



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

TIAGO HENRIQUE ZANINELLI

**RESOLVINA D1 REDUZ A INFLAMAÇÃO E HIPERALGESIA  
INDUZIDA POR CRISTAIS DE URATO MONOSSÓDICO POR  
MECANISMOS DEPENDENTES DO INFLAMASSOMA  
NLRP3 E MATURAÇÃO DA IL-1 $\beta$**

TIAGO HENRIQUE ZANINELLI

**RESOLVINA D1 REDUZ A INFLAMAÇÃO E HIPERALGESIA  
INDUZIDA POR CRISTAIS DE URATO MONOSSÓDICO POR  
MECANISMOS DEPENDENTES DO INFLAMASSOMA  
NLRP3 E MATURAÇÃO DA IL-1 $\beta$**

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de pós-graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Patologia Experimental.

Orientador: Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verri Junior

Londrina  
2018

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

Zaninelli, Tiago Henrique .

Resolvina D1 reduz a inflamação e hiperalgesia induzida por cristais de urato monossódico por mecanismos dependentes do inflamassoma NLRP3 e maturação da IL-1B / Tiago Henrique Zaninelli. - Londrina, 2018.  
71 f. : il.

Orientador: Waldiceu Aparecido Verri Junior.  
Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, , 2018.  
Inclui bibliografia.

1. Artrite gotosa - Tese. 2. Inflamação - Tese. 3. Resolução da inflamação - Tese. 4. Mediadores lipídicos pró-resolução - Tese. I. Verri Junior, Waldiceu Aparecido. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. . III. Título.

TIAGO HENRIQUE ZANINELLI

**RESOLVINA D1 REDUZ A INFLAMAÇÃO E HIPERALGESIA  
INDUZIDA POR CRISTAIS DE URATO MONOSSÓDICO POR  
MECANISMOS DEPENDENTES DO INFLAMASSOMA NLRP3 E  
MATURAÇÃO DA IL-1 $\beta$**

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de pós-graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Patologia Experimental.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verri Junior  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Fábio Henrique Kwasniewski  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

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

Londrina, 11 de abril de 2018.

*Dedico este trabalho ao meu avô João  
Baptista de Oliveira e, a todos os  
outros portadores de artrite gotosa.*

## AGRADECIMENTO

À força que rege minhas decisões e conquistas, Deus. Por fortalecer minha Fé e me permitir observar as maravilhas de Sua criação através dos complexos olhos da ciência.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verri Jr., pelo acolhimento não convencional. Me sinto muito honrado em tê-lo como orientador e agradeço por todo direcionamento, paciência e constantes oportunidades.

À Profa. Dra. Graziela Scialanti Ceravolo e ao Prof. Dr. Fabio Henrique Kwasniewski pela disponibilidade e fundamentais considerações para a construção desta dissertação.

Aos meus companheiros do laboratório de Dor, Inflamação, Neuropatia e Câncer pelo auxílio nas tarefas diárias, independente do projeto. Ao Victor Fattori, agradeço pelas constantes e fundamentais orientações; e pela contribuição para meu crescimento científico.

Aos meus pais, Odécio e Vera Zaninelli, pelos exemplos de humanidade, simplicidade e educação. Obrigado, pelas palavras de apoio e todos os esforços infindáveis em prol de minhas conquistas profissionais e pessoais. Ao meu irmão, Mateus e minha cunhada Milena, pelo apoio. À minha sogra Ivone Matiazzo, cunhados, Ana Vitória Ganassin e José Antônio Ganassin pelas palavras de encorajamento e orações.

Em especial, à minha namorada, futura esposa, Luna M. M. Ganassin, por sempre apoiar minhas decisões sem medir esforços ou distâncias. Pela motivação, companheirismo e, principalmente, paciência em todos os meus projetos. E por estar junto a mim em mais uma importante conquista.

Deixo aqui também meu respeito e reconhecimento por todas as formas de vida, em especial, aquelas dos camundongos utilizados nesse estudo.

A todos aqueles que porventura não foram mencionados, mas, de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

*Por vezes sentimos que aquilo que fazemos  
não é senão uma gota de água no mar. Mas o  
mar seria menor se lhe faltasse uma gota.*

Madre Tereza de Calcutá

ZANINELLI, Tiago Henrique. **Resolvina D1 reduz a inflamação e hiperalgesia induzida por cristais de urato monossódico por mecanismos dependentes do inflamassoma NLRP3 e maturação da IL-1 $\beta$** . 2018. 71 p. Dissertação de Mestrado (Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

## RESUMO

A artrite gotosa (AG) é caracterizada por uma intensa resposta inflamatória aos cristais de urato monossódico (MSU), induzindo dor severa. As terapias atuais, muitas vezes são pouco eficazes na redução da dor em casos de gota. Resolvina D1 (RvD1) é um mediador lipídico pró-resolução derivado do ácido graxo poliinsaturado  $\omega$ -3, ácido docosahexaenóico (DHA). Este mediador possui propriedades anti-inflamatórias e analgésicas. Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos protetores da RvD1 em modelos experimentais de AG *in vivo* e *in vitro*. Camundongos foram tratados com RvD1 (0,3, 3 ou 30 ng/animal) ou veículo (3,2% de etanol em salina) 0,5 h antes da injeção intra-articular de MSU (100  $\mu$ g/articulação). Em outros experimentos, os camundongos foram tratados com RvD1 (3 ng / animal / intraperitonealmente [i.p.]) ou veículo, 72, 48, 24 ou 0,5 h antes da injeção de MSU. Foi observado que a RvD1 inibiu a hiperalgesia mecânica induzida por MSU de maneira tempo dependente. RvD1 também reduziu o recrutamento de leucócitos induzidos por MSU (leucócitos totais, neutrófilos e células mononucleares), sinovite e produção de citocinas pró-inflamatórias, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  *in vivo*. *In vitro*, RvD1 reduziu a maturação da IL-1 $\beta$  no sobrenadante de macrófagos derivados da medula óssea (BMDM), indicando a inibição da ativação do inflamassoma. Além disso, RvD1 reduziu a ativação do NF- $\kappa$ B, expressão de RNAm dos componentes do inflamassoma (Nlrp3, Asc, Pro-caspase-1 e Pro-il-1 $\beta$ ) e níveis de expressão de suas proteínas (NLRP3 e ASC) *in vitro*. Desta forma, foi demonstrado que a RvD1 possui propriedade anti-inflamatória e analgésica no modelo animal de AG induzida por MSU.

**Palavras-chave:** Artrite gotosa. MLPR. NLRP3. Resolução da inflamação.

ZANINELLI, Tiago Henrique. **Resolvin D1 ameliorates monosodium urate-induced inflammation and hyperalgesia by targeting inflammasome NLRP3 and IL-1 $\beta$  maturation.** 2018. 71 p. Master's degree dissertation (Experimental Pathology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

## ABSTRACT

Gouty arthritis (GA) is characterized by an intense inflammatory response to monosodium urate crystals (MSU), which induces severe pain. Current therapies are often ineffective to reduce gout related pain. Resolvin D1 (RvD1) is a specialized pro-resolving mediator (SPM) derived from  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acid, docosahexaenoic acid (DHA) with anti-inflammatory and analgesic properties. Thus, the aim of this work was to evaluate the protective effects of RvD1 on experimental gouty arthritis *in vivo* and *in vitro*. Mice were treated with RvD1 (0.3, 3 or 30 ng/animal) or vehicle (3.2% ethanol in saline) 0.5 h before MSU intra-articular injections (100 $\mu$ g/knee). In other set of experiments, mice were treated with RvD1 (3 ng/animal) or vehicle, 72, 48, 24 or 0.5 h before MSU injection. We observed that RvD1 inhibited MSU-induced mechanical hyperalgesia in a time-dependent manner. RvD1 also reduced MSU-induced leukocytes recruitment (total leukocytes, neutrophils, and mononuclear cells), synovitis, pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  production *in vivo*. *In vitro*, RvD1 reduced IL-1 $\beta$  maturation on the supernatant of bone marrow-derived macrophages (BMDM), indicating the inhibition of inflammasome activation. Furthermore, RvD1 reduced MSU-induced NF- $\kappa$ B activation, inflammasome components mRNA (Nlrp3, Asc, Pro-caspase-1 and Pro-il-1 $\beta$ ) and protein (NLRP3 and ASC) expression levels *in vitro*. Therefore, we demonstrate that RvD1 possesses anti-inflammatory and analgesic activity in a model of MSU-induced gouty arthritis.

**Key words:** Gouty arthritis. SPM. NLRP3 inflammasome. Inflammation resolution.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> – Fisiopatologia da artrite gotosa .....	23
<b>Figura 2</b> – Metabolismo dos ácidos graxos essenciais do $\omega$ -3 .....	25
<b>Figura 3</b> – Estrutura química da RvD1 .....	26
<b>Figura 4</b> – Biossíntese da RvD1 .....	27
<b>Figura 5</b> – Mecanismos de ação da RvD1 no modelo de artrite gotosa induzida por cristais de MSU.....	71

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIES	Anti-inflamatório esteroideal
AINES	Anti-inflamatório não esteroideal
AKT	Proteína kinase B
ALX/FPR2	Receptor de peptídeo formilado 2
ASC	Proteína adaptadora de CARD
ATP	Adenosina trifosfato
BMDM	Macrófagos derivados da medula óssea
CFA	Adjuvante completo de Freund
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
CXCL1	Ligante CXC 1
CXCL2	Ligante CXC 2
CXCR2	Receptor de quimiocina CXC 2
DAMP	Padrão molecular associado ao dano
DHA	Ácido docosahexaenoico
EPA	Ácido eicosapentaenoico
ERO	Espécie reativa de oxigênio
FFA	Ácido graxo livre de cadeia longa
fMLP	Peptídeo formilado
FoxO3a	Proteína Forkhead box O3
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
GPR32	Receptor associado a proteína G 32
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1
I $\kappa$ B $\alpha$	Inibidor de NF- $\kappa$ B alpha
IL	Interleucina
INF- $\gamma$	Interferon-gamma
LPS	Lipopolissacarídeo
LTB <sub>4</sub>	Leucotrieno B <sub>4</sub>
MLPR	Mediador lipídico pró-resolução
mRNA	RNA mensageiro
MSU	Urato monossódico
Nav1.8	Canal iônico voltagem dependente de sódio
Nek7	Kinase 7 relacionada a NIMA

NET	Armadilhas extracelulares de neutrófilos
NF- $\kappa$ B	Fator nuclear kappa B
NLR	Receptor semelhante a NOD
NLRP3	NLR família pyrin domínio contendo 3
PAMP	Padrões moleculares associados a patógenos
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
PI3K	Fosfatidilinositol Kinase-3
PKA	Proteína kinase A
PKC	Proteína kinase C
PPAR- $\gamma$	Receptor ativado por proliferador de peroxisoma-gamma
PRR	Receptores de reconhecimento de padrão
RLR	Receptor semelhante a Rig
RvD1	Resolvina D1
TLR	Receptor semelhante a Toll
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral-alpha
TRPA1	Receptor de Potencial Transitório Subfamília A, membro 1
TRPV1	Receptor de Potencial Transitório Subfamília V, membro 1
TRPV3	Receptor de Potencial Transitório Subfamília V, membro 3
TRPV4	Receptor de Potencial Transitório Subfamília V, membro 4

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
1.1	INFLAMAÇÃO .....	12
1.2	DOR INFLAMATÓRIA .....	15
1.3	ARTRITE GOTSA .....	18
1.4	MEDIADORES LIPÍDICOS PRÓ-RESOLUÇÃO .....	24
1.5	RESOLVINA D1 .....	26
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	29
2.1	OBJETIVOS GERAIS .....	29
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	29
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	30
<b>3</b>	<b>ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO (PHARMACOLOGICAL RESEARCH)</b> .....	41
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	70

# 1 1 INTRODUÇÃO

2

## 3 1.1 INFLAMAÇÃO

4                   Inflamação é uma das condições médicas com registros mais  
5 antigos. As primeiras descrições dos sinais e sintomas datam de 2700 e 1500 a.C.  
6 nas civilizações egípcias. No entanto, documentalmente, foi o romano Aulus  
7 Cornelius Celsus que descreveu, no primeiro século d.C., os quatro sinais cardinais  
8 da inflamação (Rocha E Silva, 1978), vermelhidão (*rubor*), calor (*calor*), edema  
9 (*tumor*) e dor (*dolor*). Posteriormente, no século III, Cláudio Galeno descreveu a  
10 inflamação como uma reação do corpo contra a lesão (Rocha E Silva, 1978). Ainda  
11 inspirado nas definições de Celsus, no século XVIII, John Hunter inferiu que “a  
12 inflamação não é uma doença, mas uma resposta inespecífica que tem um efeito  
13 salutar ao hospedeiro” (Turk, 1994). Mais tarde, no século XIX, Rudolf Virchow  
14 postulou mais um sinal cardinal da inflamação, a perda de função (*function laesa*)  
15 (Heidland *et al.*, 2006). Interessantemente, mesmo com recursos limitados, os  
16 praticantes citados, certamente contribuíram para o entendimento atual da  
17 inflamação.

18                   Desta forma, a inflamação aguda é uma resposta apropriada para a  
19 defesa do hospedeiro e manutenção da homeostase tecidual (Maderna e Godson,  
20 2009). Entretanto, quando exacerbado, o processo inflamatório pode levar à  
21 destruição de tecidos, fibrose e eventual perda de função do órgão afetado  
22 (Maderna e Godson, 2009). Em contrapartida a exacerbação, mecanismos  
23 compensatórios e fatores reguladores foram selecionados evolutivamente,  
24 garantindo através da produção de citocinas anti-inflamatórias e moléculas  
25 resolutivas a limitação da resposta (Lawrence *et al.*, 2002; Serhan *et al.*, 2015). De  
26 fato, o entendimento contemporâneo do processo resolutivo compreende que o

1 mesmo é um evento ativo e altamente regulado (Ortega-Gomez *et al.*, 2013).

2 De maneira geral, a inflamação se inicia através do reconhecimento  
3 de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) ou padrões moleculares  
4 associados ao dano (DAMPs) aos receptores de reconhecimento do padrão (PRRs),  
5 como por exemplo os receptores semelhantes a Toll (TLRs), a Nod (NLR) e a Rig  
6 (RLR), presentes em células imune inatas residentes, principalmente macrófagos e  
7 mastócitos (Medzhitov, 2008; Takeuchi e Akira, 2010). Esta interação desencadeia  
8 uma sequência de sinais intracelulares que culminam na ativação e translocação do  
9 Fator Nuclear Kappa B (NF- $\kappa$ B) para o núcleo (Iwasaki e Medzhitov, 2010; Takeuchi  
10 e Akira, 2010). Em consequência, ocorre a expressão de citocinas pro-inflamatórias  
11 (interleucina-1 $\beta$  [IL-1 $\beta$ ], fator de necrose tumore- $\alpha$  [TNF- $\alpha$ ]), citocina anti-inflamatória  
12 (interleucina-10 [IL-10]), quimiocinas (Ligante de quimiocina CXC 1 [CXCL1] e  
13 ligante de quimiocina CXC 2 [CXCL2]), mediadores lipídios pró-inflamatórios (PGE<sub>2</sub>  
14 e LTB<sub>4</sub>) e endotelina-1 (Cunha *et al.*, 1986; Ferreira *et al.*, 1989; Ribeiro *et al.*, 1997;  
15 Verri *et al.*, 2006; Guerrero *et al.*, 2008) que amplificam o processo inflamatório.

16 Os eventos vasculares da inflamação consistem, basicamente, no  
17 aumento do fluxo sanguíneo e concomitante aumento do extravasamento de líquidos  
18 e permeabilidade endotelial, eventos mediados por aminas vasoativas (histamina e  
19 serotonina). A partir destes acontecimentos, ocorrem modificações hemodinâmicas e  
20 ativação endotelial que guiam, precisamente, neutrófilos para o foco inflamatório. Os  
21 mecanismos envolvidos na migração e ativação de neutrófilos foram intensamente  
22 estudados na última década. Este processo depende da característica do estímulo  
23 (PAMP ou DAMP) e segue uma cascata temporal, espacial e hierárquica de  
24 mediadores (McDonald *et al.*, 2010; Sreeramkumar *et al.*, 2014). Em um modelo de  
25 inflamação estéril, os neutrófilos são guiados pelos sinusoides do fígado pelas

1 integrinas ICAM-1 e Mac-1 (Mcdonald *et al.*, 2010). Em contra ponto, a partir de um  
2 estímulo não estéril (*E. coli*), o recrutamento é dependente de CD44 em detrimento  
3 de Mac-1 (Mcdonald *et al.*, 2010). A atração e direcionamento dos neutrófilos ao foco  
4 inflamatório, sendo este infeccioso ou não, é mais dependente de moléculas  
5 quimioatraentes locais (junto ao foco), C5a e peptídeos formilados (fMLP), quanto  
6 moléculas adjacentes (provenientes do endotélio vascular, por exemplo), como  
7 interleucina-18 (IL-8) e leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) (Foxman *et al.*, 1997). De fato, animais  
8 nocaute para o receptor de fMLP, mas não CXCR2, apresentam redução  
9 significativa da migração de neutrófilos para o foco necrótico (Mcdonald *et al.*, 2010),  
10 exemplificando a hierarquia existente. Interessantemente, neutrófilos na circulação  
11 têm vida útil curta e constitutivamente sofrem apoptose. No entanto, o micro  
12 ambiente inflamatório estimula a expressão de genes relacionados com a  
13 longevidade, como FoxO3a (Jonsson *et al.*, 2005), tal fator também promove a  
14 ativação do NF- $\kappa$ B, induzindo a produção de mais citocinas pró-inflamatórias e  
15 espécies reativas de oxigênio (EROs) (Jonsson *et al.*, 2005; Wright *et al.*, 2010).

16 Com relação ao processo resolutivo, os estudos acerca desta fase  
17 ganharam muita atenção na última década. A resolução, conforme mencionado  
18 acima, é um processo ativo temporalmente, que abrange mediadores pró-resolutivos  
19 e mecanismos altamente regulados (Serhan *et al.*, 2014). A presença de neutrófilos  
20 apoptóticos associada à produção de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) induz a troca na  
21 classe de mediadores lipídicos pró-inflamatórios para pró-resolução (Levy *et al.*,  
22 2001). Diante da alteração, ocorre a ativação de macrófagos não flogísticos e inicia-  
23 se a eferocitose de corpos apoptóticos de neutrófilos buscando restaurar a  
24 homeostase tecidual. Os principais mediadores pró-resolução são as lipoxinas,  
25 maresinas, protectinas e resolvinas (Serhan *et al.*, 2014). De maneira geral, esses

1 mediares controlam o processo inflamatório, reduzindo os danos e reparando os  
2 tecidos afetados. O espectro de ação destes mediadores vêm ganhando atenção e  
3 têm seus potenciais avaliados em diversos modelos experimentais inflamatórios  
4 (Krishnamoorthy *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2010; Xu e Ji, 2011; Liao *et al.*, 2012;  
5 Benabdoune *et al.*, 2016). Em linhas gerais, os mediadores lipídicos pró-resolução  
6 contribuem significativamente para o retorno da homeostase e reduzem sintomas  
7 característicos como dor inflamatória. O papel dos mediadores, principalmente da  
8 resolvina D1, serão revisados mais profundamente em um próximo tópico.

9

10

## 11 1.2 DOR INFLAMATÓRIA

12 No processo evolutivo, a percepção de dor, ou nocicepção, foi um  
13 mecanismo mantido para conferir ao indivíduo a capacidade de autopreservação.  
14 Em outras palavras, a percepção dolorosa é essencial para a identificação de  
15 situações que possam causar danos, ou controlar aqueles já existentes em uma  
16 lesão, garantindo assim, o sucesso reprodutivo da espécie. Embora evolutivamente  
17 positivas, as sensações nociceptivas agudas e principalmente aquelas com caráter  
18 prolongado (dor crônica), levam a diminuição significativa da qualidade de vida do  
19 indivíduo. É tal influência da dor na qualidade de vida, que sua presença constante é  
20 um fator de risco consistente para pensamentos depressivos e comportamentos  
21 suicidas (Calati *et al.*, 2015). Com isso em mente, faz-se necessário compreender os  
22 mecanismos fisiológicos e os agentes envolvidos na percepção da dor, em especial  
23 a dor inflamatória.

