimulus with MSU crystals. The articular swelling was determined for each mouse and data in the figures show the difference between the indicated time points and the basal time. The oedema value is expressed as oedema (Δ mm/joint).

Leukocyte migration to the knee joint

Mice received stimulus or vehicle into articular cavity and were euthanized after 15 h. The knee joint cavities were washed 3 times with 3.3 μ l of sterile saline with 1 mM EDTA (Staurengo-Ferrari *et al.*, 2017). The total number of leukocytes was

determined in a Neubauer chamber diluted in Turk's solution. Differential cell counts were performed using the Fast Panoptic Kit for histological analysis (Laborclin, Pinhas, BR, Brazil) to distinguish polymorphonuclear (PMN) from mononuclear cells under a light microscope (Olympicus Optical Co., Hamburg, Germany). The results are expressed as the number of total of leukocytes, mononuclear or polymorphonuclear cells $\times 10^4$ per cavity.

Histopathological analysis

Mice were anesthetized and euthanized 15 h after MSU injection, then, knee joints were dissected, fixed with 10% paraformaldehyde in PBS, decalcified, embedded in paraffin, and sectioned with a microtome. Tissue sections were stained with hematoxylin and eosin. Results are expressed as leukocyte infiltrate (cell/field) counted at the inflammatory foci as indicative of synovitis (Ruiz-Miyazawa *et al.*, 2017).

Cytokine measurement

Knee joint samples were collected 15 h after stimulus (MSU 100 $\mu\text{g}/10\mu\text{L}$, i.a) and homogenized in 500 μl of saline with a tissue-tearor followed by centrifugation (3600 rpm \times 15 min \times 4 $^{\circ}\text{C}$). The supernatants of joints homogenates were used to determine TNF- α and IL-1 β levels by ELISA using commercial kits (eBioscience, San Diego, CA, USA). Absorbance was measured at 450 nm (Multiskan GO, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA USA). The results are expressed as pg per g of tissue.

Superoxide anion production

The superoxide anion production was determined by the reduction of the reducer dye nitroblue tetrazolium (NBT). Knee joint samples were collected 15 h after stimulus (MSU 100 µg/10µL, i.a) and homogenized with 500 µl KCl. The test was adapted to a microplate as previously described (Hohmann *et al.*, 2013).The NBT reduction was measured at 600 nm (Multiskan GO, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA USA). The results are shown as optical density (OD) per mg of tissue.

Reduced glutathione (GSH) levels measurement

Knee joint samples were collected 15 h after stimulus (MSU 100 µg/10µL, i.a) and maintained at -80 °C for at least 48 h, and subsequently homogenized with 200 µL of 0.02 M EDTA. The homogenate was mixed with 25 µL of trichloroacetic acid 50% and was homogenized three times over 15 min. The mixture was centrifuged (1500 g x 15 min x 4 °C). The supernatant was added to 200 µL of 0.2 M TRIS buffer, pH 8.2, and 10 µL of 0.01M DTNB. After 5 min, the absorbance was measured at 412 nm (Multiskan GO, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA USA) against a blank reagent with no supernatant. A standard GSH curve was formed. The results are expressed as nmol per mg of protein (Sedlak *et al.*, 1968; Staurengo-Ferrari *et al.*, 2014)

Bone marrow-derived macrophages (BMDMs) isolation and inflammasome activation assay

Bone marrow-derived macrophages were achieved from femora and tibiae of C57BL/6 mice (20-25 g) and cultured in RPMI 1640 media supplemented with 10% FBS and 15% L929 cell conditioned medium. BMDMs were harvested at day 7 and plated at the density of 1.5×10^6 cells/well in 96-well plate. BMDM were pre-treated with RvD2 (1, 10 or 100 pM) 30 min before lipopolysaccharide (LPS) administration (500 ng/mL) (sinal 1) (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) and 3 h later cells

received MSU stimulation (450 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (sinal 2) in order to induce NLRP3 inflammasome activation as described previously (Martinon *et al.*, 2006b). Supernatants were collected 5 h after MSU stimulation and IL-1 β and TNF- α levels quantitated by ELISA. Lactate dehydrogenase (LDH) release in the supernatant was used as a marker of cellular viability.

NF- κ B activity

NF- κ B activation was evaluated *in vivo* and *in vitro*. For *in vivo* analysis, knee joints were dissected out and homogenized in lysis buffer (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA). Lysates were centrifuged (3000 rpm x 10 min x 4 $^{\circ}\text{C}$), and the supernatants were assessed. For *in vitro* analysis, BMDMs were achieved from femora and tibiae of C57BL/6 mice (20-25 g) and cultured as previous described above. BMDMs were harvested at day 7 and plated at the density of 3×10^5 cells/well in 6-well plate. BMDMs were collected 5 h after MSU stimulus in 1 ml of saline and centrifuged (3600 rpm x 5 min x 4 $^{\circ}\text{C}$). Cells were suspended in ice-cold lysis buffer, centrifuged (3600 rpm x 10 min x 4 $^{\circ}\text{C}$) and the supernatants collected. The supernatants from joint and cells were used to assess the levels of phosphorylated and total NF- κ B p65 subunit by ELISA using PathScan $^{\circ}$ kits (Cell Signaling, Beverly, MA, USA) according to the manufacturer's directions. Data are expressed as phospho NF- κ B/total NF- κ B absorbances ratio and were measured at 450 nm (Multiskan GO Thermo Scientific).

Quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR)

RT-qPCR was performed *in vivo* and *in vitro* as previously described (Hohmann *et al.*, 2013). For *in vivo* analysis, knee joints were dissected out 15 h after stimulus and homogenized in TRIzol $^{\circ}$ reagent. For *in vitro* analysis, BMDMs were harvested at day

7 and plated at the density of 3×10^6 cells/well in 6-well plate. Cells were harvested 5 h after MSU stimulus and homogenized in TRIzol[®] reagent. Total RNA (joint and cells) was extracted by using the SV Total RNA Isolation System (Promega). All reactions were performed following cycling conditions: 50° C for 2 min, 95°C for 2 min, followed by 40 cycles of 95° C for 15 s and 60° C for 30 s. RT-qPCR was performed in a LightCycler Nano Instrument (Roche, Mississauga, ON, USA) sequence detection system by using the Platinum SYBR Green qPCR SuperMix UDG (Invitrogen, USA). Supplementary material 1 presents the primer's sequences. The GAPDH mRNA expression was used as a reference gene to normalize data.

Western blot assay

BMDMs were harvested seven days after culture and plated at the density of 3×10^5 cells/well in 6-well plate (Domiciano *et al.*, 2017). BMDMs were collected 5 h after stimulus in ice-cold PBS and centrifuged ($0.4 \text{ rcf} \times 10 \text{ min} \times 4^\circ\text{C}$) and resuspended in a RIPA buffer containing protease inhibitors (Cell Signaling Technology; Denver, MA, USA). The concentrations of the lysate were determined using the Lowry method. The protein samples were separated on an SDS/PAGE gel and transferred to nitrocellulose membranes (Amersham Pharmacia Biotech. Pittsburgh, PA, USA) followed by the incubation with primary antibody against b-actina (1:200, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), antibody NLRP3 (1:500; Novus Biologicals, Littleton, CO, USA) or ASC (1:500; Novus Biologicals, Littleton, CO, USA), in filtered TBS-T buffer containing 5% BSA (Sigma, St Louis, MI, USA) overnight at 4°C. Membranes were then incubated for 2 h at room temperature with goat anti-mouse IgG-HRP or goat anti-rabbit IgG-HRP secondary antibody (1:2500, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA). The blots were visualized in an ECL solution

(Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK) and exposed in a ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad Laboratories, Hercules CA, USA).