24

25 Historicamente, o entendimento da fisiologia da dor no mundo moderno se iniciou com René Descartes (“Treatise of Man”, 1664). Para Descartes,

1 a dor era apenas uma consequência de uma ativação linear periférica para o cérebro  
2 (Moayedi e Davis, 2013). Muito se evoluiu desde a proposta de Descartes. A  
3 percepção da dor, além de envolver mecanismos fisiológicos complexos, depende  
4 das experiências e perfil emocional de cada indivíduo. Assim, a Associação  
5 Internacional para o Estudo da Dor (IASP) classifica a dor como “uma experiência  
6 sensorial e emocional desagradável que é associada a lesões reais ou potenciais ou  
7 descrita em termos de tal lesão”. Portanto, o limiar nociceptivo pode variar de acordo  
8 experiências emocionais passadas, estado de humor e atenção (Bushnell *et al.*,  
9 2013) e expectativas em relação à intensidade do estímulo (Wiech *et al.*, 2014).

10 Contudo, as definições mais recentes da fisiologia da dor consistem  
11 na sensibilização periférica de nociceptores, sensibilização espinal, plasticidade  
12 neural e mudança de fenótipo de células do sistema imune (Mogil *et al.*, 2000; Woolf  
13 e Salter, 2000; Scholz e Woolf, 2002; Reichling e Levine, 2009). Basicamente, o  
14 processo de nocicepção envolve a transdução, condução, transmissão e percepção  
15 dos estímulos nócicos. Em linhas gerais, a sensibilização periférica por um estímulo  
16 nociceptivo desencadeia um mecanismo ascendente que consiste na despolarização  
17 de nociceptores de primeira ordem e a condução do impulso nervoso até o corno da  
18 raiz dorsal da medula espinal, ou até o núcleo trigeminal. Nesta região, por meio de  
19 neurotransmissores excitatórios (CGRP, substancia P e glutamato) (Scholz e Woolf,  
20 2002; Braz *et al.*, 2014), ocorre a transmissão da informação para nociceptores de  
21 segunda ordem. Por fim, a percepção é o fornecimento da informação referente ao  
22 estímulo inicial, através de sinapses no córtex somatosensorial, sobre a localização  
23 e intensidade do estímulo. Outras projeções nervosas contribuem para o  
24 componente emocional do processo doloroso (Millan, 1999; Mogil *et al.*, 2000; Woolf  
25 e Salter, 2000; Scholz e Woolf, 2002; Reichling e Levine, 2009; Todd, 2010).

1                   A dor inflamatória é decorrente da ativação de neurônios  
2 nociceptivos periféricos através da estimulação de mediadores pró-inflamatórios. A  
3 dor decorrente de processos inflamatórios pode ser associada a diversas doenças.  
4 Nestas, a exacerbação ou persistência da dor é a principal causa de procura por  
5 atendimento médico. São inúmeros os mediadores pró-inflamatórios que sensibilizam  
6 diretamente neurônios nociceptores (IL-1 $\beta$ , TNF-  $\alpha$ , LTB<sub>4</sub>, PGE<sub>2</sub>, adenosina trifosfato  
7 [ATP] e C5a) (Mogil *et al.*, 2000; Woolf e Salter, 2000; Scholz e Woolf, 2002; Verri *et*  
8 *al.*, 2006; Guerrero *et al.*, 2008; Braz *et al.*, 2014). Além disso, um denominador  
9 comum para a dor inflamatória é a presença de neutrófilos. Essas células  
10 desempenham um papel fundamental na manutenção da dor inflamatória (Cunha *et*  
11 *al.*, 2008). Após ativação, neutrófilos produzem citocinas pró-inflamatórias como IL-  
12 1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e interleucina-33 (IL-33) (Verri *et al.*, 2006). Após o estímulo lesivo uma  
13 cascata de citocinas pró-inflamatórias precede a liberação de aminas simpáticas e  
14 PGE<sub>2</sub> que levam a sensibilização dos nociceptores. A alarmina, IL-33, inicia a  
15 cascata (Zarponi *et al.*, 2013) estimulando a produção sequencial de TNF-  
16  $\alpha$ →interleucina-6 (IL-6)→IL-1 $\beta$ →PGE<sub>2</sub>, e TNF- $\alpha$ →CXCL1→IL-1 $\beta$ →aminas  
17 simpáticas (Cunha *et al.*, 2005; Verri *et al.*, 2006). Estas moléculas, ao se ligarem  
18 aos respectivos receptores ativam proteínas kinases (PKA e PKC), que por vez,  
19 fosforilam canais iônicos (TRPV1, TRPA1 e Nav1.8) ativando os neurônios  
20 nociceptivos (Scholz e Woolf, 2002; Braz *et al.*, 2014).

21                   Embora os nociceptores tenham como principal papel a percepção e  
22 transmissão da informação dolorosa, o entendimento contemporâneo mostrou que  
23 suas funções extrapolam seu papel primário. De fato, os nociceptores expressam  
24 PRRs (TLR 2, 3, 4 e 7; e NLR) e são capazes de ser ativados na presença de  
25 DAMPs ou PAMPs (Liu *et al.*, 2010; Qi *et al.*, 2011). Interessantemente, moléculas

1 como ATP, fMLP e lipopolissacarídeos (LPS) induzem diretamente a atividade  
2 nociceptiva. Por outro lado, a ativação e liberação de neuropeptídios atua na  
3 modulação da função das células imunes, participando ativamente na montagem da  
4 resposta imune (Chiu *et al.*, 2013).

5

6

### 7 1.3 ARTRITE GOTOSA

8 A artrite gotosa (AG) é considerada como uma das condições  
9 agudas mais dolorosas que os seres humanos podem experimentar (Martinon e  
10 Glimcher, 2006). Historicamente, as primeiras descrições foram realizadas por  
11 civilizações egípcias e datam do ano 2640 a.C, neste contexto a gota recebeu o  
12 nome de *podagra* (Nuki e Simkin, 2006). Um século mais tarde, Hipócrates  
13 descreveu a *podagra* como a “artrite dos ricos” ou “doença de reis”, pelo fato de o  
14 aparecimento dos sintomas estarem relacionados com os hábitos alimentares fartos  
15 da época (Nuki e Simkin, 2006). No século III d.C., Galeno descreveu o *tophus*, no  
16 entanto, sem saber que se tratava do acúmulo de ácido úrico e cristais de urato  
17 monossódio. No século XIII d.C., o monge dominicano Randolphus de Bocking  
18 nomeou a doença gota, do latim *gutta*. Seus motivos foram baseados na concepção  
19 medieval, de que um organismo em equilíbrio possuía quatro humores, através do  
20 desequilíbrio, um dos humores se deslocava para as articulações, gerando os  
21 sintomas da doença (Nuki e Simkin, 2006). A definição do agente etiológico da  
22 doença, como sendo os cristais de urato monossódico (MSU) ocorreu apenas na  
23 década de 1960. Em um ato audacioso, Faires e MacCarty, injetaram 20mg de MSU  
24 em suas próprias articulações. Conforme esperado, após algumas horas ambos  
25 desenvolveram os sintomas (Faires, 1962; Martinon e Glimcher, 2006).

1 Atualmente a AG é classificada como uma doença inflamatória  
2 prototípica, induzida pela ativação do sistema imune inato (So e Martinon, 2017). O  
3 agente causador são os cristais de MSU, precipitados nas articulações e tecidos  
4 periarticulares (Dalbeth e Haskard, 2005) em associação aos elevados níveis  
5 plasmáticos de ácido úrico, hiperuricemia (níveis de urato plasmáticos > 7 mg/L).  
6 Clinicamente, a doença é caracterizada por episódios agudos de inflamação articular  
7 intercalado por períodos não-inflamatórios de durações variáveis (So e Martinon,  
8 2017). Embora seja uma doença de caráter auto-limitante, com resolução em até 10  
9 dias, o não tratamento pode gerar sérios danos articulares, incluindo degradação de  
10 cartilagens e ossos (Schlesinger e Thiele, 2010), limitação de movimentos e  
11 recorrentes ataques inflamatórios agudos.

12 A fisiopatologia da gota tem como principais componentes o  
13 inflamassoma NLRP3 e sua atividade na maturação da citocina pro-inflamatória IL-  
14 1 $\beta$  (Martinon *et al.*, 2006; Amaral *et al.*, 2012). Em linhas gerais a montagem e  
15 ativação do inflamassoma NLRP3 consiste em dois sinais ou estímulos  
16 independentes. O primeiro sinal, sinal 1, controla a expressão de todos os  
17 componentes necessários para montagem e ativação do inflamassoma (NLRP3,  
18 ASC e por-CASPASE-1) e também o produto a substrato da CASPASE-1 ativada,  
19 pro-IL-1 $\beta$  (Burns *et al.*, 2003). A expressão de todos estes componentes são  
20 dependentes do fator NF- $\kappa$ B e as suas vias de sinalização *downstream*. A origem do  
21 sinal 1, na natureza, ainda não se fez clara, no entanto, esta ativação é dependente  
22 de receptores TLR (Liu-Bryan *et al.*, 2005). Dentre os possíveis candidatos se  
23 destacam: as proteínas endógenas ligantes de TLR, S100A8 e S100A9 (Holzinger *et*  
24 *al.*, 2014), ácidos graxos livres de cadeia longa (FFAs) (Joosten *et al.*, 2010), fator  
25 estimulante de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF) (An *et al.*, 2014) e

1 proteína C5a do complemento (An *et al.*, 2014; Khameneh *et al.*, 2017). Além desses  
2 ligantes, a própria IL-1 $\beta$  participa na ativação, estabelecendo um “loop” de auto-  
3 amplificação (So e Martinon, 2017) (Figura 1).

4 O segundo sinal, sinal 2, controla a ativação do inflamassoma. Este  
5 sinal mais específico propicia a clivagem da pró-CASPASE-1 em CASPASE-1 que,  
6 uma vez ativa, cliva a pró-IL-1 $\beta$  em IL-1 $\beta$  madura (Martinon *et al.*, 2006). Os  
7 mecanismos pelos quais a ativação do NLRP3 ocorrem não são completamente  
8 compreendidos. Sugere-se a ativação do NLRP3 por perturbações no equilíbrio  
9 iônico celular (Petrilli *et al.*, 2007; Yaron *et al.*, 2015), provocadas pelos cristais de  
10 MSU (An *et al.*, 2014), consequente liberação de EROs provenientes das  
11 mitocôndrias, o que evoca a ativação da kinase Nek7. Nestas condições, Nek7 se  
12 liga diretamente ao NLRP3 ativando-o (He *et al.*, 2016; Schmid-Burgk *et al.*, 2016;  
13 Shi *et al.*, 2016). Interessantemente, a ativação do inflamassoma por cristais de MSU  
14 também é associada ao rompimento do fagolisossomo e a liberação de seu  
15 conteúdo no espaço citosólico (Martinon *et al.*, 2006; Duewell *et al.*, 2010). Dentre os  
16 componentes fagolisossomais as enzimas catepsina B e L induzem a ativação de  
17 NLRP3. De fato, estudos com animais nocaute para essas enzimas não  
18 apresentaram ativação do inflamassoma perante estímulos com cristais de colesterol  
19 (Duewell *et al.*, 2010) (Figura 1).

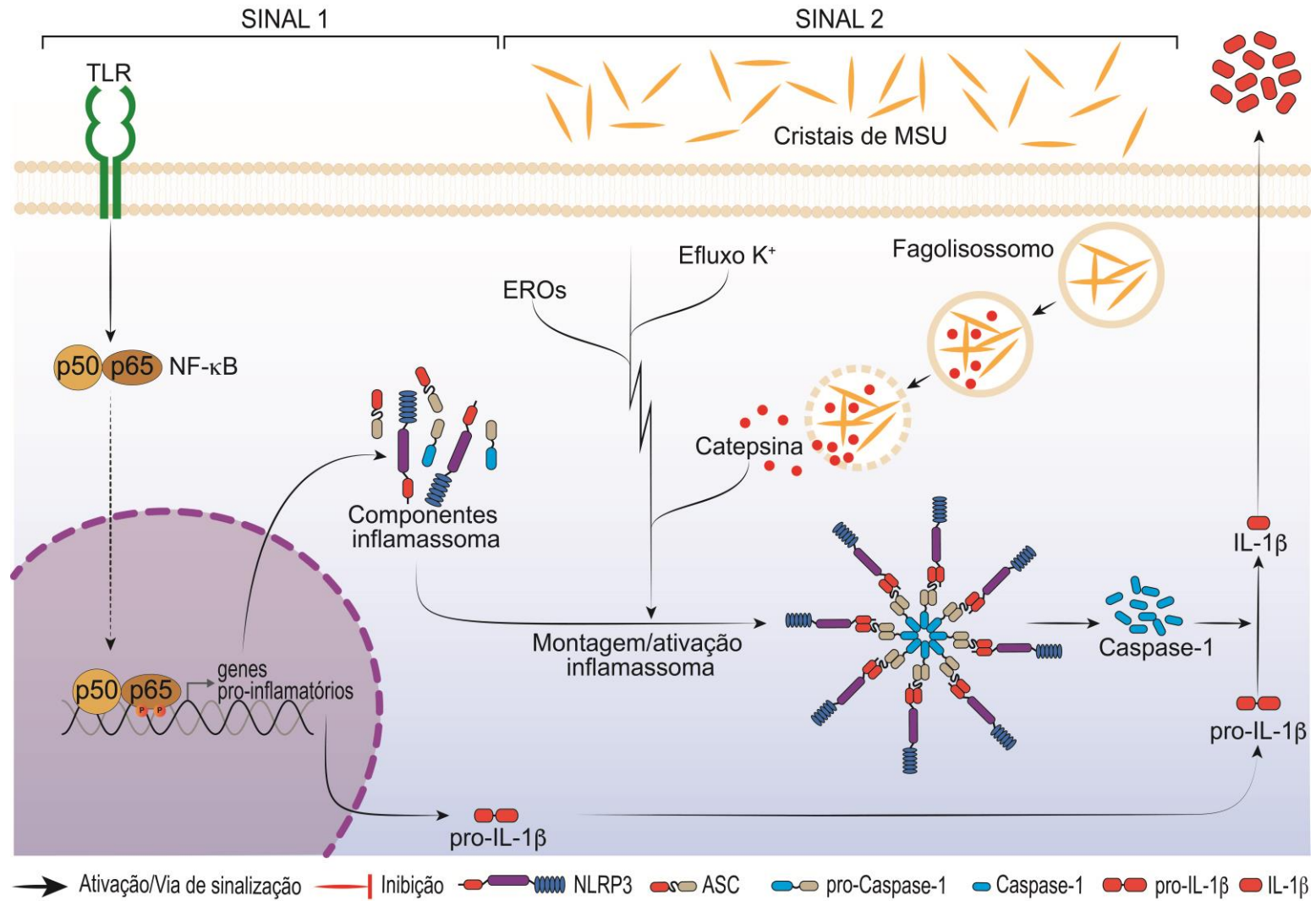
20 Os cristais de MSU induzem a liberação de citocinas quando  
21 fagocitados por macrófagos residentes. A IL-1 $\beta$  é a citocina chave na fisiopatologia  
22 da doença e responsável por desencadear a resposta inflamatória em diversos tipos  
23 celulares (Dinarello, 2009). O recrutamento de neutrófilos é um marcador das  
24 doenças reumáticas (Fattori *et al.*, 2016) e de fato são o tipo celular predominante no  
25 líquido sinovial de pacientes durante os ataques inflamatórios da gota (Mitroulis *et*

1 *al.*, 2013). Uma vez no foco inflamatório, em consequência da produção de IL-1 $\beta$  e  
2 LTB<sub>4</sub> (Amaral *et al.*, 2012), o reconhecimento dos cristais de MSU por neutrófilos  
3 induz a degranulação (Popa-Nita *et al.*, 2007) e a formação de armadilhas  
4 extracelulares (NETs - *Neutrophils Extracellular Traps*), processo denominado  
5 NETose (Mitroulis *et al.*, 2011). Juntamente, esses fatores corroboram para a  
6 amplificação da resposta inflamatória através do aumento significativo na ativação  
7 do NF- $\kappa$ B e produção de citocinas pró-inflamatórias. As dores excruciantes  
8 decorrentes da gota estão associadas a mecanismos de dor inflamatória, nos quais  
9 as citocinas pró-inflamatórias, principalmente a IL-1 $\beta$ , sensibilizam nociceptores  
10 acarretando no fenótipo altamente doloroso. Estes eventos demonstram  
11 características que em certo ponto classificaram a AG como uma doença auto-  
12 inflamatória (So e Martinon, 2017). Importaneamente, as funções dos neutrófilos vão  
13 além do aumento da resposta inflamatória neste contexto. Esta célula com papel  
14 duplo, através da formação de NETs (Schauer *et al.*, 2014) limitam a progressão da  
15 doença e iniciam o processo resolutivo da AG. Além disso, a expressão da proteína  
16 anexina-1, potente inibidora da fosfolipase A2, exerce importante papel na limitação  
17 da inflamação e na promoção da resolução. A mesma exerce importante papel na  
18 troca de classe de mediadores pró-inflamatórios para pró-resolutivos (Perretti e  
19 D'acquisti, 2009).

20 O tratamento da gota consiste principalmente em terapias que visam  
21 reduzir os níveis plasmáticos de urato e controlar os ataques agudos. No entanto, o  
22 principal motivo que leva os pacientes a procurar auxílio médico são os episódios de  
23 dor intensa (Rees *et al.*, 2014). Basicamente, o controle dos episódios agudos  
24 consistem no uso de anti-inflamatórios esteroidais, não-esteroidais, colchicina e  
25 agentes biológicos (So e Martinon, 2017). A colchicina tem papel fundamental como

1 inibidor da montagem do inflamassoma, impedindo a maturação da IL-1 $\beta$  e sua  
2 liberação (Martinon *et al.*, 2006). Recentemente, o controle dos sintomas também  
3 pode ser atingido com agentes biológicos que tem como alvo a IL-1 $\beta$ . Anticorpos  
4 contra IL-1 $\beta$  (Canakinumab) e proteínas recombinantes antagonista do receptor do  
5 receptor IL-1R (Anakinra) estão disponíveis no mercado (So e Martinon, 2017).  
6 Infelizmente, os medicamentos propostos para o tratamento e controle dos ataques  
7 agudos não são seguros para pacientes comorbidades (AINEs), usualmente geram  
8 efeitos colaterais (AINEs, AIEs e colchicina), apresentam custo elevado (agentes  
9 biológicos), além de não possuírem efeito analgésico satisfatório (Rees *et al.*, 2014).  
10 Desta forma, ainda se faz necessário e de altíssima importância o desenvolvimento  
11 de novas terapias que tenham como alvo a inibição da dor, principalmente para  
12 garantir melhor qualidade de vida àqueles que são acometidos pela AG.

**Figura 1** – Fisiopatologia da artrite gotosa.



**Fonte:** o próprio autor.

#### 1 1.4 MEDIADORES LIPÍDICOS PRÓ-RESOLUÇÃO

2 O sucesso e benefício da inflamação para o hospedeiro são  
3 garantidos em decorrência da existência de mediadores que orquestram ativamente  
4 todas as etapas do processo. Os conhecimentos acerca dos mediadores lipídicos  
5 pró-inflamação, e o papel nas alterações vasculares e recrutamento de células para  
6 o foco inflamatório estão bem definidos. No entanto, até recentemente, pouco se  
7 sabia sobre a existência de mediadores endógenos capazes de controlar a  
8 exacerbação da inflamação e restaurar a homeostase tecidual. Através de estudos  
9 em exsudados inflamatórios (Serhan, 2004) quatro famílias de compostos com  
10 características potentes em ações resolutivas foram identificadas: resolvinas,  
11 protectinas, maresinas e lipoxinas (Serhan, 2014).