Statistical analysis

Data were analyzed using GraphPad Prism statistical software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA, version 6.0). Results are presented as means \pm SEM of measurements made on 6 mice per group per experiment and are representative of two independent experiments. Two-way ANOVA was used to compare the groups and doses at all times when the parameters were measured at different times after the stimulus injection. The analyzed factors were treatments, time, and time versus treatment interaction. One-way ANOVA followed by Tukey's t test was performed for each time-point. The level of significance was set at $P < 0.05$ and are represented by symbols (* or #).

Results

RvD2 inhibits MSU-induced mechanical hyperalgesia and oedema in a dose and time-dependent manner

In the first set of experiments, mice were treated with RvD2 (0.3, 3, 30 ng/animal, i.p.) or vehicle (3.2% ethanol in saline) 0.5 h before i.a. administration of MSU (100 μ g/paw). Mechanical hyperalgesia was evaluated at 1, 3, 5, 7 and 15 h after MSU injection. MSU induced mechanical hyperalgesia at all times points. RvD2 at doses of 0.3 and 30 ng was not able to reduce MSU-induced mechanical hyperalgesia and edema at all-time points evaluated (Fig 1A-B). RvD2 at 3 ng in turn reduced mechanical hyperalgesia at all-time points evaluated. Afterwards, animals were treated with RvD2 (3 ng/animal, i.p.) 0.5, 24, 48 and 72 h before MSU stimulus. The

dose of 3 ng/animal of RvD2 and pre-treatment of 72h reduced mechanical hyperalgesia since the first hour and sustained its effect until 15 h after MSU stimulus (Fig. 1C-D). Based on the results, the dose of 3 ng of RvD2 and the pre-treatment of 72 h were chosen for subsequent experiments.

RvD2 inhibits MSU-induced leukocyte recruitment and synovitis into the knee joint

Leukocytes are highly involved in gout inflammation (Chen *et al.*, 2017). Considering the participation of those cells in GA, we found that mice treated with RvD2 (3 ng/animal, i.p.) presented reduced total recruitment of leukocytes (Fig. 2E), mononuclear cell (Fig. 2F) and polymorphonuclear (Fig. 2G) induced by MSU (71% and 70%, respectively). Corroborating, RvD2 treatment (3 ng/animal, i.p.) was capable to decrease the inflammatory infiltrate cells in the joint, as an indicative of synovitis (Fig. 2A-D).

RvD2 inhibits MSU-induced TNF- α and IL-1 β production and NF- κ B activation *in vitro* and *in vivo*

Pro-inflammatory cytokines are the key mediators of gout (So *et al.*, 2017). In this context, RvD2 effect on MSU-induced cytokines production were assessed *in vitro* and *in vivo*. RvD2 decreased TNF- α (Fig. 3A) and IL- β (Fig. 3B) production by 34% and 35%, respectively *in vivo*. *In vitro*, LPS priming (first signal) followed by MSU stimulation (second signal) induced an increase of IL-1 β levels in BMDM (Ruiz-Miyazawa *et al.*, 2017). In LPS-primed BMDMs, RvD2 was able to reduce in a concentration-dependent manner the production of TNF- α (Fig. 3D) and IL- β (Fig. 3E). RvD2 at the concentration of 100 pM decreased TNF- α (signal 1) and IL-1 β (signal 2) levels suggesting the reduction of inflammasome activation. Therefore, that

concentration was chosen for the following experiments. To evaluate cell damage, BMDM supernatants were used to LDH assay. Treatment with RvD2 (1-100 pM) did not increase LDH leakage indicating its effects were not due to increased cell death (Supplementary Fig. 1). Furthermore, RvD2 inhibited MSU-induced NF- κ B activation as observed by a significantly decreased phosphorylated-NF- κ B ratio/total NF- κ B *in vivo* (Fig. 4C) and *in vitro* (Fig. 4G) when compared to the control group.

RvD2 inhibits MSU-induced superoxide anion and reduced glutathione production in knee joint

Assuming that MSU crystals lead to reactive oxygen and nitrogen species production (Zamudio-Cuevas *et al.*, 2015), we addressed if RvD2 was capable to decrease oxidative stress parameters. Treatment with RvD2 (3 ng/animal) 72 h before MSU stimulus inhibited reduction of antioxidant defenses as observed by a sustenance of GSH levels. Moreover, RvD2 treatment reduced superoxide anion production restoring samples endogenous antioxidant capacity (Fig. 4).

RvD2 inhibits MSU-induced *Nlrp3*, *Asc*, *Pro-caspase-1* and *Pro-il-1 β* mRNA expression and NLRP3 and ASC protein levels in BMDMs

The NLRP3 inflammasome is the main pathway by which MSU crystals trigger the cellular inflammatory response (So *et al.*, 2017). Treatment with RvD2 (100 pM) reduced mRNA expression of all inflammasome components *Nlrp3* (Fig. 6A), *Asc* (Fig. 7D), *Pro-caspase-1* (Fig. 6G) and *Pro-il-1 β* (Fig. 6H) determined by RT-RT-qPCR. Corroborating with these data, RvD2 reduced protein levels of inflammasome components NLRP3 (Fig. 6B, C) and ASC (Fig. 6E, F) determined by Western blot.

RvD2 modulates *GPR18* expression *in vivo* and *in vitro*

Given RvD2 possess a specific G protein-coupled receptor, named GPR18, and the RvD2–GPR18 axis is known to regulate bacterial infections and intrinsic organ protection (Chiang *et al.*, 2015), we evaluated its mRNA expression in mice joint and BMDM cells. RvD2 (100 pM) treatment increased GPR18 mRNA expression, not only in knee joint (Fig. 7A) but also in BMDM cells (Fig. 7B).

Discussion and Conclusions

GA is the one of most common forms of inflammatory arthritis due to MSU deposition within the joint, which is formed in the presence of increased urate concentrations. Unbearable pain and swelling are the major concerns of patients who experience acute flares symptoms. This response is initiated when MSU crystals interact with synoviocytes to form and activate the NLRP3 inflammasome (So *et al.*, 2017). The NLRP3 inflammasome cleaves pro-IL-1 β into mature IL-1 β triggering vasodilatation and rapid recruitment of neutrophils to the site of crystal deposition, generating acute inflammatory episodes (Chen *et al.*, 2006). The present data showed that RvD2 decreased mechanical hyperalgesia, oedema, leukocyte recruitment, oxidative stress, TNF- α and IL-1 β cytokine production in addition to the reduction of NF- κ B activation. Additionally, RvD2 downregulated *Nlrp3*, *Asc*, *Pro-caspase-1* and *Pro-IL-1 β* mRNA expression and upregulated *GPR18* mRNA expression.