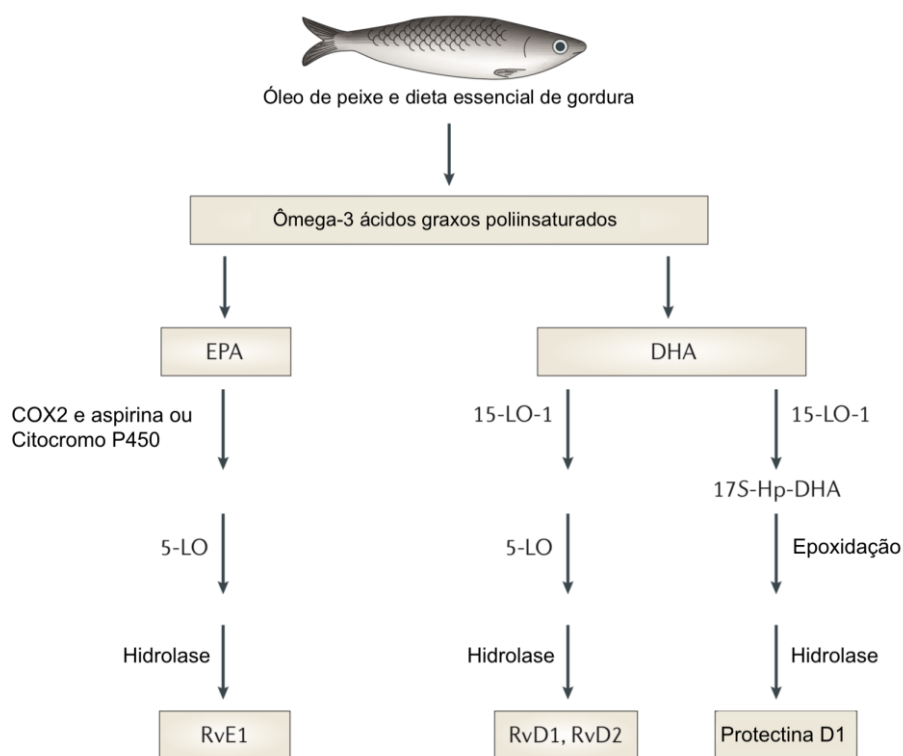
12 Estas moléculas são derivadas da transformação dos ácidos graxos  
13 essenciais do ômega-3, como ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido  
14 docosaexaenóico (DHA) (Serhan, 2014) (Figura 2). Embora tenham sido  
15 primeiramente identificados na resolução do processo inflamatório, esses  
16 mediadores desempenham papéis importantes na defesa do hospedeiro,  
17 manutenção da dor e remodelamento tecidual (Serhan, 2014). Dentre as funções em  
18 comum desses mediadores se destacam a ativação de macrófagos não-flogísticos.  
19 Estes macrófagos irão realizar a eferocitose dos corpos apoptóticos de neutrófilos e  
20 induzirão os sinais da resolução do processo inflamatório. Processos estes que  
21 incluem a redução de citocinas pró-inflamatórias, retirada dos neutrófilos da  
22 superfície epitelial, fagocitose dos neutrófilos em apoptose e remoção dos *debris*  
23 inflamatórios e infecciosos (Serhan, 2014).

24 Em adição às características analgésicas, anti-inflamatórias e  
25 resolutivas, os mediadores lipídicos pró resolução (MLPR) não possuem atividade

1 imunossupressora, o que coloca essas moléculas como fortes candidatas a testes  
 2 clínicos. De fato, a Resolvina E1, derivada do EPA, atingiu a clínica como RX-  
 3 10045<sup>®</sup> para testes no tratamento da síndrome dos olhos ressecados. Os pacientes  
 4 apresentaram melhora significativa na condição de maneira dose-dependente  
 5 (Clinicaltrials.gov identificação NCT00799552) (Lee, 2012; Norling e Perretti, 2013).  
 6 Além disso, embora os MLPR tenham uma meia-vida extremamente curta, na faixa  
 7 de segundos em meio aquoso (Aursnes *et al.*, 2015), eles apresentam um efeito  
 8 biológico duradouro, na faixa de dias (Serhan *et al.*, 2012). Esses fatores associados  
 9 a estudos em animais de experimentação, e o fato que os MLPR apresentam  
 10 atividade terapêutica na faixa de pictogramas, encorajam e dão suporte para o uso  
 11 de outros MLPR isolados em testes clínicos (Fattori *et al.*, 2016).

12

13 **Figura 2 –** Metabolismo dos ácidos graxos essenciais do  $\omega$ -3.



14

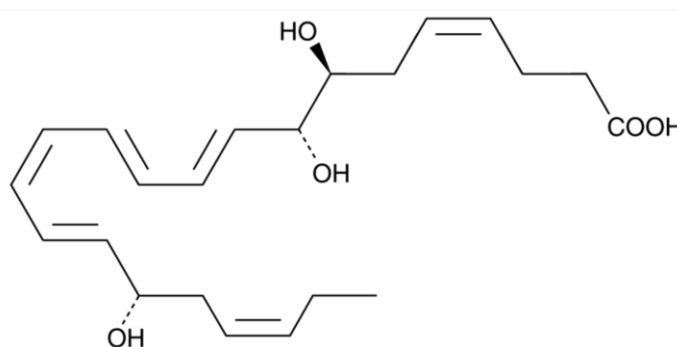
15 **Fonte:** adaptado de Ji *et al.*, 2014

1

## 2 1.5 RESOLVINA D1

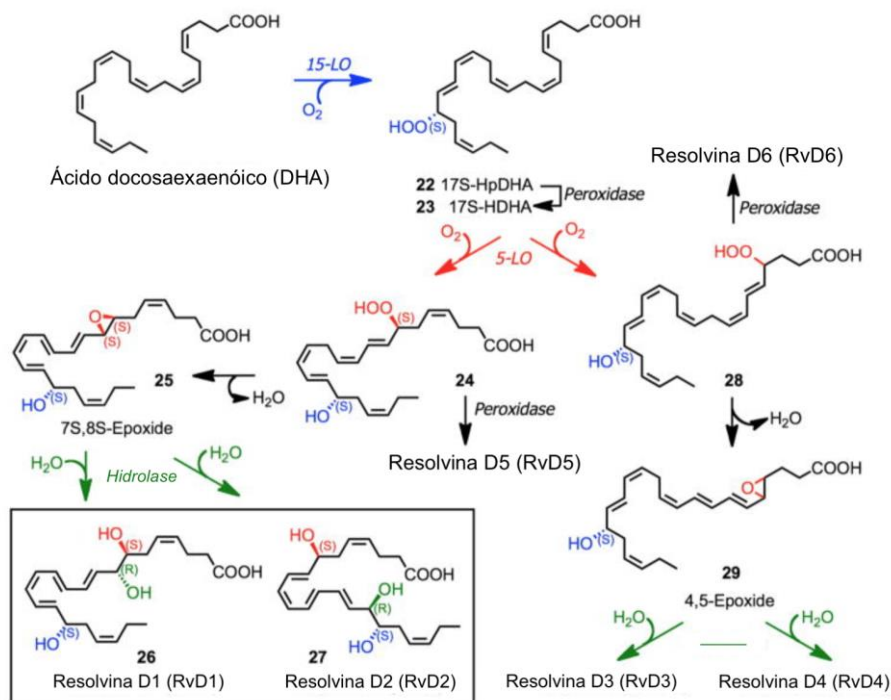
3 A Resolvina D1 (ácido 7S, 8R, 17S-tri-hidroxi-4Z, 9E, 11E, 13Z, 15E,  
4 19Z-docosahexaenóico) (Figura 3) faz parte das resolvinas da série D e é derivada  
5 do metabolismo do DHA pelas enzimas 15-lipoxigenase, 5-lipoxigenase e hidrolase  
6 (Serhan e Petasis, 2011) (Figura 4). Este MLPR foi isolado em exsudatos  
7 inflamatórios na fase resolutiva decorrente de inflamação aguda em ambos,  
8 roedores e humanos (Serhan *et al.*, 2000; Serhan *et al.*, 2002; Hong *et al.*, 2003). Os  
9 mecanismos pelos quais a RvD1 age ainda não estão bem estabelecidos, no  
10 entanto, sua atividade é dependente de receptores associados a proteína G, os  
11 receptores de lipoxina A<sub>4</sub> (ALX/FPR2), exclusivos de murinos e, GPR32, exclusivo  
12 de humano (Mcqualter *et al.*, 2010). Camundongos nocaute para ALX/FPR2  
13 apresentam maior degradação tecidual quando comparados com camundongos  
14 selvagens (ou seja, aqueles que expressam o receptor) em modelo de inflamação  
15 induzida por LPS em glândulas submandibulares (Wang *et al.*, 2016). Este fato  
16 demonstra a importância da RvD1 na contenção e resolução do processo  
17 inflamatório.

18

19 **Figura 3** – Estrutura química da RvD1.

20

21 **Fonte:** PubChem.

1 **Figure 4 – Biossíntese da RvD1.**

2

3 **Fonte:** Adaptado de Serhan e Petasis, 2011

4

5

6 Estudos já estabeleceram alguns dos efeitos anti-inflamatórios e  
 7 analgésicos da RvD1 em modelos animais de inflamação aguda. Os efeitos anti-  
 8 inflamatórios consistem na regulação da função de macrófagos (Duffield *et al.*,  
 9 2006), inibição do recrutamento neutrofílico (Serhan *et al.*, 2002; Recchiuti *et al.*,  
 10 2011) e proteção renal contra danos induzidos pela isquemia e reperfusão (Duffield  
 11 *et al.*, 2006). RvD1 também tem efeito sobre a ativação do NF-κB através de  
 12 diferentes vias de sinalização, este fato confere a este MLPR grande parte de suas  
 13 propriedades anti-inflamatórias. De fato, em modelo de miocardite induzida por  
 14 isquemia-reperfusão, o tratamento com RvD1 inibe a via PI3K/AKT e impede a  
 15 ativação do NF-κB, contribuindo assim para a redução da lesão cardíaca  
 16 (Gilbert *et al.*, 2015). Outro mecanismo do efeito da RvD1 sob a ativação do NF-κB  
 está relacionado ao eixo de sinalização PPAR-γ/NF-κB (Liao *et al.*, 2012). Este

1 mecanismo foi descrito em um modelo animal de inflamação pulmonar induzido por  
2 LPS. Neste contexto, o papel da RvD1 em diminuir o dano tecidual foi revertido a  
3 partir da administração do inibidor PPAR- $\gamma$  (GW9662). Além do mais, a ativação de  
4 PPAR- $\gamma$ , neste contexto, acarretou na diminuição da degradação de I $\kappa$ B $\alpha$ ,  
5 mecanismo responsável pela diminuição da ativação de NF- $\kappa$ B (Liao *et al.*, 2012). A  
6 ativação de PPAR- $\gamma$  também tem como efeito a diminuição da hiperalgesia por vias  
7 subjacentes. Desta forma, um dos mecanismos da RvD1 em reduzir a dor  
8 inflamatória pode ser dependente da via PPAR- $\gamma$ /NF- $\kappa$ B.

9 Com relação aos efeitos analgésicos desse mediador, os  
10 mecanismos pelos quais a dor é reduzida podem estar relacionados a ações  
11 dependentes das características anti-inflamatórias ou diretamente a sensibilização  
12 de neurônios nociceptores. A RvD1 mostrou ser efetora na redução da dor  
13 inflamatória induzida por estímulos nócicos como carragenina, CFA e PGE<sub>2</sub> (Xu *et*  
14 *al.*, 2010; Xu e Ji, 2011). Importaneamente, a RvD1 não interfere na percepção  
15 normal da dor. Por outro lado, o tratamento com RvD1 reduz a ativação de canais  
16 iônicos TRPA1, TRPV3 e TRPV4 em fibras nociceptivas perante seus respectivos  
17 agonistas, em estudos de influxo de Ca<sup>2+</sup> *in vitro* (Bang *et al.*, 2010). De forma  
18 similar, no mesmo estudo, RvD1 reduziu a hiperalgesia mecânica e alodinia  
19 induzidas por estímulos inflamatórios *in vivo* (Bang *et al.*, 2010).

20 De forma geral, é evidente o potencial da RvD1 em controlar a  
21 inflamação e coordenar o processo resolutivo (Wang *et al.*, 2016) e analgesia (Bang  
22 *et al.*, 2010). Portanto, essas características nos conduziram a avaliar a eficácia da  
23 RvD1 frente ao modelo de AG induzida por cristais de MSU *in vivo* e em *in vitro*.

24

1 2 OBJETIVOS

2

3 2.1 OBJETIVOS GERAIS

4

5 Avaliar os mecanismos analgésicos e anti-inflamatórios da RvD1 em  
6 modelo de AG induzida por MSU.

7

8 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

9 Avaliara o efeito da RvD1 nos parâmetros:

- 10 • Hiperalgesia mecânica e edema;
- 11 • Recrutamento leucocitário para cavidade articular e sinovite;
- 12 • Produção de citocinas *in vivo*;
- 13 • Expressão dos componentes do inflamassoma e receptor ALX/FRP2, *in vitro*.
- 14 • Maturação da IL-1 $\beta$  e atividade do NF- $\kappa$ B *in vitro*;

## 2 REFERÊNCIAS

- AMARAL, F. A. et al. NLRP3 inflammasome-mediated neutrophil recruitment and hypernociception depend on leukotriene B(4) in a murine model of gout. **Arthritis Rheum**, v. 64, n. 2, p. 474-84, Feb 2012. ISSN 1529-0131 (Electronic) 0004-3591 (Linking). Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21952942> >.
- AN, L. L. et al. Complement C5a potentiates uric acid crystal-induced IL-1beta production. **Eur J Immunol**, v. 44, n. 12, p. 3669-79, Dec 2014. ISSN 1521-4141 (Electronic) 0014-2980 (Linking). Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25229885> >.
- AURSNES, M. et al. Synthesis of the 16S,17S-Epoxyprotectin Intermediate in the Biosynthesis of Protectins by Human Macrophages. **J Nat Prod**, v. 78, n. 12, p. 2924-31, Dec 24 2015. ISSN 1520-6025 (Electronic) 0163-3864 (Linking). Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26580578> >.
- BANG, S. et al. Resolvin D1 attenuates activation of sensory transient receptor potential channels leading to multiple anti-nociception. **Br J Pharmacol**, v. 161, n. 3, p. 707-20, Oct 2010. ISSN 1476-5381 (Electronic) 0007-1188 (Linking). Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20880407> >.
- BENABDOUNE, H. et al. The role of resolvin D1 in the regulation of inflammatory and catabolic mediators in osteoarthritis. **Inflamm Res**, v. 65, n. 8, p. 635-45, Aug 2016. ISSN 1420-908X (Electronic) 1023-3830 (Linking). Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27056390> >.
- BRAZ, J. et al. Transmitting pain and itch messages: a contemporary view of the spinal cord circuits that generate gate control. **Neuron**, v. 82, n. 3, p. 522-36, May 7 2014. ISSN 1097-4199 (Electronic) 0896-6273 (Linking). Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24811377> >.
- BURNS, K.; MARTINON, F.; TSCHOPP, J. New insights into the mechanism of IL-1beta maturation. **Curr Opin Immunol**, v. 15, n. 1, p. 26-30, Feb 2003. ISSN 0952-7915 (Print) 0952-7915 (Linking). Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12495729> >.
- BUSHNELL, M. C.; CEKO, M.; LOW, L. A. Cognitive and emotional control of pain and its disruption in chronic pain. **Nat Rev Neurosci**, v. 14, n. 7, p. 502-11, Jul 2013. ISSN 1471-0048 (Electronic) 1471-003X (Linking). Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23719569> >.

- 1  
2 CALATI, R. et al. The impact of physical pain on suicidal thoughts and behaviors:  
3 Meta-analyses. **J Psychiatr Res**, v. 71, p. 16-32, Dec 2015. ISSN 1879-1379  
4 (Electronic)  
5 0022-3956 (Linking). Disponível em: <  
6 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26522868> >.  
7
- 8 CHIU, I. M. et al. Bacteria activate sensory neurons that modulate pain and  
9 inflammation. **Nature**, v. 501, n. 7465, p. 52-7, Sep 5 2013. ISSN 1476-4687  
10 (Electronic)  
11 0028-0836 (Linking). Disponível em: <  
12 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23965627> >.  
13
- 14 CUNHA, F. Q.; CACINI, A. T.; FERREIRA, S. H. Inhibition of the release of a  
15 neutrophil chemotactic factor from macrophages partially explains the anti-  
16 inflammatory action of glucocorticoids. **Agents Actions**, v. 17, n. 3-4, p. 314-7, Jan  
17 1986. ISSN 0065-4299 (Print)  
18 0065-4299 (Linking). Disponível em: <  
19 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3083657> >.  
20
- 21 CUNHA, T. M. et al. Crucial role of neutrophils in the development of mechanical  
22 inflammatory hypernociception. **J Leukoc Biol**, v. 83, n. 4, p. 824-32, Apr 2008.  
23 ISSN 0741-5400 (Print)  
24 0741-5400 (Linking). Disponível em: <  
25 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18203872> >.  
26
- 27 CUNHA, T. M. et al. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory  
28 hypernociception in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 5, p. 1755-60, Feb  
29 01 2005. ISSN 0027-8424 (Print)  
30 0027-8424 (Linking). Disponível em: <  
31 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15665080> >.  
32
- 33 DALBETH, N.; HASKARD, D. O. Mechanisms of inflammation in gout.  
34 **Rheumatology (Oxford)**, v. 44, n. 9, p. 1090-6, Sep 2005. ISSN 1462-0324 (Print)  
35 1462-0324 (Linking). Disponível em: <  
36 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15956094> >.  
37
- 38 DINARELLO, C. A. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1  
39 family. **Annu Rev Immunol**, v. 27, p. 519-50, 2009. ISSN 0732-0582 (Print)  
40 0732-0582 (Linking). Disponível em: <  
41 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19302047> >.  
42
- 43 DUEWELL, P. et al. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and  
44 activated by cholesterol crystals. **Nature**, v. 464, n. 7293, p. 1357-61, Apr 29 2010.  
45 ISSN 1476-4687 (Electronic)  
46 0028-0836 (Linking). Disponível em: <  
47 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20428172> >.  
48
- 49 DUFFIELD, J. S. et al. Resolvin D series and protectin D1 mitigate acute kidney  
50 injury. **J Immunol**, v. 177, n. 9, p. 5902-11, Nov 1 2006. ISSN 0022-1767 (Print)

- 1 0022-1767 (Linking). Disponível em: <  
2 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17056514> >  
3
- 4 FAIRES, J. S., MACCARTY, DANIEL J. JR. Acute arthritis in man and dog after  
5 intrasynovial injection of sodium urate crystals. **The Lancet**, v. 280, n. 7258, p. 682-  
6 685, 1962.  
7
- 8 FATTORI, V.; AMARAL, F. A.; VERRI, W. A., JR. Neutrophils and arthritis: Role in  
9 disease and pharmacological perspectives. **Pharmacol Res**, v. 112, p. 84-98, Oct  
10 2016. ISSN 1096-1186 (Electronic)  
11 1043-6618 (Linking). Disponível em: <  
12 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26826283> >  
13
- 14 FERREIRA, S. H.; ROMITELLI, M.; DE NUCCI, G. Endothelin-1 participation in overt  
15 and inflammatory pain. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 13 Suppl 5, p. S220-2, 1989.  
16 ISSN 0160-2446 (Print)  
17 0160-2446 (Linking). Disponível em: <  
18 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2473319> >  
19
- 20 FOXMAN, E. F.; CAMPBELL, J. J.; BUTCHER, E. C. Multistep navigation and the  
21 combinatorial control of leukocyte chemotaxis. **J Cell Biol**, v. 139, n. 5, p. 1349-60,  
22 Dec 1 1997. ISSN 0021-9525 (Print)  
23 0021-9525 (Linking). Disponível em: <  
24 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9382879> >  
25
- 26 GILBERT, K. et al. Resolvin D1 Reduces Infarct Size Through a Phosphoinositide 3-  
27 Kinase/Protein Kinase B Mechanism. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 66, n. 1, p. 72-9,  
28 Jul 2015. ISSN 1533-4023 (Electronic)  
29 0160-2446 (Linking). Disponível em: <  
30 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25806690> >  
31
- 32 GUERRERO, A. T. et al. Involvement of LTB4 in zymosan-induced joint nociception  
33 in mice: participation of neutrophils and PGE2. **J Leukoc Biol**, v. 83, n. 1, p. 122-30,  
34 Jan 2008. ISSN 0741-5400 (Print)  
35 0741-5400 (Linking). Disponível em: <  
36 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17913976> >  
37
- 38 HE, Y. et al. NEK7 is an essential mediator of NLRP3 activation downstream of  
39 potassium efflux. **Nature**, v. 530, n. 7590, p. 354-7, Feb 18 2016. ISSN 1476-4687  
40 (Electronic)  
41 0028-0836 (Linking). Disponível em: <  
42 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26814970> >  
43
- 44 HEIDLAND, A. et al. The contribution of Rudolf Virchow to the concept of  
45 inflammation: what is still of importance? **J Nephrol**, v. 19 Suppl 10, p. S102-9, May-  
46 Jun 2006. ISSN 1121-8428 (Print)  
47 1121-8428 (Linking). Disponível em: <  
48 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16874721> >  
49