The analgesic potential of RvD2 has already been demonstrated in different pain models. Herein, we demonstrated that a single treatment with a low dose of RvD2 (3 ng/animal) presented analgesic effect, reducing MSU-induced mechanical hyperalgesia and joint edema in mice for at least 15 h, in a dose-dependent manner. Corroborating with our data, Park *et al* (2011) have shown that peripheral

administration of RvD2, at very low doses (0.01-10 ng), reduces inflammatory pain in acute model, as a result of TRPV1 and TRPA1 inhibition, being considered the most potent TRPV1 inhibitor among others SPMs (Park *et al.*, 2011). Other previous studies showed that RvD2 reduces mechanical and thermal hyperalgesia in fibromyalgia-like model (Klein *et al.*, 2014) and paw edema in a carrageenan-induced model (Park *et al.*, 2011). Equally important, we showed that pre-treatment with RvD2 72 h before MSU stimulus inhibited mechanical hyperalgesia and joint edema at all time-points, confirming that its analgesic effectiveness is time-dependent, as stated before by Ji and coworkers (2011) (Ji *et al.*, 2011). Similar findings were observed in rats pre-treated (three days) with RvD2 (100 ng/kg, i.p), which exhibited a protective effect against experimental abdominal aortic aneurysm formation, suggesting that these effects may be due the long lasting downstream effects of receptor binding (Pope *et al.*, 2016). Together, these findings underscore the effect dose- and time-dependent of RvD2 in gout inflammation.

One of the main hallmarks of acute gout is neutrophil influx into the synovium and joint fluid, triggering a cascade of events that leads to release of pronociceptive mediators, amplifying the inflammatory response (Liu-Bryan *et al.*, 2005; Cunha *et al.*, 2008). Furthermore, these cells affect the integrity of the synovial membrane by releasing reactive oxygen species and proteolytic enzymes, being considerate one of the major sources of superoxide anion (Zamudio-Cuevas *et al.*, 2015; Perretti *et al.*, 2017). Taking these into account and the fact that SPMs comprise control of PMN infiltration, stimulating macrophage phagocytosis, and efferocytosis contributing to resolution (Chiang *et al.*, 2015), we showed that mice treated with RvD2 decreased leukocytes migration to knee joint, presented protection from excessive leukocyte infiltration, and consequently, synovial and cartilage injury. Notwithstanding, RvD2

treatment was able to reduce superoxide production and restore glutathione levels in the knee joint altered by MSU crystals.

The transcription factor NF- κ B regulates the production of pro-inflammatory molecules including TNF- α and IL-1 β , the key mediators of GA (So *et al.*, 2017). The RvD2 inhibition of MSU-induced cytokine production lines up with the reduction of NF- κ B activation. Mice treated with RvD2 exerted anti-inflammatory effects by inhibiting pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-1 β in the knee joint. In agreement with that, Spite *et al.* (2009) demonstrated that RvD2 reduces levels of pro-inflammatory cytokines such as IL-6, IL-1 β , IL-23 and TNF- α in a sepsis model by enhancing bacterial clearance (Spite *et al.*, 2009).

Furthermore, NF- κ B activation (signal 1) prompts the expression of NLRP3 inflammasome components (Martin *et al.*, 2010). We showed that RvD2 treatment on BMDMs before LPS priming (signal 1) diminished the NF- κ B activity that may be explained by an inhibition of the phosphorylation of NF- κ B p65, which could block the nuclear translocation of NF- κ B, inhibiting the production of pro-IL-1 β . In like manner, Tian *et al.* showed that RvD2 down-regulated NF- κ B mRNA expression by reducing its nuclear translocation in microglial cells (Tian *et al.*, 2015). It is noteworthy to mention that other SPMs have been reported to reduce NF- κ B activity *in vivo* and *in vitro* (Huang *et al.*, 2014; Gao *et al.*, 2017; Yin *et al.*, 2017).

The challenge with MSU (signal 2) leads to the activation of NLRP3, which is a crucial step in the pathogenesis of gout (So *et al.*, 2017). Our study revealed that RvD2 significantly decreased MSU-induced NLRP3, ASC, pro-caspase-1, and pro-IL-1 β mRNA expression *in vitro*. Consistent with these results, we found that RvD2 can markedly decrease protein NLRP3 and ASC levels. Under those circumstances, we showed for the first time that RvD2 inhibits TNF- α and IL-1 β *in vitro*, acting in signal 1

and 2, which explains, at least in part, its anti-inflammatory and analgesic effect. There is no compelling evidence about the mechanisms by which RvD2 inhibits NLRP3 activation; however, we suggest that RvD2 could suppress the activation of the NLRP3 inflammasome, by targeting NLRP3 inflammasome components.

RvD2 possess a recently identified receptor named GPR18, which is highly expressed in neutrophils and monocytes, as well as in monocyte-derived macrophages (Chiang *et al.*, 2015).

Another key point observed after RvD2 treatment was the upregulation of *GPR18* mRNA expression not only *in vivo* but also *in vitro*. This receptor stimulates human and mouse phagocyte clearance of microbes and limits excessive PMN infiltration *in vivo*, regulating phagocyte responses and conferring protection during infections (Chiang *et al.*, 2015; Chiang *et al.*, 2017).

Treatment with RvD2 (1-100 pM) did not increase LDH leakage indicating its effects were not due to increased cell death. This data corroborates with previous study showing that RvD2 (0.1-10 nM) does not affect cell viability in endothelial cells (Zhang *et al.*, 2016).

Overall, this is the first study to demonstrate that RvD2 inhibits pain and inflammation in a MSU-induced GA by inhibiting leukocyte recruitment, production of inflammatory cytokines and oxidative stress. Taken together, the analgesic efficacy and safety profiles of endogenous lipid mediators, these findings may add a future perspective for GA treatment.

Acknowledgement

This work was supported by Programa para o Sistema Único de Saúde (PPSUS) grant supported by Departamento de Ciência e Tecnologia da Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Ministério da Saúde (Decit/SCTIE/MS, Brazil)

intermediated by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil) with support of Fundação Araucária and Secretaria Estadual de Saúde, Paraná (SESA-PR, Brazil); São Paulo Research Foundation under grant agreements 2011/19670-0 (Thematic Project) and 2013/08216-2 (Center for Research in Inflammatory Disease); Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil); and Financiadora de Estudos e Projetos and Secretaria de Estado da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior do Paraná under grant agreements 01.12.0294.00 (0476/11) (FINEP/SETI-PR, Brazil). LSF and ACR received CAPES Post-Doc fellowship.

Authors' contributions

S.B.G., T.H.Z., V.F., L.S.F, A.C.R., M.M.B, R.C. and W.A.V.J. participated in the research design, S.B.G., T.H.Z., V.F., L.S.F., A.C.R, M.M.B conducted the experiments, S.B.G., T.H.Z., V.F., L.S.F, A.C.R., M.M.B R.C. and W.A.V.J. performed the data analysis and S.B.G., T.H.Z., V.F, L.S.F and M.M.B wrote the manuscript. All authors revised the final version of manuscript and approved its submission.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- Abhishek A (2017). Managing Gout Flares in the Elderly: Practical Considerations. *Drugs & aging* **34**(12): 873-880.
- Bardin T, Voshaar MA, van de Laar MA (2015). The Human and Economic Burden of Difficult-to-Treat Gouty Arthritis. *Joint, bone, spine : revue du rhumatisme* **82 Suppl 1**: eS2-8.
- Chen CJ, Shi Y, Hearn A, Fitzgerald K, Golenbock D, Reed G, *et al.* (2006). MyD88-dependent IL-1 receptor signaling is essential for gouty inflammation stimulated by monosodium urate crystals. *The Journal of clinical investigation* **116**(8): 2262-2271.
- Chen J, Wu M, Yang J, Wang J, Qiao Y, Li X (2017). The Immunological Basis in the Pathogenesis of Gout. *Iranian journal of immunology : IJI* **14**(2): 90-98.
- Chiang N, Dalli J, Colas RA, Serhan CN (2015). Identification of resolvin D2 receptor mediating resolution of infections and organ protection. *J Exp Med* **212**(8): 1203-1217.

Chiang N, de la Rosa X, Libreros S, Serhan CN (2017). Novel Resolvin D2 Receptor Axis in Infectious Inflammation. *Journal of immunology* **198**(2): 842-851.

Cronstein BN, Sunkureddi P (2013). Mechanistic aspects of inflammation and clinical management of inflammation in acute gouty arthritis. *Journal of clinical rheumatology : practical reports on rheumatic & musculoskeletal diseases* **19**(1): 19-29.

Cunha TM, Dal-Secco D, Verri WA, Jr., Guerrero AT, Souza GR, Vieira SM, *et al.* (2008). Dual role of hydrogen sulfide in mechanical inflammatory hypernociception. *European journal of pharmacology* **590**(1-3): 127-135.

Davis BK, Wen H, Ting JP (2011). The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases. *Annual review of immunology* **29**: 707-735.

Domiciano TP, Wakita D, Jones HD, Crother TR, Verri WA, Jr., Arditi M, *et al.* (2017). Quercetin Inhibits Inflammasome Activation by Interfering with ASC Oligomerization and Prevents Interleukin-1 Mediated Mouse Vasculitis. *Scientific reports* **7**: 41539.

Gao Y, Zhang H, Luo L, Lin J, Li D, Zheng S, *et al.* (2017). Resolvin D1 Improves the Resolution of Inflammation via Activating NF-kappaB p50/p50-Mediated Cyclooxygenase-2 Expression in Acute Respiratory Distress Syndrome. *Journal of immunology*.

Hohmann MS, Cardoso RD, Pinho-Ribeiro FA, Crespigio J, Cunha TM, Alves-Filho JC, *et al.* (2013). 5-lipoxygenase deficiency reduces acetaminophen-induced hepatotoxicity and lethality. *BioMed research international* **2013**: 627046.

Huang YH, Wang HM, Cai ZY, Xu FY, Zhou XY (2014). Lipoxin A4 inhibits NF-kappaB activation and cell cycle progression in RAW264.7 cells. *Inflammation* **37**(4): 1084-1090.

Ji RR, Xu ZZ, Strichartz G, Serhan CN (2011). Emerging roles of resolvins in the resolution of inflammation and pain. *Trends in neurosciences* **34**(11): 599-609.

Klein CP, Sperotto ND, Maciel IS, Leite CE, Souza AH, Campos MM (2014). Effects of D-series resolvins on behavioral and neurochemical changes in a fibromyalgia-like model in mice. *Neuropharmacology* **86**: 57-66.

Kuo CF, Grainge MJ, Zhang W, Doherty M (2015). Global epidemiology of gout: prevalence, incidence and risk factors. *Nature reviews. Rheumatology* **11**(11): 649-662.

Liu-Bryan R, Scott P, Sydlaske A, Rose DM, Terkeltaub R (2005). Innate immunity conferred by Toll-like receptors 2 and 4 and myeloid differentiation factor 88 expression is pivotal to monosodium urate monohydrate crystal-induced inflammation. *Arthritis and rheumatism* **52**(9): 2936-2946.

Martin WJ, Harper JL (2010). Innate inflammation and resolution in acute gout. *Immunology and cell biology* **88**(1): 15-19.

Martinon F, Glimcher LH (2006a). Gout: new insights into an old disease. *The Journal of clinical investigation* **116**(8): 2073-2075.

Martinon F, Petrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J (2006b). Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* **440**(7081): 237-241.

Nishimura A, Akahoshi T, Takahashi M, Takagishi K, Itoman M, Kondo H, *et al.* (1997). Attenuation of monosodium urate crystal-induced arthritis in rabbits by a neutralizing antibody against interleukin-8. *Journal of leukocyte biology* **62**(4): 444-449.

Park CK, Xu ZZ, Liu T, Lu N, Serhan CN, Ji RR (2011). Resolvin D2 is a potent endogenous inhibitor for transient receptor potential subtype V1/A1, inflammatory pain, and spinal cord synaptic plasticity in mice: distinct roles of resolvin D1, D2, and E1. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **31**(50): 18433-18438.

Perretti M, Norling LV (2017). Actions of SPM in regulating host responses in arthritis. *Molecular aspects of medicine* **58**: 57-64.

Pinto LG, Cunha TM, Vieira SM, Lemos HP, Verri WA, Jr., Cunha FQ, *et al.* (2010). IL-17 mediates articular hypernociception in antigen-induced arthritis in mice. *Pain* **148**(2): 247-256.

Pope NH, Salmon M, Davis JP, Chatterjee A, Su G, Conte MS, *et al.* (2016). D-series resolvins inhibit murine abdominal aortic aneurysm formation and increase M2 macrophage polarization. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **30**(12): 4192-4201.

Ruiz-Miyazawa KW, Staurengo-Ferrari L, Mizokami SS, Domiciano TP, Vicentini F, Camilios-Neto D, *et al.* (2017). Quercetin inhibits gout arthritis in mice: induction of an opioid-dependent regulation of inflammasome. *Inflammopharmacology*.

Sedlak J, Lindsay RH (1968). Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Analytical biochemistry* **25**(1): 192-205.

So AK, Martinon F (2017). Inflammation in gout: mechanisms and therapeutic targets. *Nature reviews. Rheumatology* **13**(11): 639-647.

Spite M, Norling LV, Summers L, Yang R, Cooper D, Petasis NA, *et al.* (2009). Resolvin D2 is a potent regulator of leukocytes and controls microbial sepsis. *Nature* **461**(7268): 1287-1291.

Staurengo-Ferrari L, Mizokami SS, Fattori V, Silva JJ, Zanichelli PG, Georgetti SR, *et al.* (2014). The ruthenium nitric oxide donor, [Ru(HEDTA)NO], inhibits acute nociception in mice by modulating oxidative stress, cytokine production and activating the cGMP/PKG/ATP-sensitive potassium channel signaling pathway. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* **387**(11): 1053-1068.

Staurengo-Ferrari L, Ruiz-Miyazawa KW, Pinho-Ribeiro FA, Domiciano TP, Fattori V, Mizokami SS, *et al.* (2017). The nitroxyl donor Angeli's salt ameliorates Staphylococcus aureus-induced septic arthritis in mice. *Free radical biology & medicine* **108**: 487-499.

Sulciner ML, Serhan CN, Gilligan MM, Mudge DK, Chang J, Gartung A, *et al.* (2018). Resolvins suppress tumor growth and enhance cancer therapy. *J Exp Med* **215**(1): 115-140.

Tian Y, Zhang Y, Zhang R, Qiao S, Fan J (2015). Resolvin D2 recovers neural injury by suppressing inflammatory mediators expression in lipopolysaccharide-induced Parkinson's disease rat model. *Biochemical and biophysical research communications* **460**(3): 799-805.

Wortmann RL (2005). Recent advances in the management of gout and hyperuricemia. *Current opinion in rheumatology* **17**(3): 319-324.

Yin Y, Chen F, Wang W, Wang H, Zhang X (2017). Resolvin D1 inhibits inflammatory response in STZ-induced diabetic retinopathy rats: Possible involvement of NLRP3 inflammasome and NF-kappaB signaling pathway. *Molecular vision* **23**: 242-250.