- 1 HOLZINGER, D. et al. Myeloid-related proteins 8 and 14 contribute to monosodium  
2 urate monohydrate crystal-induced inflammation in gout. **Arthritis Rheumatol**, v. 66,  
3 n. 5, p. 1327-39, May 2014. ISSN 2326-5205 (Electronic)  
4 2326-5191 (Linking). Disponível em: <  
5 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24470119> >.  
6
- 7 HONG, S. et al. Novel docosatrienes and 17S-resolvins generated from  
8 docosahexaenoic acid in murine brain, human blood, and glial cells. Autacoids in  
9 anti-inflammation. **J Biol Chem**, v. 278, n. 17, p. 14677-87, Apr 25 2003. ISSN 0021-  
10 9258 (Print)  
11 0021-9258 (Linking). Disponível em: <  
12 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12590139> >.  
13
- 14 IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. Regulation of adaptive immunity by the innate  
15 immune system. **Science**, v. 327, n. 5963, p. 291-5, Jan 15 2010. ISSN 1095-9203  
16 (Electronic)  
17 0036-8075 (Linking). Disponível em: <  
18 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20075244> >.  
19
- 20 JONSSON, H.; ALLEN, P.; PENG, S. L. Inflammatory arthritis requires Foxo3a to  
21 prevent Fas ligand-induced neutrophil apoptosis. **Nat Med**, v. 11, n. 6, p. 666-71, Jun  
22 2005. ISSN 1078-8956 (Print)  
23 1078-8956 (Linking). Disponível em: <  
24 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15895074> >.  
25
- 26 JOOSTEN, L. A. et al. Engagement of fatty acids with Toll-like receptor 2 drives  
27 interleukin-1beta production via the ASC/caspase 1 pathway in monosodium urate  
28 monohydrate crystal-induced gouty arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 62, n. 11, p. 3237-  
29 48, Nov 2010. ISSN 1529-0131 (Electronic)  
30 0004-3591 (Linking). Disponível em: <  
31 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20662061> >.  
32
- 33 KHAMENEH, H. J. et al. C5a Regulates IL-1beta Production and Leukocyte  
34 Recruitment in a Murine Model of Monosodium Urate Crystal-Induced Peritonitis.  
35 **Front Pharmacol**, v. 8, p. 10, 2017. ISSN 1663-9812 (Print)  
36 1663-9812 (Linking). Disponível em: <  
37 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28167912> >.  
38
- 39 KRISHNAMOORTHY, S. et al. Resolvin D1 binds human phagocytes with evidence  
40 for proresolving receptors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 4, p. 1660-5, Jan 26  
41 2010. ISSN 1091-6490 (Electronic)  
42 0027-8424 (Linking). Disponível em: <  
43 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20080636> >.  
44
- 45 LAWRENCE, T.; WILLOUGHBY, D. A.; GILROY, D. W. Anti-inflammatory lipid  
46 mediators and insights into the resolution of inflammation. **Nat Rev Immunol**, v. 2, n.  
47 10, p. 787-95, Oct 2002. ISSN 1474-1733 (Print)  
48 1474-1733 (Linking). Disponível em: <  
49 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12360216> >.  
50

- 1 LEE, C. H. Resolvins as new fascinating drug candidates for inflammatory diseases.  
2 **Arch Pharm Res**, v. 35, n. 1, p. 3-7, Jan 2012. ISSN 0253-6269 (Print)  
3 0253-6269 (Linking). Disponível em: <  
4 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22297737> >.  
5
- 6 LEVY, B. D. et al. Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals  
7 in resolution. **Nat Immunol**, v. 2, n. 7, p. 612-9, Jul 2001. ISSN 1529-2908 (Print)  
8 1529-2908 (Linking). Disponível em: <  
9 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11429545> >.  
10
- 11 LIAO, Z. et al. Resolvin D1 attenuates inflammation in lipopolysaccharide-induced  
12 acute lung injury through a process involving the PPARgamma/NF-kappaB pathway.  
13 **Respir Res**, v. 13, p. 110, Dec 2 2012. ISSN 1465-993X (Electronic)  
14 1465-9921 (Linking). Disponível em: <  
15 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23199346> >.  
16
- 17 LIU, T. et al. Toll-like receptor 7 mediates pruritus. **Nat Neurosci**, v. 13, n. 12, p.  
18 1460-2, Dec 2010. ISSN 1546-1726 (Electronic)  
19 1097-6256 (Linking). Disponível em: <  
20 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21037581> >.  
21
- 22 LIU-BRYAN, R. et al. Innate immunity conferred by Toll-like receptors 2 and 4 and  
23 myeloid differentiation factor 88 expression is pivotal to monosodium urate  
24 monohydrate crystal-induced inflammation. **Arthritis Rheum**, v. 52, n. 9, p. 2936-46,  
25 Sep 2005. ISSN 0004-3591 (Print)  
26 0004-3591 (Linking). Disponível em: <  
27 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16142712> >.  
28
- 29 MADERNA, P.; GODSON, C. Lipoxins: revolutionary road. **Br J Pharmacol**, v. 158,  
30 n. 4, p. 947-59, Oct 2009. ISSN 1476-5381 (Electronic)  
31 0007-1188 (Linking). Disponível em: <  
32 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19785661> >.  
33
- 34 MARTINON, F.; GLIMCHER, L. H. Gout: new insights into an old disease. **J Clin**  
35 **Invest**, v. 116, n. 8, p. 2073-5, Aug 2006. ISSN 0021-9738 (Print)  
36 0021-9738 (Linking). Disponível em: <  
37 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16886051> >.  
38
- 39 MARTINON, F. et al. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3  
40 inflammasome. **Nature**, v. 440, n. 7081, p. 237-41, Mar 09 2006. ISSN 1476-4687  
41 (Electronic)  
42 0028-0836 (Linking). Disponível em: <  
43 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16407889> >.  
44
- 45 MCDONALD, B. et al. Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of  
46 sterile inflammation. **Science**, v. 330, n. 6002, p. 362-6, Oct 15 2010. ISSN 1095-  
47 9203 (Electronic)  
48 0036-8075 (Linking). Disponível em: <  
49 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20947763> >.  
50

- 1 MCQUALTER, J. L. et al. Evidence of an epithelial stem/progenitor cell hierarchy in  
2 the adult mouse lung. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 4, p. 1414-9, Jan 26  
3 2010. ISSN 1091-6490 (Electronic)  
4 0027-8424 (Linking). Disponível em: <  
5 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20080639> >.  
6
- 7 MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n.  
8 7203, p. 428-35, Jul 24 2008. ISSN 1476-4687 (Electronic)  
9 0028-0836 (Linking). Disponível em: <  
10 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18650913> >.  
11
- 12 MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. **Prog Neurobiol**, v. 57, n.  
13 1, p. 1-164, Jan 1999. ISSN 0301-0082 (Print)  
14 0301-0082 (Linking). Disponível em: <  
15 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9987804> >.  
16
- 17 MITROULIS, I. et al. Neutrophil extracellular trap formation is associated with IL-  
18 1beta and autophagy-related signaling in gout. **PLoS One**, v. 6, n. 12, p. e29318,  
19 2011. ISSN 1932-6203 (Electronic)  
20 1932-6203 (Linking). Disponível em: <  
21 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22195044> >.  
22
- 23 MITROULIS, I.; KAMBAS, K.; RITIS, K. Neutrophils, IL-1beta, and gout: is there a  
24 link? **Semin Immunopathol**, v. 35, n. 4, p. 501-12, Jul 2013. ISSN 1863-2300  
25 (Electronic)  
26 1863-2297 (Linking). Disponível em: <  
27 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23344781> >.  
28
- 29 MOAYEDI, M.; DAVIS, K. D. Theories of pain: from specificity to gate control. **J**  
30 **Neurophysiol**, v. 109, n. 1, p. 5-12, Jan 2013. ISSN 1522-1598 (Electronic)  
31 0022-3077 (Linking). Disponível em: <  
32 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23034364> >.  
33
- 34 MOGIL, J. S.; YU, L.; BASBAUM, A. I. Pain genes?: natural variation and transgenic  
35 mutants. **Annu Rev Neurosci**, v. 23, p. 777-811, 2000. ISSN 0147-006X (Print)  
36 0147-006X (Linking). Disponível em: <  
37 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10845081> >.  
38
- 39 NORLING, L. V.; PERRETTI, M. The role of omega-3 derived resolvins in arthritis.  
40 **Curr Opin Pharmacol**, v. 13, n. 3, p. 476-81, Jun 2013. ISSN 1471-4973 (Electronic)  
41 1471-4892 (Linking). Disponível em: <  
42 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23434193> >.  
43
- 44 NUKI, G.; SIMKIN, P. A. A concise history of gout and hyperuricemia and their  
45 treatment. **Arthritis Res Ther**, v. 8 Suppl 1, p. S1, 2006. ISSN 1478-6362  
46 (Electronic)  
47 1478-6354 (Linking). Disponível em: <  
48 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16820040> >.  
49

- 1 ORTEGA-GOMEZ, A.; PERRETTI, M.; SOEHNLEIN, O. Resolution of inflammation:  
2 an integrated view. **EMBO Mol Med**, v. 5, n. 5, p. 661-74, May 2013. ISSN 1757-  
3 4684 (Electronic)  
4 1757-4676 (Linking). Disponível em: <  
5 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23592557> >.  
6
- 7 PERRETTI, M.; D'ACQUISTO, F. Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the  
8 resolution of inflammation. **Nat Rev Immunol**, v. 9, n. 1, p. 62-70, Jan 2009. ISSN  
9 1474-1741 (Electronic)  
10 1474-1733 (Linking). Disponível em: <  
11 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19104500> >.  
12
- 13 PETRILLI, V. et al. Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low  
14 intracellular potassium concentration. **Cell Death Differ**, v. 14, n. 9, p. 1583-9, Sep  
15 2007. ISSN 1350-9047 (Print)  
16 1350-9047 (Linking). Disponível em: <  
17 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17599094> >.  
18
- 19 POPA-NITA, O. et al. Crystal-induced neutrophil activation. IX. Syk-dependent  
20 activation of class Ia phosphatidylinositol 3-kinase. **J Leukoc Biol**, v. 82, n. 3, p. 763-  
21 73, Sep 2007. ISSN 0741-5400 (Print)  
22 0741-5400 (Linking). Disponível em: <  
23 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17535983> >.  
24
- 25 QI, J. et al. Painful pathways induced by TLR stimulation of dorsal root ganglion  
26 neurons. **J Immunol**, v. 186, n. 11, p. 6417-26, Jun 1 2011. ISSN 1550-6606  
27 (Electronic)  
28 0022-1767 (Linking). Disponível em: <  
29 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21515789> >.  
30
- 31 RECCHIUTI, A. et al. MicroRNAs in resolution of acute inflammation: identification of  
32 novel resolvin D1-miRNA circuits. **FASEB J**, v. 25, n. 2, p. 544-60, Feb 2011. ISSN  
33 1530-6860 (Electronic)  
34 0892-6638 (Linking). Disponível em: <  
35 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20956612> >.  
36
- 37 REES, F.; HUI, M.; DOHERTY, M. Optimizing current treatment of gout. **Nat Rev**  
38 **Rheumatol**, v. 10, n. 5, p. 271-83, May 2014. ISSN 1759-4804 (Electronic)  
39 1759-4790 (Linking). Disponível em: <  
40 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24614592> >.  
41
- 42 REICHLING, D. B.; LEVINE, J. D. Critical role of nociceptor plasticity in chronic pain.  
43 **Trends Neurosci**, v. 32, n. 12, p. 611-8, Dec 2009. ISSN 1878-108X (Electronic)  
44 0166-2236 (Linking). Disponível em: <  
45 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19781793> >.  
46
- 47 RIBEIRO, R. A. et al. Role of resident mast cells and macrophages in the neutrophil  
48 migration induced by LTB4, fMLP and C5a des arg. **Int Arch Allergy Immunol**, v.  
49 112, n. 1, p. 27-35, Jan 1997. ISSN 1018-2438 (Print)

- 1 1018-2438 (Linking). Disponível em: <  
2 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8980461> >.  
3
- 4 ROCHA E SILVA, M. A brief survey of the history of inflammation. **Agents Actions**,  
5 v. 8, n. 1-2, p. 45-9, Jan 1978. ISSN 0065-4299 (Print)  
6 0065-4299 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/76437>  
7 >.  
8
- 9 SCHAUER, C. et al. Aggregated neutrophil extracellular traps limit inflammation by  
10 degrading cytokines and chemokines. **Nat Med**, v. 20, n. 5, p. 511-7, May 2014.  
11 ISSN 1546-170X (Electronic)  
12 1078-8956 (Linking). Disponível em: <  
13 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24784231> >.  
14
- 15 SCHLESINGER, N.; THIELE, R. G. The pathogenesis of bone erosions in gouty  
16 arthritis. **Ann Rheum Dis**, v. 69, n. 11, p. 1907-12, Nov 2010. ISSN 1468-2060  
17 (Electronic)  
18 0003-4967 (Linking). Disponível em: <  
19 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20705636> >.  
20
- 21 SCHMID-BURGK, J. L. et al. A Genome-wide CRISPR (Clustered Regularly  
22 Interspaced Short Palindromic Repeats) Screen Identifies NEK7 as an Essential  
23 Component of NLRP3 Inflammasome Activation. **J Biol Chem**, v. 291, n. 1, p. 103-9,  
24 Jan 1 2016. ISSN 1083-351X (Electronic)  
25 0021-9258 (Linking). Disponível em: <  
26 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26553871> >.  
27
- 28 SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. Can we conquer pain? **Nat Neurosci**, v. 5 Suppl, p.  
29 1062-7, Nov 2002. ISSN 1097-6256 (Print)  
30 1097-6256 (Linking). Disponível em: <  
31 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12403987> >.  
32
- 33 SERHAN, C. N. A search for endogenous mechanisms of anti-inflammation uncovers  
34 novel chemical mediators: missing links to resolution. **Histochem Cell Biol**, v. 122,  
35 n. 4, p. 305-21, Oct 2004. ISSN 0948-6143 (Print)  
36 0948-6143 (Linking). Disponível em: <  
37 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15322859> >.  
38
- 39 \_\_\_\_\_. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. **Nature**, v.  
40 510, n. 7503, p. 92-101, Jun 05 2014. ISSN 1476-4687 (Electronic)  
41 0028-0836 (Linking). Disponível em: <  
42 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24899309> >.  
43
- 44 SERHAN, C. N.; CHIANG, N.; DALLI, J. The resolution code of acute inflammation:  
45 Novel pro-resolving lipid mediators in resolution. **Semin Immunol**, v. 27, n. 3, p. 200-  
46 15, May 2015. ISSN 1096-3618 (Electronic)  
47 1044-5323 (Linking). Disponível em: <  
48 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25857211> >.  
49

- 1 SERHAN, C. N. et al. Lipid mediators in the resolution of inflammation. **Cold Spring**  
2 **Harb Perspect Biol**, v. 7, n. 2, p. a016311, Oct 30 2014. ISSN 1943-0264  
3 (Electronic)  
4 1943-0264 (Linking). Disponível em: <  
5 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25359497> >.  
6
- 7 SERHAN, C. N. et al. Novel functional sets of lipid-derived mediators with  
8 antiinflammatory actions generated from omega-3 fatty acids via cyclooxygenase 2-  
9 nonsteroidal antiinflammatory drugs and transcellular processing. **J Exp Med**, v. 192,  
10 n. 8, p. 1197-204, Oct 16 2000. ISSN 0022-1007 (Print)  
11 0022-1007 (Linking). Disponível em: <  
12 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11034610> >.  
13
- 14 SERHAN, C. N. et al. Macrophage proresolving mediator maresin 1 stimulates tissue  
15 regeneration and controls pain. **FASEB J**, v. 26, n. 4, p. 1755-65, Apr 2012. ISSN  
16 1530-6860 (Electronic)  
17 0892-6638 (Linking). Disponível em: <  
18 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22253477> >.  
19
- 20 SERHAN, C. N. et al. Resolvins: a family of bioactive products of omega-3 fatty acid  
21 transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter proinflammation  
22 signals. **J Exp Med**, v. 196, n. 8, p. 1025-37, Oct 21 2002. ISSN 0022-1007 (Print)  
23 0022-1007 (Linking). Disponível em: <  
24 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12391014> >.  
25
- 26 SERHAN, C. N.; PETASIS, N. A. Resolvins and protectins in inflammation resolution.  
27 **Chem Rev**, v. 111, n. 10, p. 5922-43, Oct 12 2011. ISSN 1520-6890 (Electronic)  
28 0009-2665 (Linking). Disponível em: <  
29 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21766791> >.  
30
- 31 SHI, H. et al. NLRP3 activation and mitosis are mutually exclusive events  
32 coordinated by NEK7, a new inflammasome component. **Nat Immunol**, v. 17, n. 3, p.  
33 250-8, Mar 2016. ISSN 1529-2916 (Electronic)  
34 1529-2908 (Linking). Disponível em: <  
35 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26642356> >.  
36
- 37 SO, A. K.; MARTINON, F. Inflammation in gout: mechanisms and therapeutic targets.  
38 **Nat Rev Rheumatol**, v. 13, n. 11, p. 639-647, Nov 2017. ISSN 1759-4804  
39 (Electronic)  
40 1759-4790 (Linking). Disponível em: <  
41 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28959043> >.  
42
- 43 SREERAMKUMAR, V. et al. Neutrophils scan for activated platelets to initiate  
44 inflammation. **Science**, v. 346, n. 6214, p. 1234-8, Dec 5 2014. ISSN 1095-9203  
45 (Electronic)  
46 0036-8075 (Linking). Disponível em: <  
47 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25477463> >.  
48
- 49 TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern recognition receptors and inflammation. **Cell**, v.  
50 140, n. 6, p. 805-20, Mar 19 2010. ISSN 1097-4172 (Electronic)

- 1 0092-8674 (Linking). Disponível em: <  
2 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20303872> >.  
3
- 4 TODD, A. J. Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. **Nat Rev**  
5 **Neurosci**, v. 11, n. 12, p. 823-36, Dec 2010. ISSN 1471-0048 (Electronic)  
6 1471-003X (Linking). Disponível em: <  
7 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21068766> >.  
8
- 9 TURK, J. L. Inflammation: John Hunter's "A treatise on the blood, inflammation and  
10 gun-shot wounds". **Int J Exp Pathol**, v. 75, n. 6, p. 385-95, Dec 1994. ISSN 0959-  
11 9673 (Print)  
12 0959-9673 (Linking). Disponível em: <  
13 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7734328> >.  
14
- 15 VERRI, W. A., JR. et al. IL-15 mediates immune inflammatory hypernociception by  
16 triggering a sequential release of IFN-gamma, endothelin, and prostaglandin. **Proc**  
17 **Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 25, p. 9721-5, Jun 20 2006. ISSN 0027-8424 (Print)  
18 0027-8424 (Linking). Disponível em: <  
19 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16766656> >.  
20
- 21 WANG, C. S. et al. ALX/FPR2 Modulates Anti-Inflammatory Responses in Mouse  
22 Submandibular Gland. **Sci Rep**, v. 6, p. 24244, Apr 11 2016. ISSN 2045-2322  
23 (Electronic)  
24 2045-2322 (Linking). Disponível em: <  
25 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27064029> >.  
26
- 27 WIECH, K. et al. Influence of prior information on pain involves biased perceptual  
28 decision-making. **Curr Biol**, v. 24, n. 15, p. R679-81, Aug 4 2014. ISSN 1879-0445  
29 (Electronic)  
30 0960-9822 (Linking). Disponível em: <  
31 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25093555> >.  
32
- 33 WOOLF, C. J.; SALTER, M. W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain.  
34 **Science**, v. 288, n. 5472, p. 1765-9, Jun 9 2000. ISSN 0036-8075 (Print)  
35 0036-8075 (Linking). Disponível em: <  
36 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10846153> >.  
37
- 38 WRIGHT, H. L. et al. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases.  
39 **Rheumatology (Oxford)**, v. 49, n. 9, p. 1618-31, Sep 2010. ISSN 1462-0332  
40 (Electronic)  
41 1462-0324 (Linking). Disponível em: <  
42 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20338884> >.  
43
- 44 XU, Z. Z.; JI, R. R. Resolvins are potent analgesics for arthritic pain. **Br J**  
45 **Pharmacol**, v. 164, n. 2, p. 274-7, Sep 2011. ISSN 1476-5381 (Electronic)  
46 0007-1188 (Linking). Disponível em: <  
47 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21418190> >.  
48

- 1 XU, Z. Z. et al. Resolvins RvE1 and RvD1 attenuate inflammatory pain via central  
2 and peripheral actions. **Nat Med**, v. 16, n. 5, p. 592-7, 1p following 597, May 2010.  
3 ISSN 1546-170X (Electronic)  
4 1078-8956 (Linking). Disponível em: <  
5 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20383154> >.  
6
- 7 YARON, J. R. et al. K(+) regulates Ca(2+) to drive inflammasome signaling: dynamic  
8 visualization of ion flux in live cells. **Cell Death Dis**, v. 6, p. e1954, Oct 29 2015.  
9 ISSN 2041-4889 (Electronic). Disponível em: <  
10 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26512962> >.  
11
- 12 ZARPELON, A. C. et al. IL-33/ST2 signalling contributes to carrageenin-induced  
13 innate inflammation and inflammatory pain: role of cytokines, endothelin-1 and  
14 prostaglandin E2. **Br J Pharmacol**, v. 169, n. 1, p. 90-101, May 2013. ISSN 1476-  
15 5381 (Electronic)  
16 0007-1188 (Linking). Disponível em: <  
17 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23347081> >.  
18  
19  
20

1 **3 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO (PHARMACOLOGICAL REASEARCH)**

2

3 O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Dor, Inflamação,  
4 Neuropatia e Câncer, da Universidade Estadual de Londrina e segue as normas da  
5 revista *Pharmacological Research*. Os resultados parciais estão descritos no artigo  
6 intitulado “Resolvin D1 ameliorates MSU-induced gouty arthritis by targeting NLRP3  
7 inflammasome assembly and IL-1 $\beta$  maturation”.