Zamudio-Cuevas Y, Hernandez-Diaz C, Pineda C, Reginato AM, Cerna-Cortes JF, Ventura-Rios L, *et al.* (2015). Molecular basis of oxidative stress in gouty arthropathy. *Clinical rheumatology* **34**(10): 1667-1672.

Zhang MJ, Sansbury BE, Hellmann J, Baker JF, Guo L, Parmer CM, *et al.* (2016). Resolvin D2 Enhances Postischemic Revascularization While Resolving Inflammation. *Circulation* 134(9): 666-680.

TABLES, FIGURES AND LEGENDS

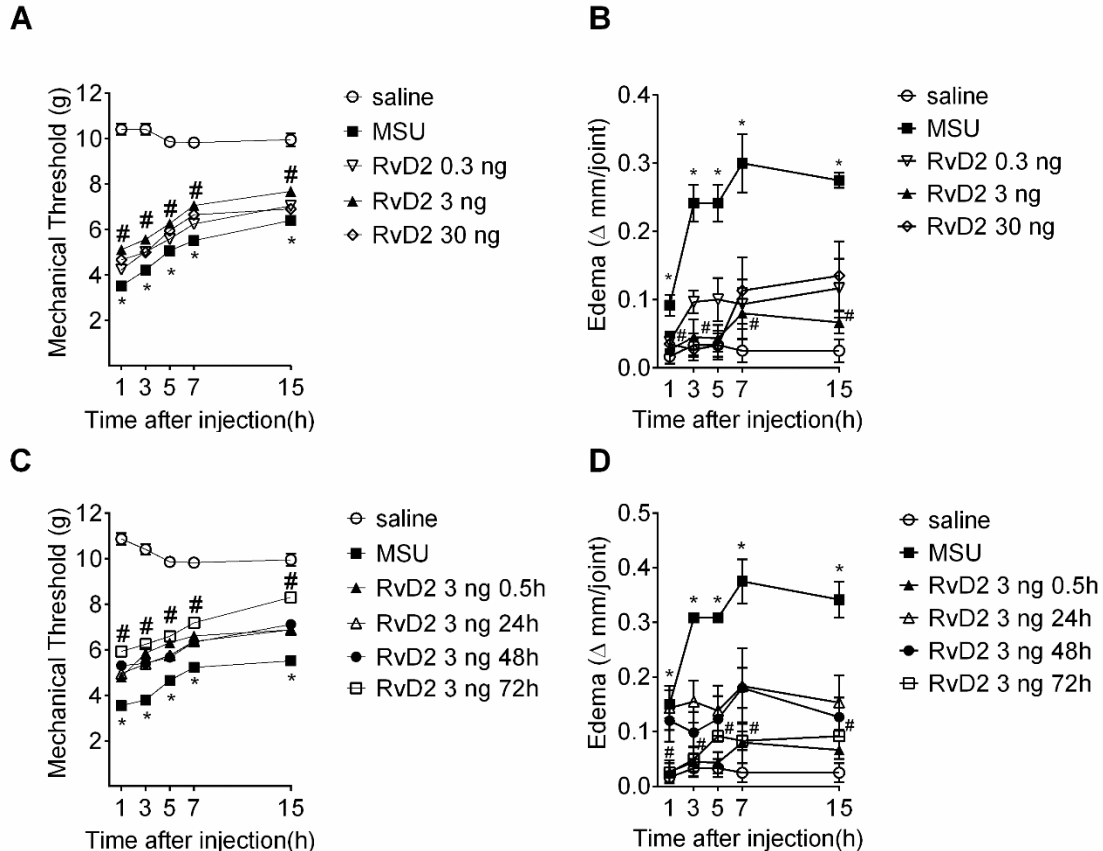
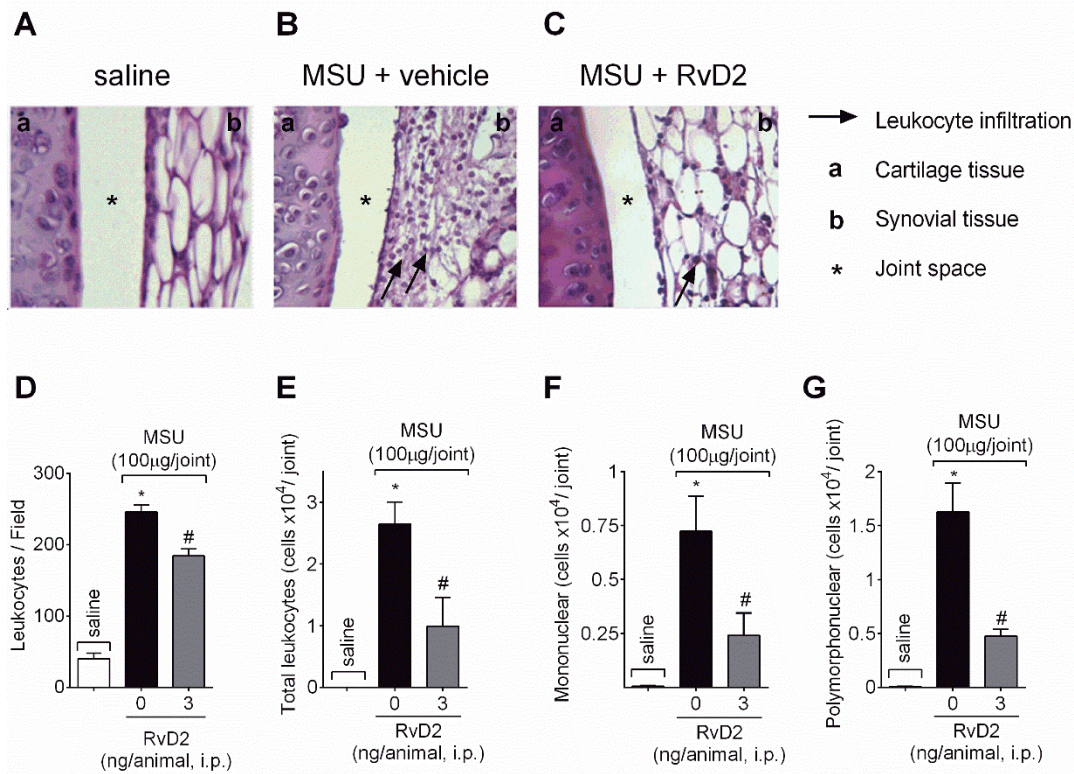


Figure 1. Resolvin D2 reduces MSU-induced mechanical hyperalgesia and oedema. Treatment with RvD2 (0.3, 3 and 30 ng/animal, i.p.) or vehicle (3.2% ethanol in saline) was performed 0.5 h before stimulus with MSU (100 μ g/10 μ L, intra-articular [i.a.]). Mechanical hyperalgesia (a) and oedema (b) were evaluated 1-15 h after stimulus injection. Treatment with RvD2 (3 ng/animal, i.p) or vehicle (3.2% ethanol in saline) was performed 0.5, 24, 48 and 72 h before stimulus with MSU (100 μ g/10 μ L, intra-articular [i.a.]). Mechanical hyperalgesia (c) and oedema (d) were evaluated 1-15 h after stimulus injection. Results are presented as means \pm SEM of 6 mice per group per experiment, and are representative of 2 separated experiments. *p < 0.05 compared to saline group; #p < 0.05 compared with MSU group. Two-way ANOVA followed by Tukey's test.



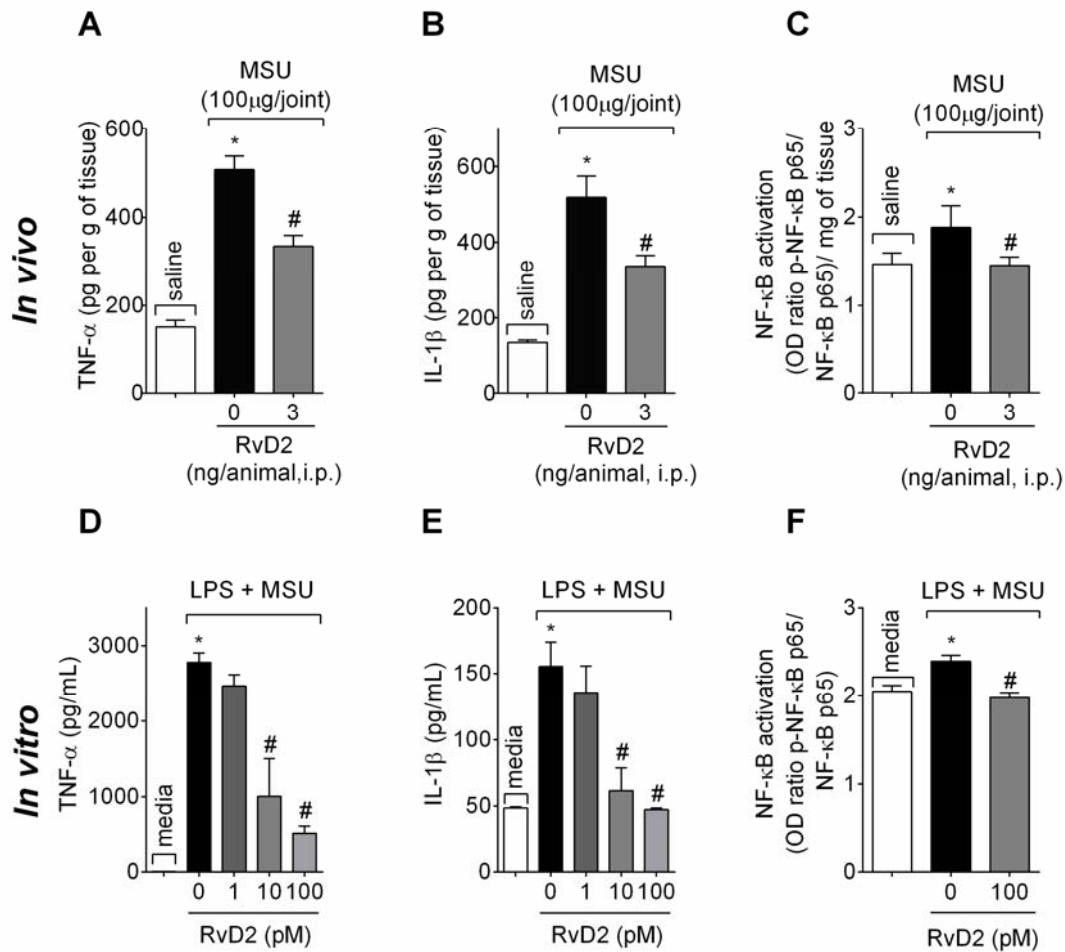


Figure 3. Resolvin D2 inhibits MSU-induced TNF- α and IL-1 β production and NF- κ B activation *in vivo* and *in vitro*. Mice were treated with RvD2 (3 ng/animal, i.p.) 72 h before MSU injection (100 μ g/10 μ L, i.a.). The joint samples were collected at 15 h after MSU injection. BMDMs were treated with RvD2 (100 pM) 0.5 h before LPS (500 ng/ml) priming and then incubated for 3 h, followed by stimulation with MSU crystals (450 μ g/mL) during 5 h. TNF- α (a and d) and IL-1 β (b and e) levels and NF- κ B activation (c and f) were determined by ELISA method. Results are presented as means \pm SEM of 6 mice per group or 6 culture wells per experiment, and are representative of 2 separated experiments. * $p < 0.05$ compared to saline group; # $p < 0.05$ compared to MSU group. One-way ANOVA followed by Tukey's t test.

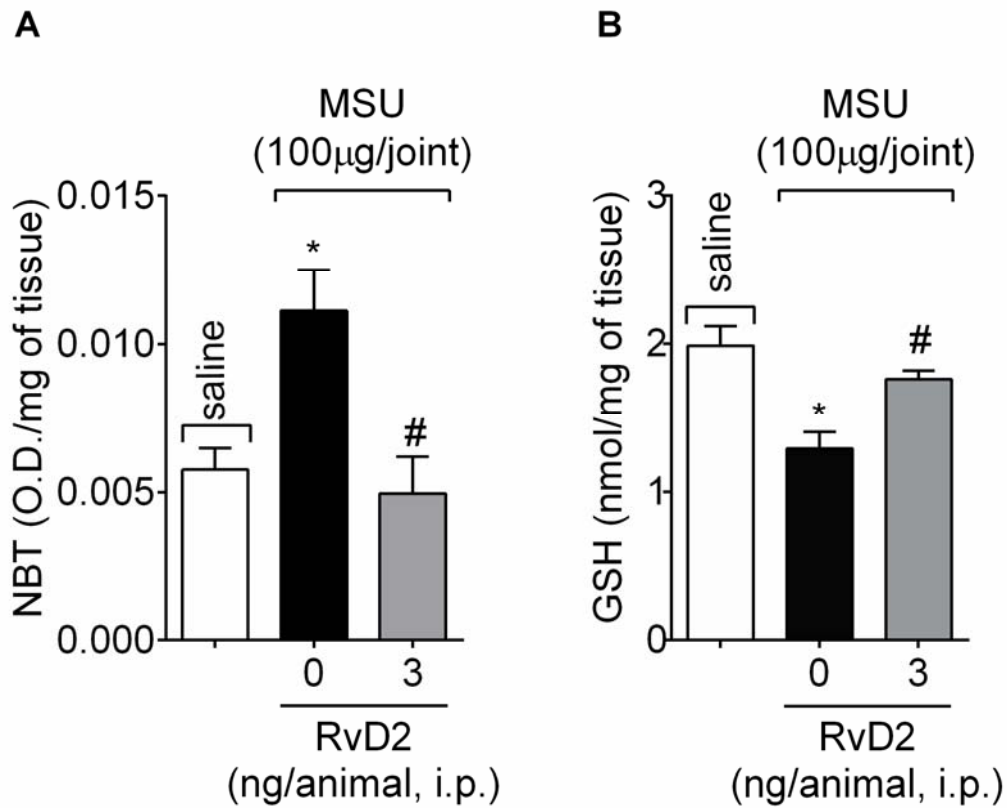


Figure 4. Resolvin D2 inhibits MSU-induced decrease of antioxidant capacity and superoxide production. Mice were treated with RvD2 (3 ng/animal, i.p.) 72 h before MSU injection (100 μ g/10 μ L, i.a.). The joint samples were collected 15 h after MSU injection and the NBT (a) and GSH (b) were evaluated. Results are presented as means \pm SEM of 6 mice per group per experiment, and are representative of 2 separated experiments. * p < 0.05 compared to saline group; # p < 0.05 compared to MSU. One-way ANOVA followed by Tukey's t test.