1 **Resolvin D1 ameliorates MSU-induced gouty arthritis by targeting NLRP3 inflammasome**  
2 **assembly and IL-1 $\beta$  maturation**

3 Tiago H. Zaninelli<sup>1</sup>, Stephanie Badaro-Garcia<sup>1</sup>, Victor Fattori<sup>1</sup>, Larissa Staurengo-Ferrari<sup>1</sup>,  
4 Mariana M. Bertozzi<sup>1</sup>, Ana C. Rossaneis Guidoni<sup>1</sup>, Sergio Marques Borghi<sup>1</sup>, Rubia Casagrande<sup>2</sup>  
5 and Waldiceu A. Verri Jr.<sup>1,\*</sup>

6  
7 <sup>1</sup>Departamento de Ciências Patológicas, Universidade Estadual de Londrina-UEL, Rod. Celso  
8 Garcia Cid, km 380, PR 445, 86057-970, Cx. Postal 10.011, Londrina, Paraná, Brazil.

9 <sup>2</sup>Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Londrina-UEL, Avenida  
10 Robert Koch, 60, Hospital Universitário, 86038-350, Londrina, Paraná, Brazil.

11

12 \* Author to whom correspondence should be addressed. Waldiceu A. Verri Jr. Departamento de  
13 Ciências Patológicas, Universidade Estadual de Londrina-UEL, Rod. Celso Garcia Cid, km 380,  
14 PR 445, 86057-970, Cx. Postal 10.011, Londrina, Paraná, Brazil. Fax: +55 43 33714387, Tel:  
15 +55 43 33714979, E-mail address: waldiceujr@yahoo.com.br; waverri@uel.br.

## 1 **Abstract**

2 Gouty arthritis is characterized by an intense inflammatory response to monosodium urate  
3 crystals (MSU), which induces severe pain. Current therapies are often ineffective in reducing  
4 gout related pain. Resolvin D1 (RvD1) is a specialized pro-resolving mediator (SPM) derived  
5 from  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid (DHA) with anti-inflammatory and  
6 analgesic proprieties. Thus, the aim of this work was to evaluate the protective effects of RvD1  
7 on experimental gouty arthritis *in vivo* and *in vitro*. Mice were treated with RvD1 (0.3, 3 or 30  
8 ng/animal) or vehicle (3.2% ethanol in saline) 0.5 h before MSU intra-articular injections  
9 (100 $\mu$ g/knee). In other set of experiments, mice were treated with RvD1 (3 ng/animal) or vehicle,  
10 72, 48, 24 or 0.5 h before MSU injection. We observed that RvD1 inhibited MSU-induced  
11 mechanical hyperalgesia in a time-dependent manner. RvD1 also reduced MSU-induced  
12 leukocytes recruitment, synovitis, pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  production *in*  
13 *vivo*. *In vitro*, RvD1 reduced IL-1 $\beta$  maturation on the supernatant of BMDM, indicating the  
14 inhibition of inflammasome activation. Furthermore, RvD1 reduces MSU-induced NF- $\kappa$ B  
15 activation, inflammasome components mRNA (*Nlrp3*, *Asc*, *Pro-caspase-1* and *Pro-il-1 $\beta$* ) and  
16 protein (NLRP3 and ASC) expression levels *in vitro*. Therefore, RvD1 is effective an anti-  
17 inflammatory and analgesic SPM in the MSU-induced gouty arthritis animal model.

18

19 **Key words:** gouty arthritis, SPM, NLRP3 inflammasome, inflammation resolution

## 1 **1. Introduction**

2 Gouty arthritis is the most common case of inflammatory arthritis, and is considered one  
3 of the most painful acute conditions [1, 2]. Epidemiologically, the incidence and prevalence of  
4 gout have increased numbers in both developed and developing countries [3]. Gout is caused by  
5 increased levels of uric acid (hyperuricaemia) resulting in the formation and deposition of  
6 monosodium urate (MSU) crystal on articular and periarticular tissues [4]. The recognition of  
7 MSU crystals by macrophages evokes neutrophils recruitment [5], intense production of pro-  
8 inflammatory mediators [6] and excruciating pain [7]. This prototypical inflammatory disease  
9 physiopathology lay on NLRP3 inflammasome engagement, activation and its IL-1 $\beta$ -mediated  
10 maturation [8, 9]. The pro-inflammatory cytokine IL-1 $\beta$  is the main character on the  
11 development of MSU-induced inflammation and pain.

12 Despite, gouty arthritis is self-limited in human (up to 10 days), if left untreated, the  
13 continued MSU deposition can induce joint damage, movement limitation, and increases the  
14 probability of acute flares [10] [2]. The management of gout consists in urate-lowering therapies  
15 and control of acute flares. In fact, the main reason for patients to seek medical care is the intense  
16 and debilitating pain during acute flares [11]. Currently, steroidal and non-steroidal anti-  
17 inflammatories, colchicine and biological agents are used in the control of gout flares [2].  
18 However, these drugs lack safety in some patients conditions, offers side effects, present high  
19 cost and offered non-satisfactory analgesic effects [11]. Therefore, novel analgesic drugs are still  
20 needed to the treatment of gout.

21 Resolvin D1 (7S,8R,17S-trihydroxy-4Z,9E,11E,13Z,15E,19Z-docosahexaenoic acid,  
22 RvD1) is an specialized pro-resolving mediator (SPM) derived from  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty  
23 acid docosahexaenoic acid metabolism [12]. This SPM orchestrates the resolution process

1 actively [13]. Among SPMs molecules, E and D-series Resolvins, Protectins and Maresins have  
2 potent anti-inflammatory and analgesic proprieties already described in experimental murine  
3 models [14]. In particular, RvD1 carrageenan- and complete Freund's (CFA)-induced  
4 inflammatory pain and formalin-induced overt pain like behaviors [15]. Moreover, in a model of  
5 adjuvant-induced arthritis, mice also display reduced inflammation and pain after treatment with  
6 RvD1 [16]. Furthermore, there are evidences of RvD1 targeting NF- $\kappa$ B activation and thereby  
7 reducing pro-inflammatory mediators production, such as TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-1 $\beta$  [17-19].  
8 Moreover, isolated RvE1 reaches clinical trials as RX-10045<sup>®</sup> for dry eye syndrome, and  
9 produces dose-dependent improvements [20]. Thus, RvD1 is a promising candidate in the relive  
10 of gouty arthritis related pain and inflammatory features. Therefore, in this study, we aim to  
11 evaluate the efficacy of RvD1 in MSU-induced acute gouty arthritis in mice.

12

## 13 **2. Material and Methods**

### 14 ***2.1. Experimental Procedures***

15 Mice were treated with RvD1 (0.3, 3, or 30ng, animal, i.p.) or vehicle (3.2% ethanol in  
16 saline) 0.5 h before intra-articular injections of MSU (100  $\mu$ g/10  $\mu$ L, i.a.). Mechanical  
17 hyperalgesia and edema were evaluated 1, 3, 5, 7, and 15 h after MSU stimulus. Based on these  
18 results, mice were treated with RvD1 3ng or vehicle 72, 24, 48, or 0.5 h before gouty arthritis  
19 induction. Mechanical hyperalgesia was evaluated 1, 3, 5, 7, and 15 h after intra-articular  
20 stimulus. Founded on these previous experiments, the dose of 3 ng and pre-treatment time of 72  
21 h were chosen for the following experiments: leukocyte migration to knee joint,  
22 histopathological analysis (HE staining) and cytokines measurement by ELISA. For *in vitro*  
23 analysis, bone marrow-derived macrophages (BMDMs) were treated with RvD1 (1-100 pM)

1 after 500 ng/mL LPS (*i.e.* after signal 1). Supernatant was collected 5h after MSU (450 µg/mL)  
2 stimulation (signal 2). IL-1β levels were measured by ELISA. Based on previously *in vitro*  
3 results, RvD1 at 100 pM was chosen for the following experiments: *Nlrp3*, *Asc*, *Pro-caspase-1*,  
4 and *pro-il-1β* mRNA expression by RT-qPCR, NF-κB activation by ELISA and NLRP3 and  
5 ASC protein levels by western blotting.

6

## 7 **2.2. Animals**

8 Male Swiss (25-30 g), C57BL/6 (20-25 g) mice from Universidade Estadual de Londrina  
9 (Londrina, Paraná, Brazil) and LysM-eGFP (20-25 g) mice from University of Sao Paulo -  
10 Ribeirao Preto Medical School (Ribeirao Preto, Sao Paulo, Brazil), were used in this study. All  
11 mice were housed in standard clear cages with free access to food and water, light/dark cycle of  
12 12/12h and temperature of 21°±1°C. All behavioral testing was performed between 9 a.m. and 5  
13 p.m. in a temperature-controlled room. Animal care and handling procedures were approved by  
14 Universidade Estadual de Londrina Ethics Committee (process number 22186.2016.37) and were  
15 in accordance with the International Association for Study of Pain (IASP) guidelines. All efforts  
16 were made to minimize the number of animal used and their suffering.

17

## 18 **2.3. Chemicals and Drugs**

19 Materials were obtained from the following sources: Uric acid (Sigma, Saint Louis,  
20 Missouri, USA) and 17(S)-Resolvin D1 (7S,8R,17S-trihydroxy-4Z,9E,11E,13Z,15E,19Z-  
21 docosahexaenoic) (Cayman Chemicals, Ann Arbor, Michigan, USA).

22

23

#### 1        ***2.4. MSU Crystal preparation and Induction of MSU-induced knee inflammation***

2            MSU crystals were prepared as previously described [21]. Briefly, 800 mg of uric acid  
3 were dissolved in 155 mL of boiling water containing 5 mL of 1 N NaOH. The pH was adjusted  
4 to 7.2 and the solution was gradually cooled by stirring at room temperature. The crystals were  
5 collected by centrifugation (3000g, 2 min at 4°C), drayed, sterilized by heating at 180°C for 2h  
6 and stored at sterile environment until use. The joint inflammation was induced by the intra-  
7 articular (i.a.) administration of MSU (100 µg/10 µL) into the right knee joint of mice under  
8 isoflurane anesthesia. Control animals received an i.a. injection of sterile saline (10µL) [22].

#### 9 10        ***2.5. Evaluation of knee joint hyperalgesia and edema***

11            The mechanical hyperalgesia of femur-tibial joint was evaluated by an electronic von  
12 Frey apparatus. Mice were placed in acrylic cages with a wire grid floor, and the stimulations  
13 were performed only when the animals were quiet and with the four paws on the grid floor. This  
14 method consists of an electronic pressure-meter, with force transducer fitted with polypropylene  
15 tip (Insight instruments, Ribeirao Preto, SP, Brazil). To evaluate knee joint pain it was used a  
16 large tip (4.15 mm<sup>2</sup>), to exclude subcutaneous effect [23]. An increase perpendicular force was  
17 applied to the central area of the plantar surface of the hind paw to induce flexion of femur-tibial  
18 joint followed by hind paw withdrawal. A digital analgesimeter recorded the intensity of the  
19 force applied (in grams) when the paw was withdrawal. The test was performed at the times 1, 3,  
20 5, 7, and 15 h. The investigators were blinded to the treatment groups. The results are expressed  
21 as withdrawal mechanical threshold in grams.

22            Keen joint edema was assessed with a dial thickness gauge caliper (Mitutoyo) before  
23 (zero time), and after MSU intra-articular injections at the times 1, 3, 5, 7, and 15 h. The edema

1 was determined for each mouse knee joint by the difference between the times indicated and zero  
2 time. The results are expressed as  $\Delta$ mm/joint.

3

#### 4 ***2.6. In vivo leukocyte migration***

5 The knee joint wash was collected 15h after MSU injection for determination of  
6 leucocyte recruitment [24]. In brief, articular cavities were wash 3 times with 3.3  $\mu$ L of saline  
7 with 1mM EDTA, then diluted to a final volume of 50  $\mu$ L with PBS/EDTA to evaluate leukocyte  
8 migration. The total number of leukocytes was determined in a Neubauer chamber diluted in  
9 Turk's solution 1:2 (use to lyse the erythrocytes). Differential cell counts (mononuclear and  
10 polymorphonuclear) were determined in Rosenfeld stained slides using a light microscope. The  
11 results are expressed in number of cells per cavity.

12

#### 13 ***2.7. Histopathological analysis.***

14 Knee joint was collected 15h after MSU injection, fixed with 10% paraformaldehyde in  
15 PBS, and then decalcified and embedded in paraffin for histological analysis. The paraffin  
16 sections were stained with hematoxylin and eosin for conventional morphological evaluation.  
17 Leukocytes were counted from photomicrograph at 40x amplification ( $2048 \times 1536$  pixels) using  
18 ImageJ Software (NIH) count tool with size (120-800 pixels<sup>2</sup>) and circularity (0.50 – 1.00)  
19 exclusion parameters. Results are expressed as leukocytes infiltrate (cell/field) counted at the  
20 inflammatory foci.

21

#### 22 ***2.8. Fluorescence assay***

1           Knee joint wash of LysM-eGFP mice was collected in sterile slides 15 h after MSU  
2 injection into the knee joints. DAPI fluorescent stain (ThermoFisher, MA, USA) was added to  
3 slides for localization of nucleus in each sample. The representative images and quantitative  
4 analysis were performed using a confocal microscope (SP8, Leica, Microsystems, Mannheim,  
5 Germany).

6

### 7           ***2.9. Preparation of bone marrow-derived macrophages (BMDMs) and inflammasome*** 8           ***activation assay***

9           Femora and tibiae of C57BL/6 mice (8 weeks old) were aspirated with RPMI  
10 1640 media. Bone marrow cells were cultured in RPMI 1640 medium containing 10% FBS and  
11 15% L929 cell conditioned medium. BMDM were stimulated with 500 ng/mL of  
12 lipopolysaccharide (LPS) from *Escherichia coli* (Santa Cruz Biotechnology, California, USA)  
13 and 3h later treated with 450 µg/mL of MSU to stimulate NLRP3 inflammasome activation  
14 (16407889). BMDMs were treated with RvD1 1-100 pM 0.5 h before MSU stimulation.  
15 Supernatant was collected 5 h after MSU stimulation. Based on previous experiments, BMDMs  
16 were incubated with LPS followed by RvD1 (100 pM) treatment 0.5 h before MSU stimulation.  
17 Cell lysate was collected for RT-qPCR and western blot analysis. Lactate dehydrogenase (LDH)  
18 release in the supernatant was used as marker of cellular viability.

19

### 20           ***2.10. Reverse transcription and quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR)***

21           BMDMs were collected 5h after MSU administration and homogenized in the TRIzol<sup>®</sup>  
22 reagent. Total RNA was isolated according to manufacturer's instructions. The purity of total  
23 RNA was measured with a spectrophotometer and the wavelength absorption ratio (260/280 nm)

1 was between 1.8 and 2.0 for all preparation. Reverse transcription of total RNA to cDNA and  
 2 qPCR were carried out using GoTaq<sup>®</sup> 2-step RT-qPCR System (Promega) and specific primers  
 3 (Applied Biosystems<sup>®</sup>). The mRNA level of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*Gapdh*)  
 4 was used as reference gene. The primers used were *Gapdh* forward: CAT ACC AGG AAA TGA  
 5 GCT TG, reverse: ATG ACA TCA AGA AGG TGG TG; *Nlrp3*, forward: AGC TAT GAG GTG  
 6 GTG ATG TTA GTG G, reverse: CAC AAT ATT TGT ACC AGA CAG ACT TGA G; *Asc*,  
 7 forward: ATG GGG CGG GCA CGA GAT G, reverse: GCT CTG CTC CAG GTC CAT CAC;  
 8 *Pro-caspase-1*: forward: TGG TCT TGT GAC TTG GAG GA, reverse: TGG CTT CTT ATT  
 9 GGC ACG AT; *Pro-il-1 $\beta$* , forward: GAA ATG CCA CCT TTT GAC AGT G, reverse: TGG  
 10 ATG CTC TCA TCA GGA CAG; *Alx/fpr2*, forward: CAC AGG AAC CGA AGA GTG TAA G,  
 11 reverse: CAC CAT TGA GAG GAT CCA CAG.

12

### 13 **2.11. Cytokine measurement**

14 Knee joint samples were homogenized in 500  $\mu$ L of buffer containing protease inhibitors.  
 15 Samples were centrifuged (3000 rpm  $\times$  15 min  $\times$  4°C). IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  levels were determined  
 16 from the supernatant by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), using eBioscience kits  
 17 (Thermo Fisher Scientific, Vienna, Austria). The results are expressed as pictograms (pg) of  
 18 cytokine/g of tissue.

19

### 20 **2.12. NF- $\kappa$ B activation**

21 BMDMs were collected in ice-cold lyses buffer (Cell Signaling Technologies, Beverly,  
 22 Massachusetts, USA). The homogenates were centrifuged (16,100 g  $\times$  10 min  $\times$  4°C) and the  
 23 supernatants used to assess the levels of total and phosphorylated NF- $\kappa$ B p65 subunit by ELISA

1 using PathSacr kitd #7836 and #7834, respectively (Cell Signaling Technologies, Beverly,  
2 Massachusetts, USA). The results represent the sample ratio (phospho-p-65/total p65) measured  
3 at 450 nm (Multiskan GO Microplate Spectrophotometer, Thermo Scientific, Vantaa, Finland).

4

### 5 **2.13. Western Blot assay**

6 BMDMs cells were collected in ice-cold PBS centrifuged ( $400g \times 5 \text{ min} \times 4^{\circ}\text{C}$ ) and  
7 resuspended in ice-cold RIPA buffer (Sigma, Saint Louis, Missouri, USA) containing protease  
8 and phosphatase inhibitors (Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA). The  
9 lysates were homogenized and prepared for SDS-PAGE separation. Next, separated proteins  
10 were transferred onto a nitrocellulose membrane (GE Healthcare-Amersham, Pittsburgh,  
11 Pennsylvania, USA). Membranes were then incubated in blocking buffer (5% BSA in Tris-  
12 buffered saline [TBS] and 0.1% Tween 20), followed by incubation of primary antibodies (3%  
13 BSA in Tris-buffered saline and 0.1% Tween 20) overnight, under agitation at  $4^{\circ}\text{C}$ . The  
14 antibodies and conditions were:  $\beta$ -actin (1:200, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA),  
15 NLRP3 (1:500, Novus Biologicals, Littleton, Colorado, USA), ASC (1:500, Novus Biologicals,  
16 Littleton, Colorado, USA). After, the membranes were washed in TBS and incubated with  
17 secondary antibodies for 2h at room temperature. The antibodies and conditions were: goat anti-  
18 mouse IgG-HRP (1:2500, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA) and goat anti-rabbit  
19 IgG-HRP (1:2500, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA). Proteins were  
20 visualized by chemiluminescence with ECL reagent (GE Healthcare-Amersham, Pittsburgh,  
21 Pennsylvania, USA). The same membrane was re-probed with antibody against  $\beta$ -actin or  
22 protein of interest at most twice. The results are expressed as IOD ratio between protein of  
23 interest and  $\beta$ -actin.