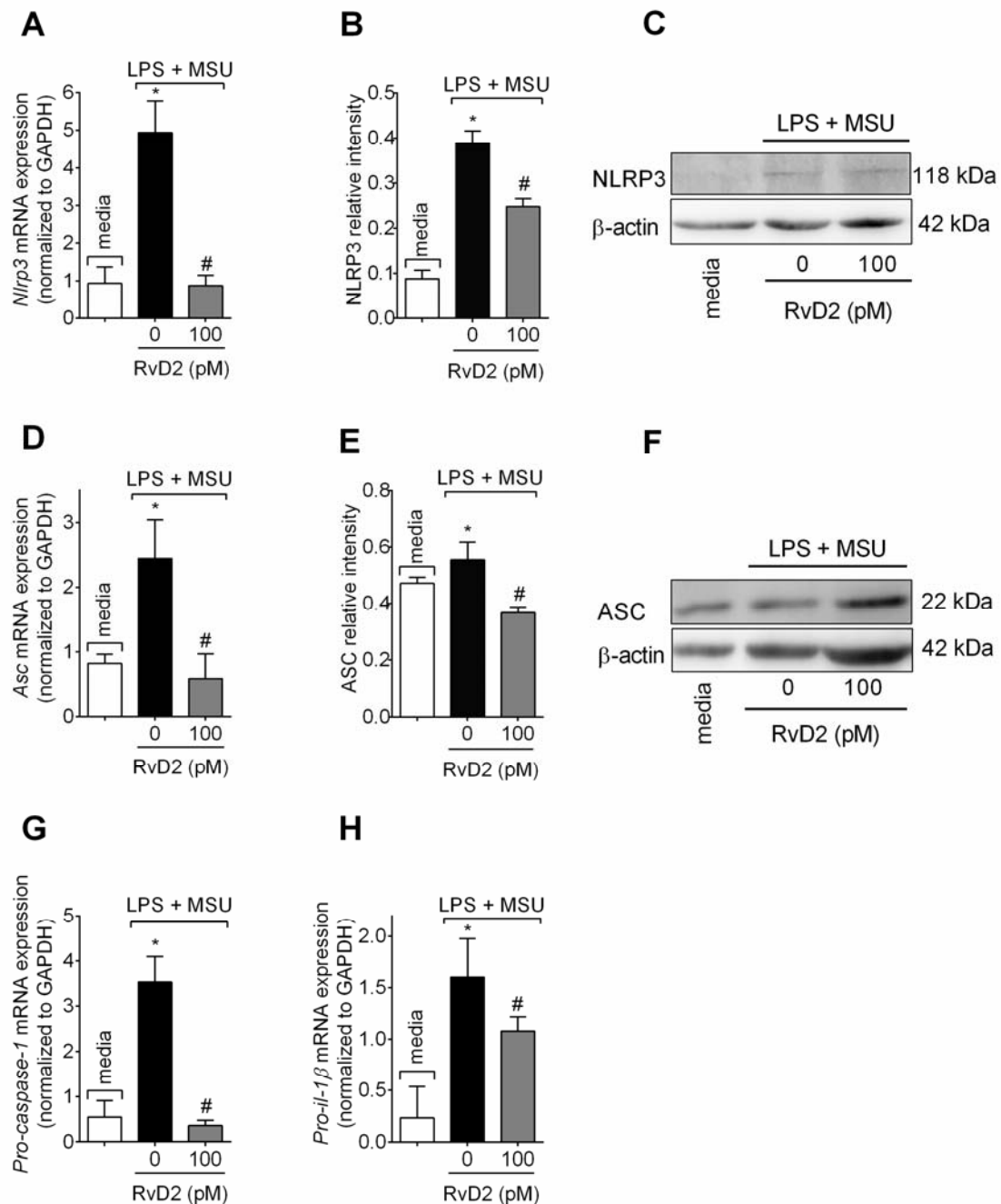


Figure 5. Resolvin D2 inhibits MSU-induced *Nlrp3*, *Asc*, *Pro-caspase-1* and *Pro-il-1 β* mRNA expression and protein expression *in vitro*. BMDMs were treated with RvD2 (100 pM) 30 minutes before LPS (500 ng/ml) priming and then incubated for 3 h, followed by stimulation with MSU crystals (450 μ g/mL) during 5 hours. BMDMs were harvested in RIPA lysis buffer with protease and phosphatase inhibitors 5 h after MSU stimulation. NLRP3 inflammasome components mRNA quantification were assessed by RT-qPCR and protein levels by western blot. Results are expressed as mean \pm SEM, n = 3 culture wells per group per experiment, two independent experiments *p<0.05 vs. control group; #p<0.05 vs. 0 ng group. One-way ANOVA followed by Tukey's t test.

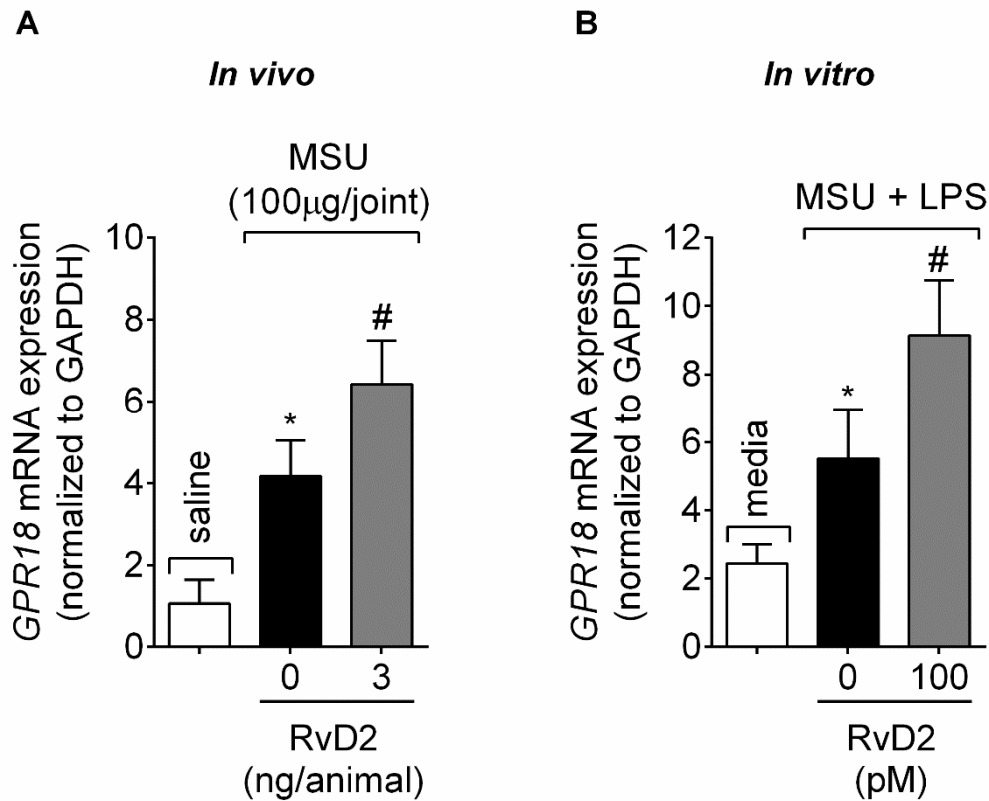
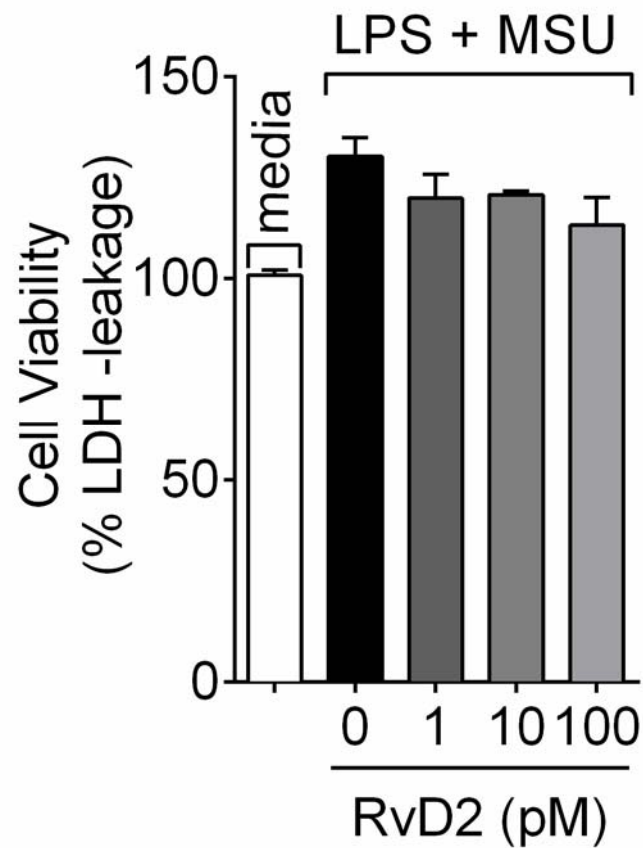