## 1        **2.14. Data analysis**

2            Data were analyzed using GraphPad Prism statistical software (GraphPad Software, Inc.,  
3        USA-500.288, version 7.0). Results are presented as means  $\pm$ SEM of measurements made on 6  
4        mice/samples per group per experiment and are representative of two independent experiments.  
5        Two-way ANOVA was used to compare the groups and does at all times when the parameters  
6        were measured at different times after the stimulus injection. The analyzed factors were  
7        treatments, time, and time versus treatment interaction. One-way ANOVA followed by Tukey's  
8        test was performed for each time-point.  $P < 0.05$  was considered significant.

9

## 10      **3. Results**

### 11      **3.1. RvD1 reduced MSU-induced mechanical hyperalgesia and edema.**

12            Firstly, it was addressed whether or not RvD1 could reduce MSU-induced mechanical  
13        hyperalgesia and edema. MSU injections induced mechanical hyperalgesia (Fig. 1A) and edema  
14        (Fig. 1B) at all evaluated time points. Treatment with RvD1 at 0.3, 3, or 30 ng/animal  
15        significantly reduced MSU-induced edema (Fig. 1B). The doses of 3 and 30 ng/animal reduced  
16        MSU-induced mechanical hyperalgesia without differences (Fig. 1A). Evidence demonstrates  
17        that the analgesic effect of RvD1 last four days after a single treatment [25]. Thus, next we  
18        addressed whether or not the effect of the treatment with RvD1 at 3 ng/animal would be time  
19        dependent. Mice were treated with RvD1 (3ng/animal), 72h, 48h, 24h, or 30 min before MSU  
20        injection. The dose of 3 ng/animal of RvD1 and the 72h pre-treatment were able to inhibit  
21        mechanical hyperalgesia with statistical differences when compared with other pre-treatment  
22        time points. The vehicle (3.2% ethanol in saline) showed no effect. Thus, the dose of 3 ng/animal  
23        (i.p.) and 72h pre-treatment were selected for the next experiments.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22

### **3.2. RvD1 reduces MSU-induced leukocyte recruitment to the knee joint.**

Leucocytes recruitment to the knee joint is a hallmark of rheumatic diseases [20]. Thus, it was next investigated the effect of RvD1 in MSU-induced leukocyte recruitment and synovitis. The treatment with RvD1 reduced MSU-induced recruitment of total leukocyte (Fig. 2A), neutrophil (Fig. 3B) and mononuclear cells (Fig. 3C). Furthermore, RvD1 also reduced inflammatory infiltrate as observed in the histopathological analysis (Fig. 3) and neutrophils fluorescence assay (Supplementary Fig. 1).

### **3.3. RvD1 modulates *in vivo* and *in vitro* MSU-induced IL-1 $\beta$ production and NF- $\kappa$ B activation.**

The effect of RvD1 on MSU-induced cytokines production was investigated *in vivo* and *in vitro*, considering the importance of cytokines to gouty arthritis [20]. Given that one of RvD1 receptor is lipoxin A4/formyl peptide receptor 2 (ALX/FPR2) and it is present in mice [26], it was addressed whether or not MSU stimuli increases or decreases *Alx/fpr2* mRNA expression, *in vitro*. MSU (450  $\mu$ g/mL) treatment on BMDM increases *Alx/fpr2* mRNA, significantly (Fig. 5A). Treatment with RvD1 decreased levels of IL-1 $\beta$  (Fig. 4A) and TNF- $\alpha$  (Fig. 4B) *in vivo*. Given IL-1 $\beta$  production is one of the main event of gout arthritis and its depends on 2 signals [8], we next investigated whether or not RvD1 reduces IL-1 $\beta$  production by targeting MSU-induced inflammasome activation, *in vitro*. We observed that RvD1 (1, 10 and 100 pM) reduced both MSU-induced IL-1 $\beta$  maturation (Fig. 5B) and NF- $\kappa$ B activation (Fig. 6) in LPS-primed BMDM (*e.g.* after signal 1). Importantly, none of the concentrations of RvD1 used reduced cell viability

1 as per LDH release analysis (Fig. 5C). The concentration of 100 pM was selected for the next  
2 experiments, due to an intense inhibition of IL-1 $\beta$  release.

3

### 4 **3.4. RvD1 reduces MSU-induced *Nlrp3*, *Asc*, *pro-Caspase-1*, and *pro-il-1 $\beta$* mRNA, and** 5 **NLRP3 and ASC protein levels.**

6 Gouty arthritis physiopathology has NLRP3 inflammasome assembly as pivotal  
7 mechanism. Given that RvD1 reduced *in vivo* and *in vitro* IL-1 $\beta$  production, the effect of RvD1  
8 on the mRNA expression and proteins levels of inflammasome components *Nlrp3*, *Asc*, *Pro-*  
9 *caspace-1* and Pro-il-1 $\beta$  were investigated *in vitro*. BMDMs treated with RvD1 (100 pM)  
10 showed reduced mRNA expression of all inflammasome components *Nlrp3* (Fig. 7A), *Asc* (Fig.  
11 7D), *Pro-caspase-1* (Fig. 7G) and Pro-il-1 $\beta$  (Fig. 7H). Further, RvD1 treatment also diminished  
12 MSU-induced protein levels of inflammasome components NLRP3 (Fig. 7B, C) e ASC (Fig. 7E,  
13 F), indicating that RvD1 reduces both mRNA and protein levels of inflammasome components.

14

## 15 **4. Discussion**

16 In this study, we show that the SPM RvD1 ameliorates experimental gouty arthritis in  
17 mice. Treatment with RvD1 reduced MSU-induced mechanical hyperalgesia, knee joint edema,  
18 leukocytes recruitment to the knee joint, and maturation of IL-1 $\beta$ . This effect is likely due to the  
19 reduction of both mRNA and protein levels of NLRP3 inflammasome.

20 Currently, the management of gout acute flares consists in the use of NSAIDs, colchicine,  
21 glucocorticoids and biological agents [2]. However, these drugs must be used with caution in  
22 patients with comorbidities (NSAIDs), often causes severe side effects (NSAIDs, colchicine, and  
23 corticoids), present high cost (biological agents), or possess non-satisfactory analgesic effects in

1 some patients [11]. Recently, studies have shown the potential of SPMs in actively orchestrate  
2 the resolution of inflammation [27]. Herein, we demonstrate that RvD1 have analgesic and anti-  
3 inflammatory proprieties thought modulation of NF- $\kappa$ B and NLRP3 inflammasome activation,  
4 and IL-1 $\beta$  release.

5 Compelling evidence has demonstrated not only the endogenous role of SPMs in the  
6 regulation of acute inflammatory process but also the efficacy of these isolated SPMs [20].  
7 Evidence demonstrated that other SPMs such as maresin 1 present an effect that increases over  
8 time and last for many days in neuropathic pain [28]. Moreover, single intrathecal treatment with  
9 RvD1 before development of hyperalgesia reduces post-incisional-induced pain during 10 days  
10 and during 30 days in a model of skin/muscle incision and retraction surgery-induced pain [25].  
11 On the other hand, treatment with RvD1 in later time points in these models presents little or no  
12 analgesic effect [25]. These data indicate that some lipid mediators may present time-dependent  
13 efficacy. Given that, we sought that increasing the pre-treatment time could improve the  
14 analgesic effect of RvD1 in this model as well. In fact, we demonstrated that 72h pre-treatment  
15 increases, significantly, its analgesic and anti-inflammatory effect in a MSU-induced acute gout  
16 arthritis, indicating that these SPMs may possess time-dependent efficacy.

17 The NLRP3 inflammasome activation and IL-1 $\beta$  maturation and release are the pivotal  
18 innate immune events of gouty arthritis [2, 8, 9]. The assembly of NLRP3 and the cleavage of  
19 pro-IL-1 $\beta$  are followed by an inflammatory burst elicited by IL-1 $\beta$ /IL-1R1 axis in multiple  
20 cellular types [5]. This mechanism consists of an auto-amplification loop that account for  
21 neutrophils recruitment, NF- $\kappa$ B activation and other macrophages-derived mediators [2, 9, 29].  
22 All these factors together are responsible for nociceptive neurons sensitization and gouty arthritis  
23 unbearable pain [30-32]. Despite macrophage plays an important role in gout pathophysiology,

1 neutrophil recruitment is a hallmark of rheumatic diseases [20] and are the predominant cell  
2 population on synovial fluid during gout flares [33]. Neutrophils, upon MSU crystal recognition  
3 degranulate [34] and undergo NETosis [35]. Furthermore, activated neutrophils also produce  
4 pro-inflammatory mediators (PGE<sub>2</sub>, endothelin-1, IL-1 $\beta$ , and TNF- $\alpha$ ) that amplify the  
5 inflammatory response and elicit pain. Moreover, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  themselves directly activate  
6 nociceptive neurons [32, 36]. In this work, we show that RvD1 reduced MSU-induced IL-1 $\beta$ , and  
7 TNF- $\alpha$  production *in vivo* and IL-1 $\beta$  maturation *in vitro*. The reduction of those pro-  
8 inflammatory cytokines certainly contributed to the inhibition of neutrophils recruitment to the  
9 knee joint and thereby to the analgesic effect of this SPM.

10 In terms of mechanisms, two signals are required for the maturation of IL-1 $\beta$  [8]. Signal 1  
11 or priming, is related to NF- $\kappa$ B activation and its downstream pathways, culminating in the  
12 expression of all inflammasome components (NLRP3, ASC, pro-CASPASE-1) and pro-IL-1 $\beta$ .  
13 Signal 2 or activation, is triggered by MSU crystals phagocytosis, lyses of phagolysosome and  
14 NLRP3 inflammasome activation by cathepsin release [8]. Herein, we demonstrate that RvD1  
15 (100 pM) modulates both signal 1 (NF-  $\kappa$ B activation) and signal 2 (inflammasome assembly *per*  
16 *se*) even after priming with LPS [2]. Our data corroborates with other studies on which RvD1  
17 reduces NF- $\kappa$ B activation *in vitro* (signal 1) [18, 19, 37, 38]. RvD1 interacts with PI3K/AKT  
18 signaling pathway, reducing AKT activity and in consequence decreasing NF- $\kappa$ B activation [39].  
19 Therefore, a possible explanation by which we observed reduction of NF-  $\kappa$ B activation after  
20 signal 1 lies in capacity of RvD1 targeting molecules upstream to its signaling pathway. In the  
21 present study, the decrease in NF- $\kappa$ B activation result in the reduction of NLRP3 inflammasome  
22 components mRNA expression (as observed by RT-qPCR) and proteins levels (as observed by  
23 Western blot), and consequently reduction of IL-1 $\beta$  maturation. Moreover, RvD1 action on AKT

1 contributes to the reduction of the auto-amplification loop mediated by IL-1 $\beta$ /IL-1R1 signaling  
2 pathway in the activation of NF- $\kappa$ B. Another role of RvD1 in decrease NF- $\kappa$ B activation lay on  
3 the PPAR- $\gamma$ /NF- $\kappa$ B pathway [40]. RvD1 treatment in a murine model of LPS-induced acute lung  
4 injury suppressed I $\kappa$ B $\alpha$  degradation and NF- $\kappa$ B activation and translocation to the nucleus in a  
5 PPAR- $\gamma$ -dependent manner [18]. In fact, RvD1 is essential for PPAR- $\gamma$ -mediated analgesia in a  
6 model of postincisional pain [41]. Although, this signaling pathway was not addressed in this  
7 study, this mechanism also could explain the MSU-induced NF- $\kappa$ B inhibition and analgesic  
8 outcome. Our results corroborates previous data showing intravitreal injections of RvD1 (1000  
9 ng/kg) reduces NF- $\kappa$ B and NLRP3 inflammasome activation in a streptozotocin-induced diabetic  
10 retinopathy model in rat [38]. Similarly, hyperhomocysteinemia-induced inflammasome  
11 activation and kidney injury were reduced by RvD1 treatment, proposing inflammasome as  
12 novel therapy target [42]. In addition, we demonstrate that RvD1's receptor, ALX/FPR2, mRNA  
13 expression increases with MSU stimulus *in vitro*. Thus, this finding may support SPM's  
14 effectiveness, even in low concentrations, to inflammation resolution and inflammatory pain  
15 relieve.

16

## 17 **5. Conclusion**

18 In this study we demonstrated that RvD1 ameliorates MSU-induced pain and  
19 inflammation. RvD1 reduced MSU-induced inflammasome assembly and NF- $\kappa$ B activation. As a  
20 consequence, it was observed a reduction of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  production along with the  
21 reduction of neutrophil recruitment to the knee joint *in vivo*; and IL-1 $\beta$  maturation *in vitro*.  
22 Importantly, RvD1 does not alter cellular viability. Thus, we show that RvD1 present analgesic  
23 and anti-inflammatory properties in a murine model of MSU-induced gout arthritis with a safe

1 pre-clinical profile. Given there is data demonstrating the efficacy of omega-3 fatty acids PUFAs  
2 in rheumatic diseases and the fact that present therapeutic effectiveness in pictograms [20]; it is  
3 possible that isolated SPMs such as RvD1 can be a novel possibility in the management of gouty  
4 arthritis acute flares.

5

## 6 **Conflict of interest**

7 Authors declare no conflict of interest.

8

## 9 **Acknowledgements**

10 This work was supported by Programa para o Sistema Único de Saúde (PPSUS) grant  
11 supported by Departamento de Ciência e Tecnologia da Secretaria de Ciência, Tecnologia e  
12 Insumos Estratégicos, Ministério da Saúde (Decit/SCTIE/MS, Brazil) intermediated by Conselho  
13 Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil) with support of  
14 Fundação Araucária and Secretaria Estadual de Saúde, Paraná (SESA-PR, Brazil); São Paulo  
15 Research Foundation under grant agreements 2011/19670-0 (Thematic Project) and 2013/08216-  
16 2 (Center for Research in Inflammatory Disease); Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal  
17 de Nível Superior (CAPES, Brazil); and Financiadora de Estudos e Projetos and Secretaria de  
18 Estado da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior do Paraná under grant agreements  
19 01.12.0294.00 (0476/11) (FINEP/SETI-PR, Brazil). ACRG and SMB received CNPq Post-Doc  
20 fellowship.

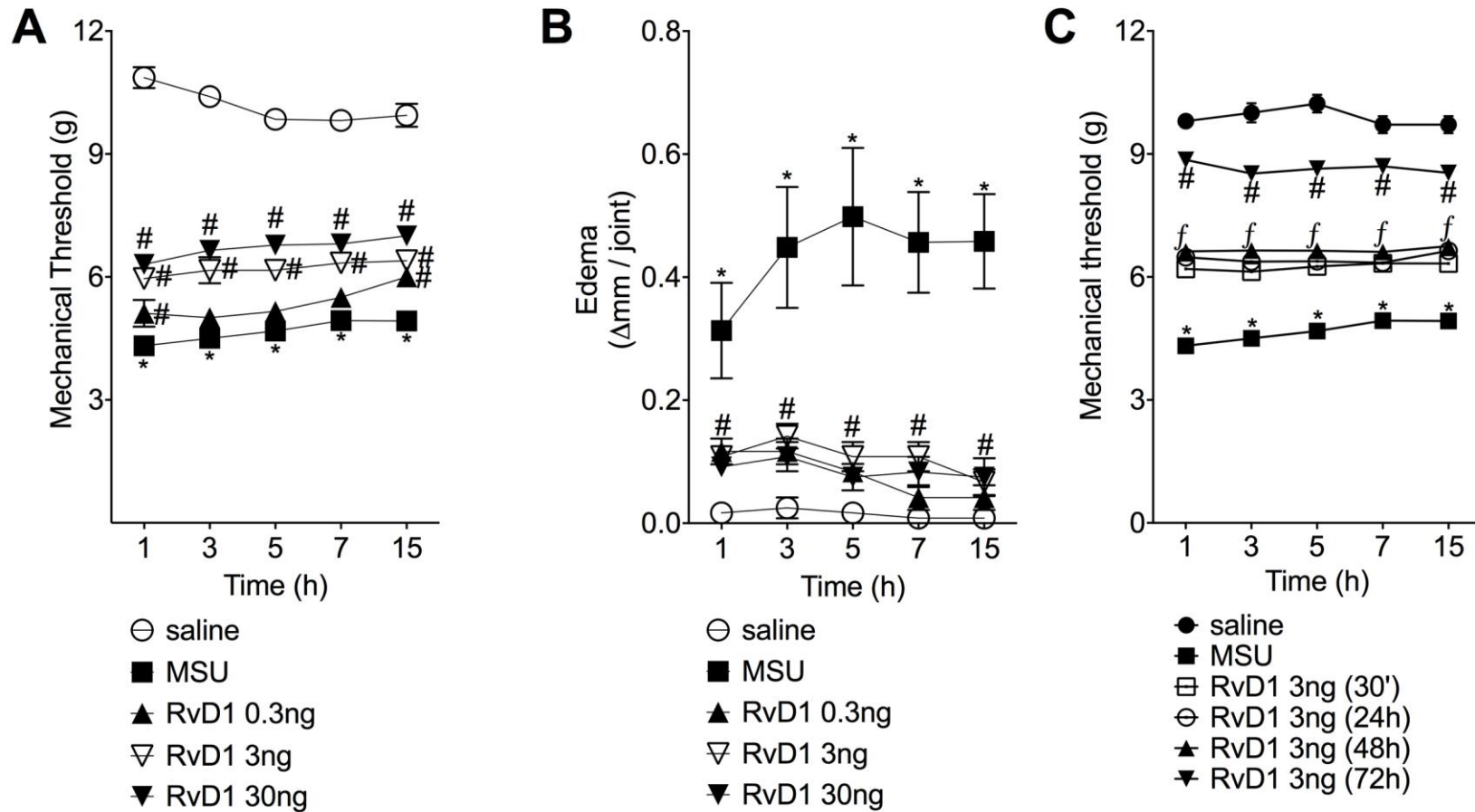
## 21 **References**

- 22 1. Martinon, F. and L.H. Glimcher, *Gout: new insights into an old disease*. J Clin Invest, 2006. **116**(8): p. 2073-5.
- 24 2. So, A.K. and F. Martinon, *Inflammation in gout: mechanisms and therapeutic targets*. Nat Rev Rheumatol, 2017. **13**(11): p. 639-647.
- 25

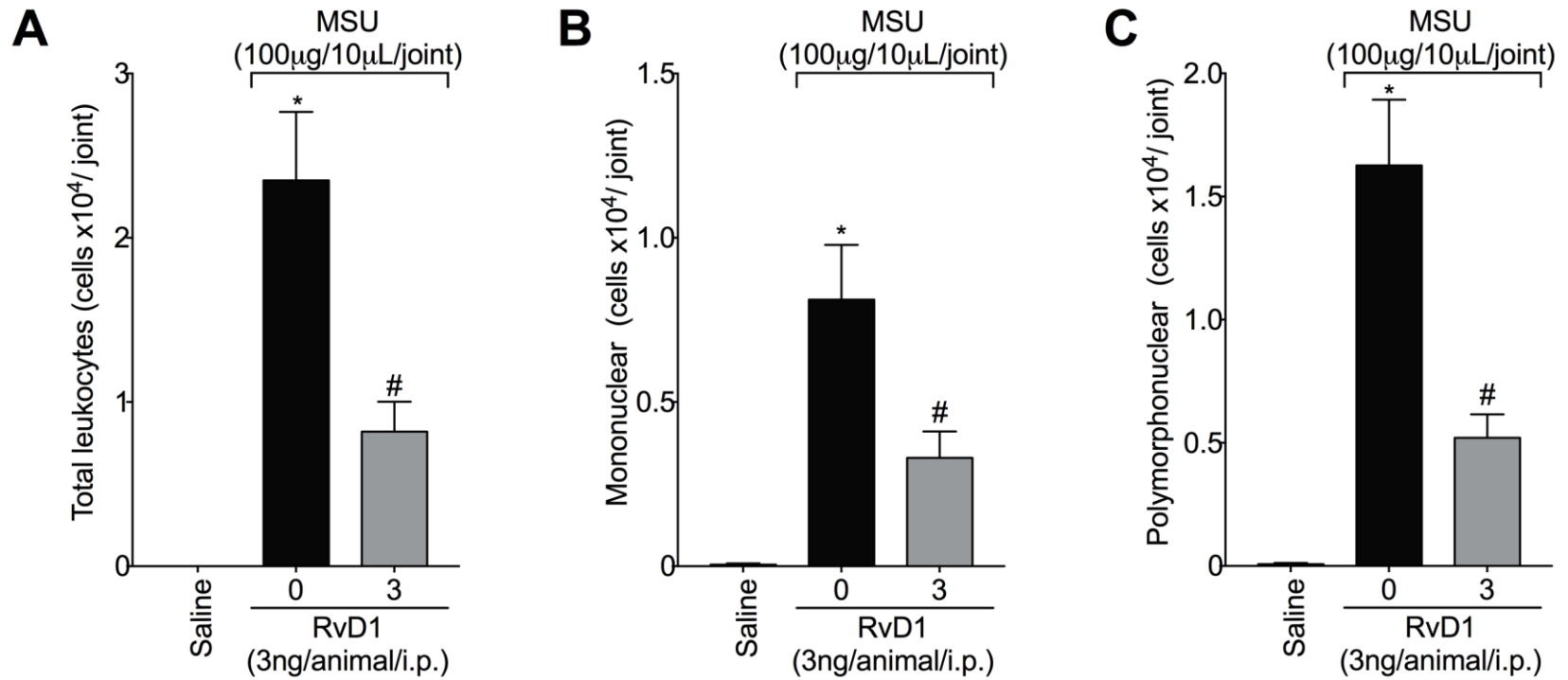
- 1 3. Kuo, C.F., et al., *Global epidemiology of gout: prevalence, incidence and risk factors*.  
2 Nat Rev Rheumatol, 2015. **11**(11): p. 649-62.
- 3 4. Dalbeth, N. and D.O. Haskard, *Mechanisms of inflammation in gout*. Rheumatology  
4 (Oxford), 2005. **44**(9): p. 1090-6.
- 5 5. Dinarello, C.A., *Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family*.  
6 Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 519-50.
- 7 6. McGonagle, D. and M.F. McDermott, *A proposed classification of the immunological*  
8 *diseases*. PLoS Med, 2006. **3**(8): p. e297.
- 9 7. Faires, J.S., Maccarty, Daniel J. Jr., *Acute arthritis in man and dog after intrasynovial*  
10 *injection of sodium urate crystals*. The Lancet, 1962. **280**(7258): p. 682-685.
- 11 8. Martinon, F., et al., *Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3*  
12 *inflammasome*. Nature, 2006. **440**(7081): p. 237-41.
- 13 9. Amaral, F.A., et al., *NLRP3 inflammasome-mediated neutrophil recruitment and*  
14 *hypernociception depend on leukotriene B(4) in a murine model of gout*. Arthritis  
15 Rheum, 2012. **64**(2): p. 474-84.
- 16 10. Schlesinger, N. and R.G. Thiele, *The pathogenesis of bone erosions in gouty arthritis*.  
17 Ann Rheum Dis, 2010. **69**(11): p. 1907-12.
- 18 11. Rees, F., M. Hui, and M. Doherty, *Optimizing current treatment of gout*. Nat Rev  
19 Rheumatol, 2014. **10**(5): p. 271-83.
- 20 12. Bannenberg, G. and C.N. Serhan, *Specialized pro-resolving lipid mediators in the*  
21 *inflammatory response: An update*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1801**(12): p. 1260-  
22 73.
- 23 13. Serhan, C.N., N. Chiang, and T.E. Van Dyke, *Resolving inflammation: dual anti-*  
24 *inflammatory and pro-resolution lipid mediators*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(5): p.  
25 349-61.
- 26 14. Ji, R.R., et al., *Emerging roles of resolvins in the resolution of inflammation and pain*.  
27 Trends Neurosci, 2011. **34**(11): p. 599-609.
- 28 15. Xu, Z.Z., et al., *Resolvins RvE1 and RvD1 attenuate inflammatory pain via central and*  
29 *peripheral actions*. Nat Med, 2010. **16**(5): p. 592-7, 1p following 597.
- 30 16. Xu, Z.Z. and R.R. Ji, *Resolvins are potent analgesics for arthritic pain*. Br J Pharmacol,  
31 2011. **164**(2): p. 274-7.
- 32 17. Benabdoune, H., et al., *The role of resolvin D1 in the regulation of inflammatory and*  
33 *catabolic mediators in osteoarthritis*. Inflamm Res, 2016. **65**(8): p. 635-45.
- 34 18. Liao, Z., et al., *Resolvin D1 attenuates inflammation in lipopolysaccharide-induced*  
35 *acute lung injury through a process involving the PPARgamma/NF-kappaB pathway*.  
36 Respir Res, 2012. **13**: p. 110.
- 37 19. Krishnamoorthy, S., et al., *Resolvin D1 binds human phagocytes with evidence for*  
38 *proresolving receptors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(4): p. 1660-5.
- 39 20. Fattori, V., F.A. Amaral, and W.A. Verri, Jr., *Neutrophils and arthritis: Role in disease*  
40 *and pharmacological perspectives*. Pharmacol Res, 2016. **112**: p. 84-98.
- 41 21. Nishimura, A., et al., *Attenuation of monosodium urate crystal-induced arthritis in*  
42 *rabbits by a neutralizing antibody against interleukin-8*. J Leukoc Biol, 1997. **62**(4): p.  
43 444-9.
- 44 22. Ruiz-Miyazawa, K.W., et al., *Quercetin inhibits gout arthritis in mice: induction of an*  
45 *opioid-dependent regulation of inflammasome*. Inflammopharmacology, 2017.

- 1 23. Guerrero, A.T., et al., *Hypernociception elicited by tibio-tarsal joint flexion in mice: a*  
2 *novel experimental arthritis model for pharmacological screening.* Pharmacol  
3 Biochem Behav, 2006. **84**(2): p. 244-51.
- 4 24. Verri, W.A., Jr., et al., *IL-33 induces neutrophil migration in rheumatoid arthritis and is*  
5 *a target of anti-TNF therapy.* Ann Rheum Dis, 2010. **69**(9): p. 1697-703.
- 6 25. Huang, L., et al., *Enduring prevention and transient reduction of postoperative pain by*  
7 *intrathecal resolvin D1.* Pain, 2011. **152**(3): p. 557-65.
- 8 26. Chiang, N. and C.N. Serhan, *Structural elucidation and physiologic functions of*  
9 *specialized pro-resolving mediators and their receptors.* Mol Aspects Med, 2017. **58**:  
10 p. 114-129.
- 11 27. Serhan, C.N., *Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology.* Nature,  
12 2014. **510**(7503): p. 92-101.
- 13 28. Serhan, C.N., et al., *Macrophage proresolving mediator maresin 1 stimulates tissue*  
14 *regeneration and controls pain.* FASEB J, 2012. **26**(4): p. 1755-65.
- 15 29. Amaral, F.A., et al., *Transmembrane TNF-alpha is sufficient for articular inflammation*  
16 *and hypernociception in a mouse model of gout.* Eur J Immunol, 2016. **46**(1): p. 204-  
17 11.
- 18 30. Verri, W.A., Jr., et al., *Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for*  
19 *analgesic drug development?* Pharmacol Ther, 2006. **112**(1): p. 116-38.
- 20 31. Samad, T.A., et al., *Interleukin-1beta-mediated induction of Cox-2 in the CNS*  
21 *contributes to inflammatory pain hypersensitivity.* Nature, 2001. **410**(6827): p. 471-  
22 5.
- 23 32. Binshtok, A.M., et al., *Nociceptors are interleukin-1beta sensors.* J Neurosci, 2008.  
24 **28**(52): p. 14062-73.
- 25 33. Mitroulis, I., K. Kambas, and K. Ritis, *Neutrophils, IL-1beta, and gout: is there a link?*  
26 *Semin Immunopathol*, 2013. **35**(4): p. 501-12.
- 27 34. Popa-Nita, O., et al., *Crystal-induced neutrophil activation. IX. Syk-dependent*  
28 *activation of class Ia phosphatidylinositol 3-kinase.* J Leukoc Biol, 2007. **82**(3): p. 763-  
29 73.
- 30 35. Mitroulis, I., et al., *Neutrophil extracellular trap formation is associated with IL-1beta*  
31 *and autophagy-related signaling in gout.* PLoS One, 2011. **6**(12): p. e29318.
- 32 36. Jin, X. and R.W.t. Gereau, *Acute p38-mediated modulation of tetrodotoxin-resistant*  
33 *sodium channels in mouse sensory neurons by tumor necrosis factor-alpha.* J Neurosci,  
34 2006. **26**(1): p. 246-55.
- 35 37. Wu, B., et al., *Perivascular delivery of resolvin D1 inhibits neointimal hyperplasia in a*  
36 *rat model of arterial injury.* J Vasc Surg, 2017. **65**(1): p. 207-217 e3.
- 37 38. Yin, Y., et al., *Resolvin D1 inhibits inflammatory response in STZ-induced diabetic*  
38 *retinopathy rats: Possible involvement of NLRP3 inflammasome and NF-kappaB*  
39 *signaling pathway.* Mol Vis, 2017. **23**: p. 242-250.
- 40 39. Gilbert, K., et al., *Resolvin D1 Reduces Infarct Size Through a Phosphoinositide 3-*  
41 *Kinase/Protein Kinase B Mechanism.* J Cardiovasc Pharmacol, 2015. **66**(1): p. 72-9.
- 42 40. Ricote, M., et al., *The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative*  
43 *regulator of macrophage activation.* Nature, 1998. **391**(6662): p. 79-82.
- 44 41. Saito, T., et al., *Resolution of Inflammation by Resolvin D1 Is Essential for Peroxisome*  
45 *Proliferator-activated Receptor-gamma-mediated Analgesia during Postincisional*  
46 *Pain Development in Type 2 Diabetes.* Anesthesiology, 2015. **123**(6): p. 1420-34.

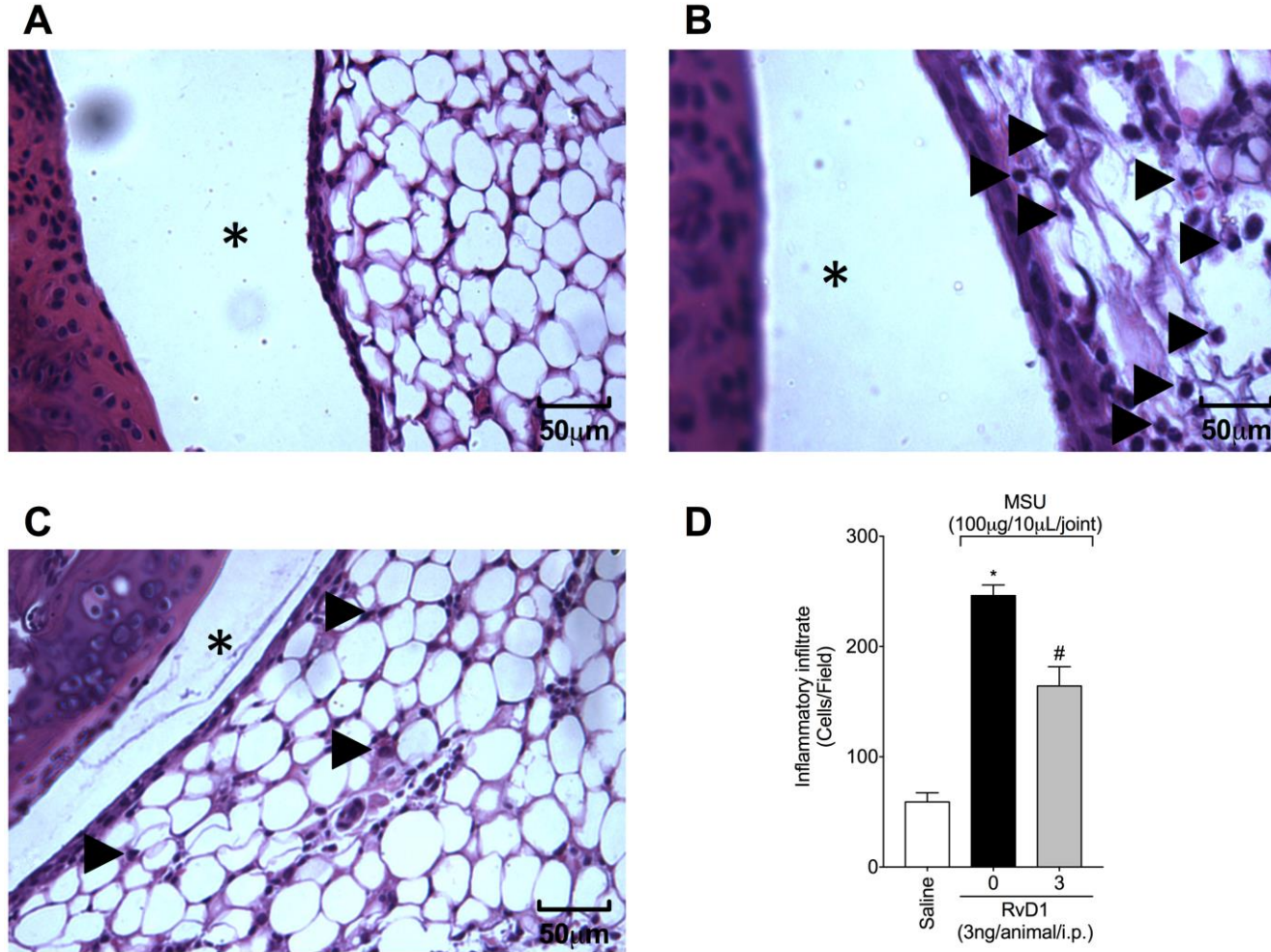
- 1 42. Li, G., et al., *NLRP3 inflammasome as a novel target for docosahexaenoic acid*  
2 *metabolites to abrogate glomerular injury*. J Lipid Res, 2017. **58**(6): p. 1080-1090.  
3



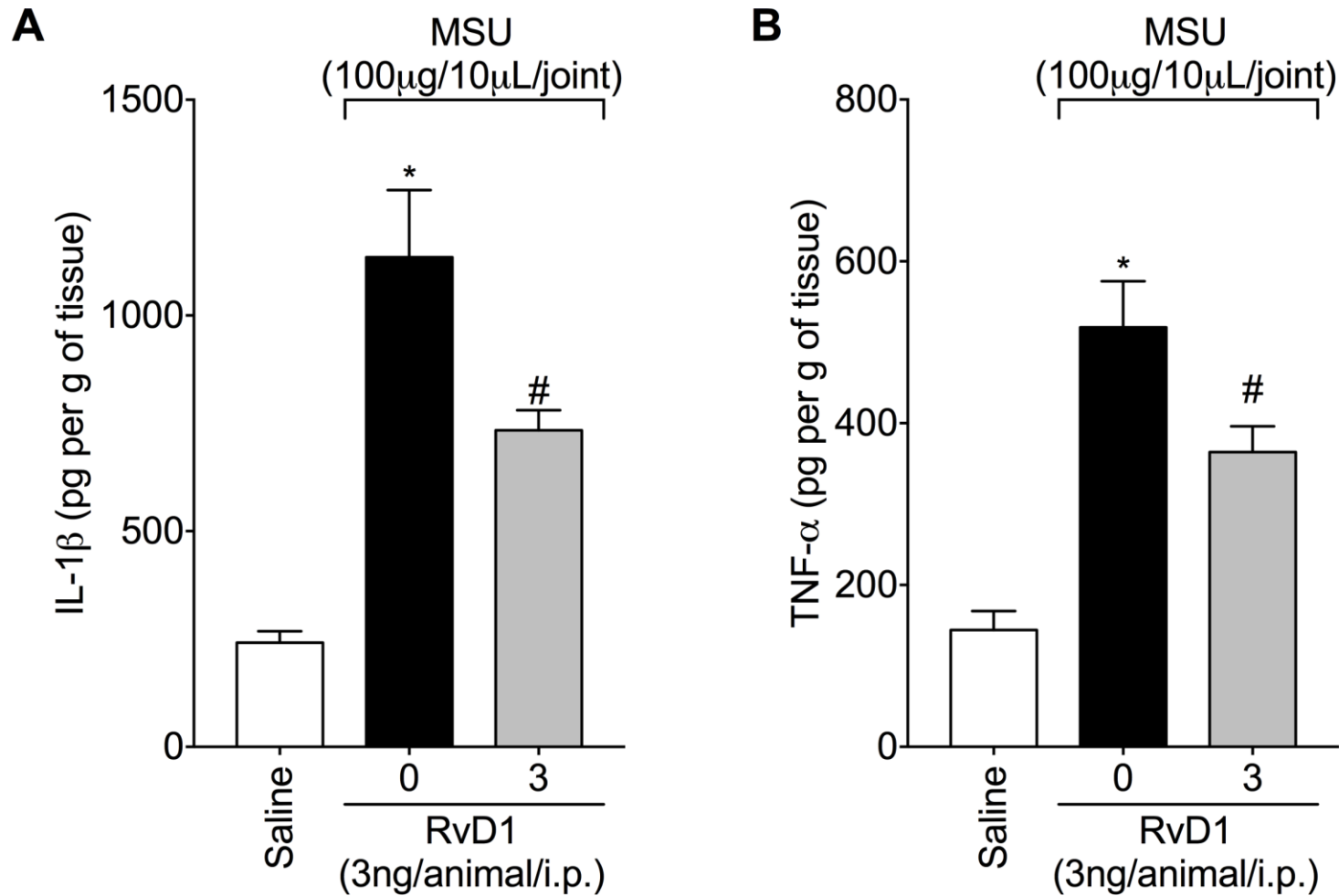
**Figure 1. RvD1 reduced MSU-induced mechanical hyperalgesia and edema in a dose and time-dependent manner.** Mechanical hyperalgesia (A) and edema (B) were evaluated 1, 3, 5, 7 and 15 h after MSU injection. Mechanical hyperalgesia (C) was evaluated 1, 3, 5, 7 and 15 h from mice pre-treated (0.5, 24, 48 and 72 h) with RvD1. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM,  $n = 6$  mice per group per experiment, two independent experiments (\* $p < 0.05$  vs. control group; # $p < 0.05$  vs. 0 ng group, two-way ANOVA followed by Tukey's post-test).



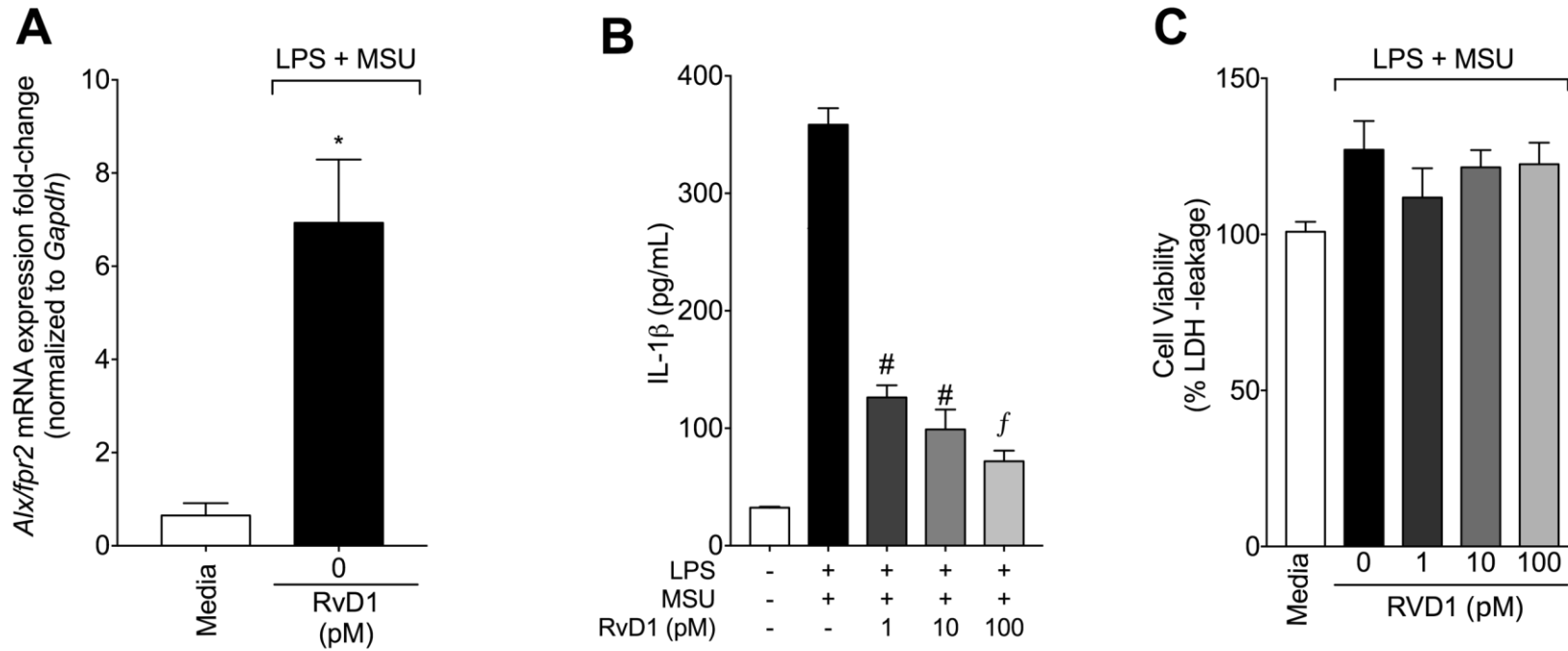
**Figure 2. RvD1 reduced MSU-induced leukocyte recruitment.** Fifteen hours after MSU, knee joint wash was collected for count total leukocytes (A), neutrophils (B), and mononuclear cells (C). Results are expressed as mean  $\pm$  SEM,  $n = 6$  mice per group per experiment, two independent experiments (\* $p < 0.05$  vs. control group; # $p < 0.05$  vs. 0 ng group, one-way ANOVA followed by Tukey's post-test).