Figure 6. RvD2 increases *GPR18* mRNA expression *in vivo* and *in vitro*. To evaluate the effect of RvD2 on its receptor mRNA expression. Mice were treated 72 h before MSU stimulation and joint knee collected 15 h after stimulus. BMDMs were treated with RvD2 at 100 pM 5 h before MSU stimulation. *GPR18* mRNA quantification was assessed by RT-qPCR. Results are expressed as mean \pm SEM, of 6 mice or 3 culture wells per group per experiment, two independent experiments * $p < 0.05$ vs. control group; # $p < 0.05$ vs. 0 ng group, one-way ANOVA followed by Tukey's post-test.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary Table 1. Primers sequences

Gene	Sense	Antisense
<i>Gapdh</i>	5' CAT ACC AGG AAA TGA GCT TG 3'	5' ATG ACA TCA AGA AGG TGG TG 3'
<i>Nlrp3</i>	5' AGC TAT GAG GTG GTG ATG TTA GTG G 3'	5' CAC AAT ATT TGT ACC AGA CAG ACT TGA G 3'
<i>Asc</i>	5' ATG GGG CGG GCA CGA GAT G 3'	5' GCT CTG CTC CAG GTC CAT CAC 3'
<i>Pro-caspase 1</i>	5' TGG TCT TGT GAC TTG GAG GA 3'	5' TGG CTT CTT ATT GGC ACG AT 3'
<i>Pro-il-1β</i>	5' GAA ATG CCA CCT TTT GAC AGT G 3'	5' TGG ATG CTC TCA TCA GGA CAG 3'
<i>GPR18</i>	5'ACAGGAGGTTCTACATACCA 3'	5'CCGAAAGTAGATAGGAAAAG3'



Supplementary Figure 1. RvD2 does not increase LDH leakage in BMDM cells. BMDMs were treated with RvD2 (1, 10 and 100 pM) 30 minutes before LPS (500 ng/ml) priming and then incubated for 3 h, followed by stimulation with MSU crystals (450 μ g/mL) during 5 hours, and the BMDM supernadant was assessed to evaluate LDH leakage. Results are expressed as mean \pm SEM, of 6 culture wells per group per experiment, two independent experiments * $p < 0.05$ vs. control group; # $p < 0.05$ vs. 0 ng group, one-way ANOVA followed by Tukey's post-test.

4 CONCLUSÃO

No presente trabalho foi demonstrado que a RvD2 reduz a inflamação e dor induzida por cristais de MSU inibindo a ativação do inflamassoma NLRP3. O tratamento com RvD2 reduziu a hiperalgesia mecânica e edema de maneira dose e concentração dependente, podendo sua capacidade analgésica estar relacionada a capacidade de RvD2 em inibir a ativação do NF- κ B (sinal 1) *in vivo* e *in vitro* e ativação do inflamassoma NLRP3 (sinal 2) *in vitro*, por meio de sua ligação ao receptor GPR18. O tratamento com a RvD2 diminuiu a produção de citocinas *in vivo* e *in vitro*, assim como a maturação da IL-1 β *in vitro*. Foi observado também a redução das concentrações de TNF- α aliada a redução do recrutamento leucocitário para articulação e redução do estresse oxidativo.

Desta forma, os dados obtidos acrescentam uma nova perspectiva sobre o tratamento da artrite gotosa, evidenciando os efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes e analgésicas de RvD2, que atua na inibição do inflamassoma NLRP3.

ANEXOS

ANEXO A

Endereço eletrônico do guia para autores da revista científica *British Journal of Pharmacology*

<https://bpspubs.onlinelibrary.wiley.com/hub/journal/14765381/author-guidelines.html>

ANEXO B

Parecer de aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da
Universidade Estadual de Londrina



Universidade
Estadual de Londrina

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 221/2016

Londrina, 13 de Outubro de 2016.

Prezado Pesquisador,

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação dos mecanismos espinais e efeito farmacológico dos mediadores lipídicos pró-resolúção resolvina D1 e resolvina D2 em modelo de gota induzida por cristais de monurato de sódio (MSU)", protocolo CEUA nº 22186.2016.37, sob a responsabilidade de Waldiceu Aparecido Verri Junior, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL), em reunião realizada em 11/10/2016.

O objetivo do projeto é investigar a participação espinal e o efeito farmacológicos dos mediadores lipídicos RvD1 e RvD2 em modelo de gota induzida por MSU. Para isso os animais serão divididos em gaiolas no biotério de acordo com os grupos experimentais (máximo de 12 animais por gaiola). Para os experimentos os animais terão administração intratecal dos seguintes fármacos: PDTC, o-aminocapato, minociclina, fluorocitrato, Resolvina D1, Resolvina D2 e intra-articular de MSU. Para o tratamento intratecal, os animais serão anestesiados com isofurano, via inalatória. Ao término dos experimentos os animais serão eutanasiados por inalação de isofurano seguido de decapitação para coleta das amostras. GI 2.

Vigência do Projeto	01/11/2016 a 01/10/2018
Espécie/Inoculação	Camundongo heterogênico / Swiss
Nº de animais	648
Peso/idade	20-25 g / 2 meses
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central do Hospital Universitário / UEL
Amostras a serem coletadas	Articulação, medula espinal, gânglio da raiz dorsal

Cumpra-orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UEL anteriormente à execução das modificações.

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessários. Sem mais para o momento, subscrevo, cordialmente,

Prof. Dra.  Gláucia Scariamburo Alves Fernandes
Coordenadora da CEUA/UEL

IImo. Sr.

Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verri Junior

Coordenador do Projeto

Departamento de Ciências Patológicas / Centro de Ciências Biológicas

Com cópia para Coordenação do Biotério do Hospital Universitário/Uel; Chefe do Departamento de Ciências Patológicas e Diretor(a) do Centro de Ciências Biológicas