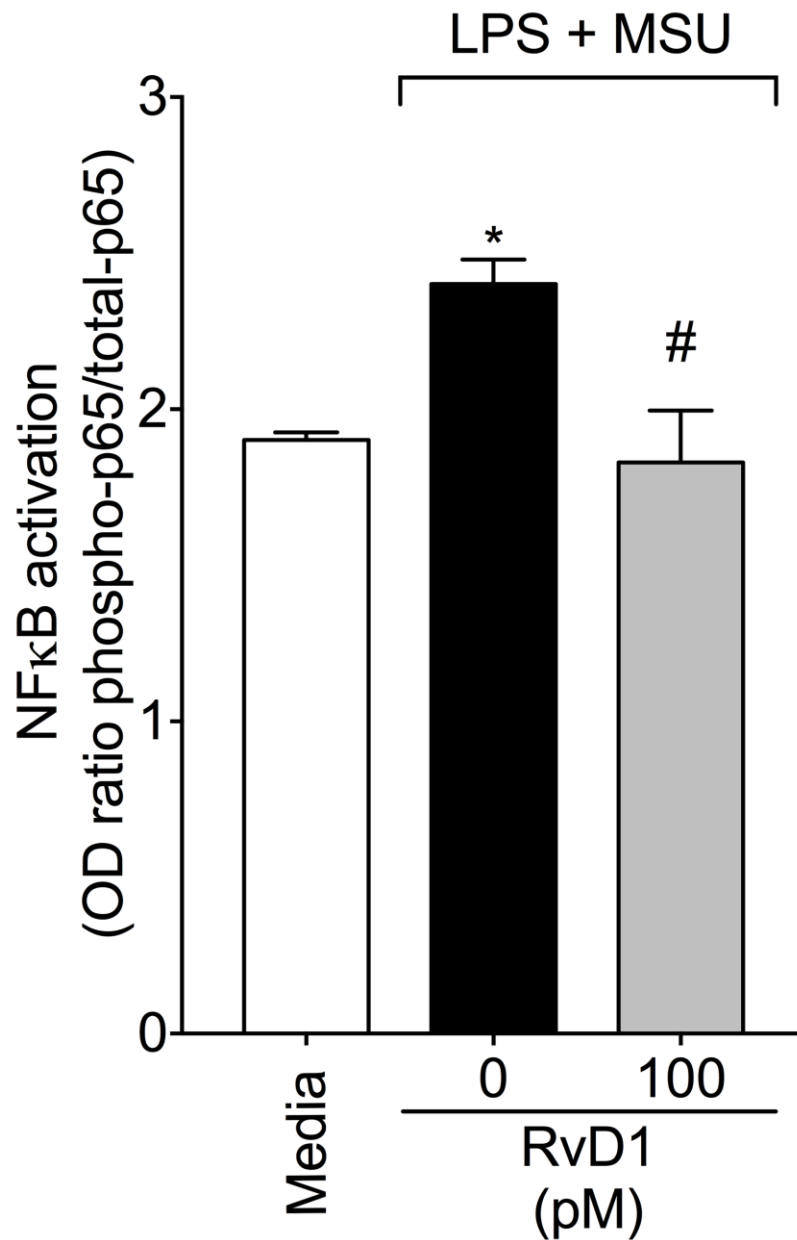
**Figure 3. RvD1 reduced MSU-induced synovitis.** Fifteen hours after MSU injection, knee joint was collected for histopathological analysis by HE staining. Original magnification 400x. Panel D shows the total score of inflammatory infiltrate. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM, n = 6 mice per 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). \* intra-articular space; arrow-head – inflammatory infiltrate.



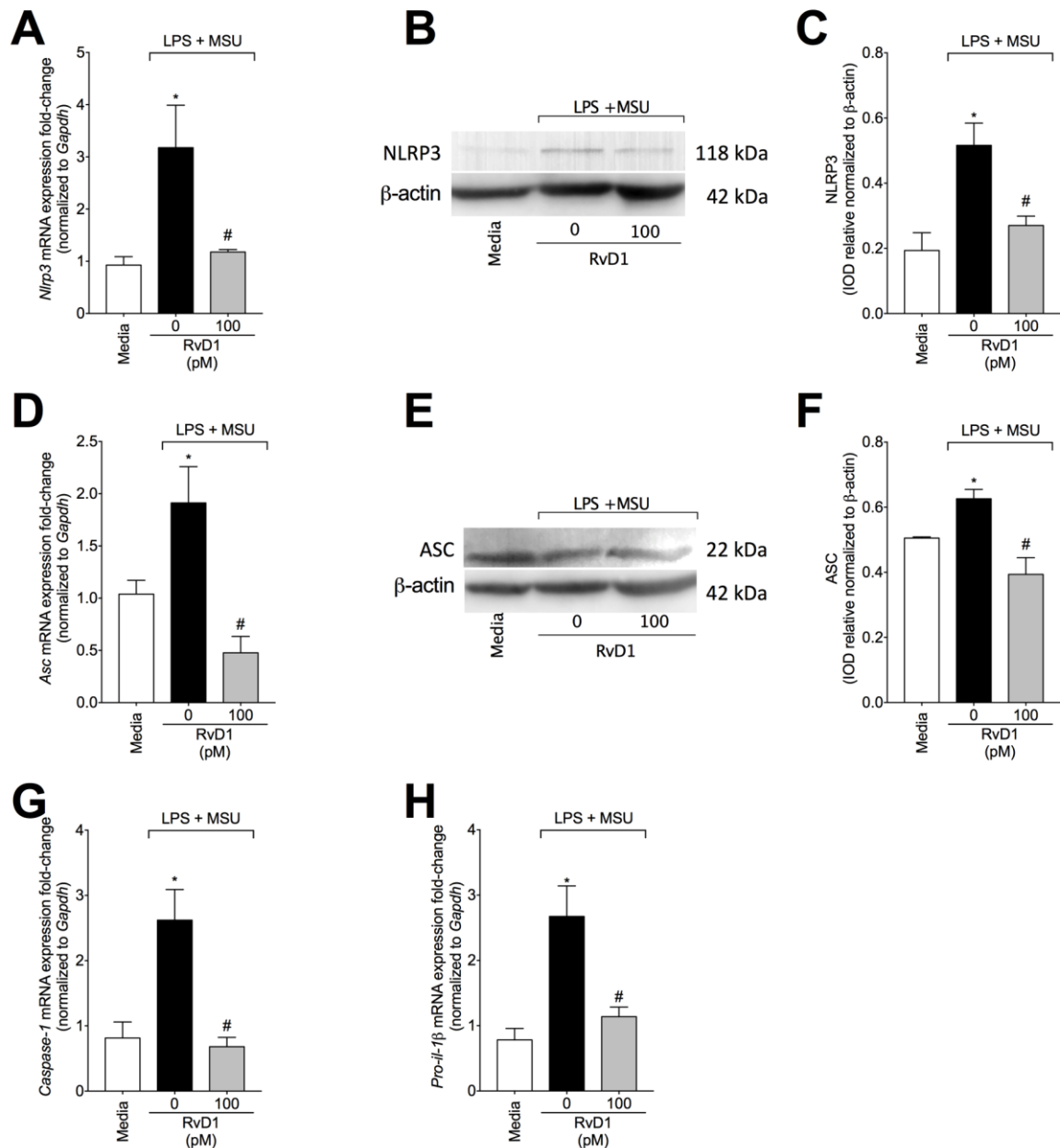
**Figure 4. RvD1 modulates MSU-induced cytokine production *in vivo*.** Fifteen hours after MSU injection, knee joint was collected for the determination of IL-1 $\beta$  (A) and TNF- $\alpha$  (B) production by ELISA. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM, n = 6 mice per group per experiment, two independent experiments (\*p<0.05 vs. control group; #p<0.05 vs. 0 ng group, one-way ANOVA followed by Tukey's post-test).



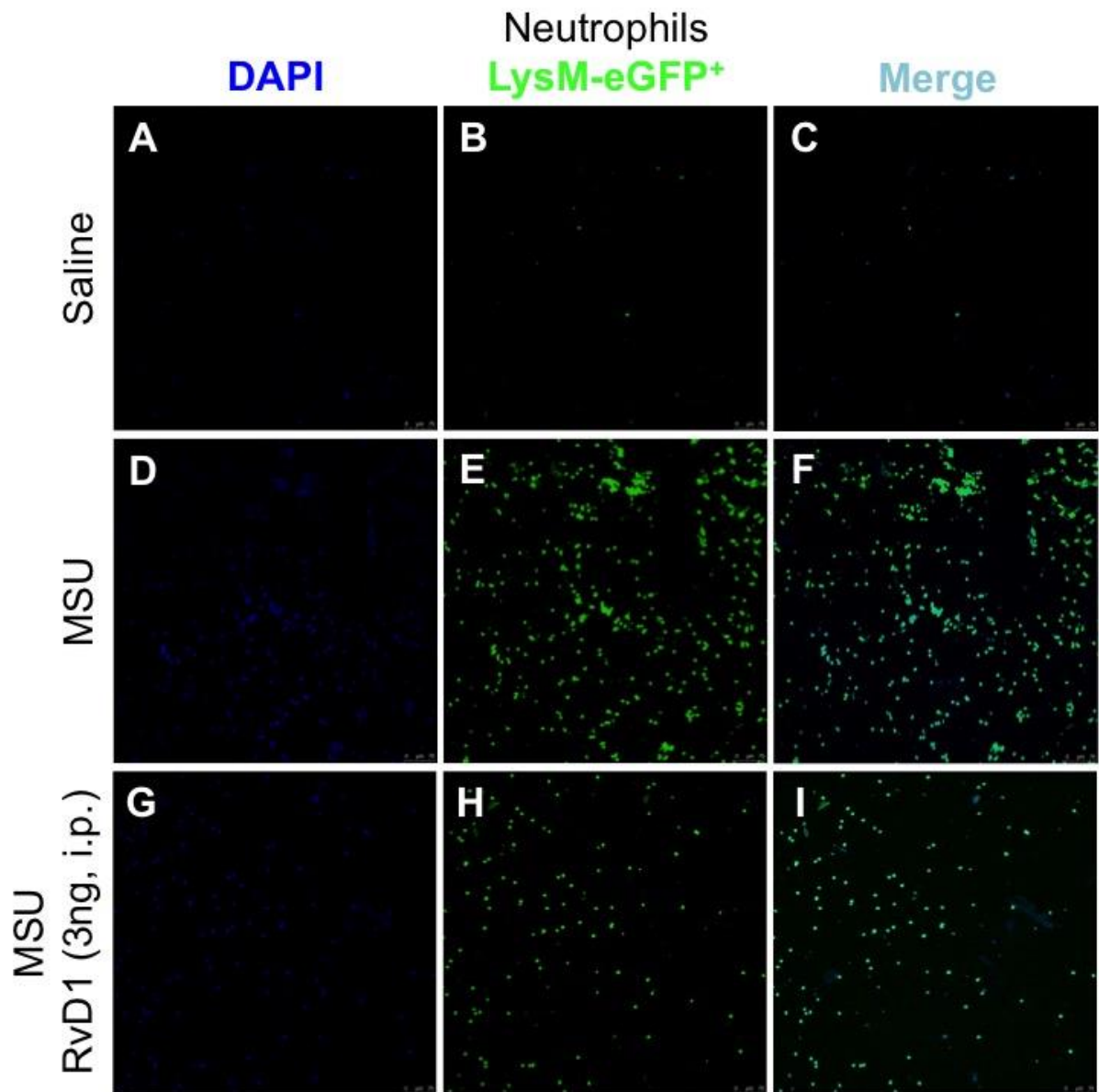
**Figure 5. MSU increased Alx/fpr2 mRNA expression and RvD1 reduces MSU-induced IL-1 $\beta$  maturation *in vitro*.** MSU increases RvD1's receptor, ALX/FPR2, mRNA expression (A). To evaluate the effect of RvD1 on inflammasome activation, LPS-primed BMDMs were treated with RvD1 at 1-100 pM 0.5 h before MSU stimulation (e.g. after signal 1). Supernatants were collected 5h after MSU activation and IL-1 $\beta$  (B) levels were quantified by ELISA. LDH assay (C) was performed to assess cell viability. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM, n = 6 culture wells per group per experiment, two independent experiments (\*p<0.05 vs. control group; # p<0.05 vs. 0 ng group, f p<0.05 vs. 1 ng and 10 ng group, one-way ANOVA followed by Tukey's post-test).



**Figure 6. RvD1 reduced MSU-induced NF-κB activation *in vitro*.** To evaluate the effect of RvD1 on NF-κB activation, LPS-primed BMDMs were treated with RvD1 at 100 pM 0.5 h before MSU stimulation (e.g. after signal 1). BMDMs were collected in lyses buffer 5h after MSU stimulation. NF-κB activation was determined by ELISA. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM of total-p65/phosphorylated-p65,  $n = 3$  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 post-test).



**Figure 7. RvD1 modulates MSU-induced *Nlrp3*, *Asc*, *Pro-caspase-1*, and *Pro-il-1 $\beta$*  mRNA expression and its correspondent protein products *in vitro*.** To evaluate the effect of RvD1 on inflammasome components mRNA expression, BMDMs were treated with RvD1 at 100 pM 0.5 h before MSU stimulation (e.g. after signal 1). BMDMs were collected in rippa lyses buffer with protease and phosphatase inhibitors 5h 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 post-test).



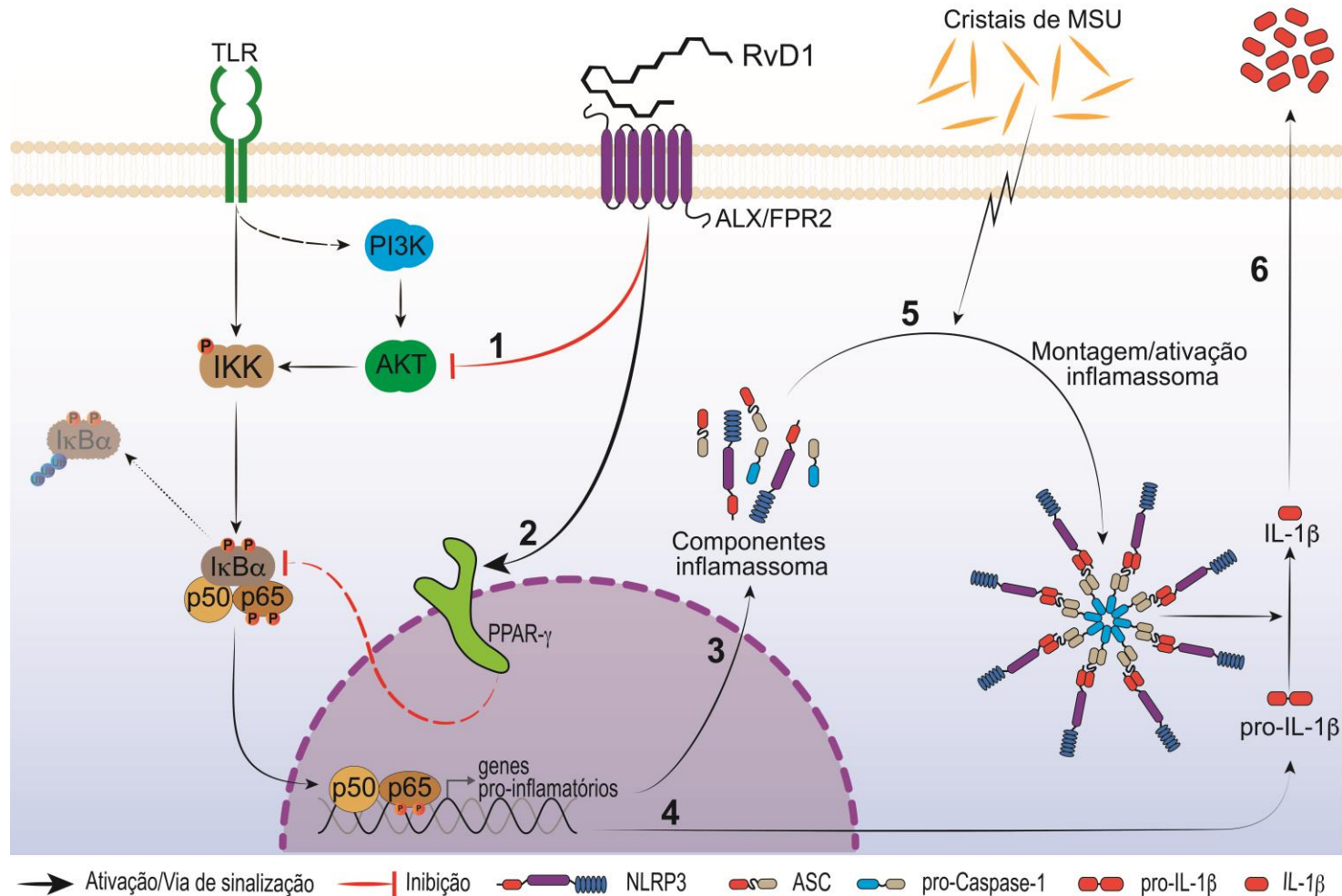
5 **Supplementary Figure 1. RvD1 reduced MSU-induced LysM-eGFP<sup>+</sup> neutrophil**  
6 **recruitment.** Fifteen hours after MSU, knee joint wash of MSU-stimulated LysM-eGFP<sup>+</sup>  
7 mouse was collected for the determination of LysM-eGFP<sup>+</sup> neutrophil recruitment by  
8 confocal

## 1 **CONCLUSÃO**

2

3                   No presente trabalho foi demonstrado que a RvD1 reduz a inflamação  
4 e dor induzida por cristais de MSU. A RvD1 reduziu a formação do inflamassoma  
5 NLRP3 e a ativação do NF- $\kappa$ B. Como consequência, foi observado a redução dos  
6 níveis de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  juntamente com a redução do recrutamento neutrofílico para  
7 articulação. O tratamento com a RvD1 também reduziu a maturação da IL-1 $\beta$  *in vitro*.  
8 Em conjunto, esses dados demonstram que a RvD1 possui propriedades anti-  
9 inflamatórias e analgésicas no modelo de AG induzida por MSU. Redução da  
10 expressão dos componentes do inflamassoma NLRP3, maturação de IL-1 $\beta$  e  
11 ativação do NF- $\kappa$ B – por vias dependentes da inibição de AKT (AKT/NF- $\kappa$ B) e da  
12 ativação de PPAR- $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ /NF- $\kappa$ B) – são possíveis mecanismo de ação da RvD1  
13 neste modelo de AG (Figura 5). Portanto, levando em consideração ensaios clínicos  
14 com outros MLPR e seu poder terapêutico na faixa de pictogramas (Fattori *et al.*,  
15 2016), a RvD1 pode ser uma nova possibilidade terapêutica na manutenção dos  
16 ataques agudos da gota.

**Figura 5** – Mecanismo de ação da RvD1 no modelo de artrite gotosa induzida por cristais de MSU.



**Mecanismos descritos:** Inibição da ativação do NF-κB (1 – Gilbert *et al.*, 2015; 2 – Liao *et al.*, 2015). **Mecanismos observados:** Redução da expressão dos componentes do inflamassoma (3) e pro-IL-1β (4); Redução da montagem e ativação do inflamassoma NLRP3 (5); e redução da maturação e liberação da IL-1β (6). **Fonte:** o próprio autor.