

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

CHEILA JULIANA CÉSAR GOMES

**ANÁLISE DOS MECANISMOS PRÓ-INFLAMATÓRIOS
DO ÁCIDO ÚRICO SOLÚVEL: EFEITO SOBRE
PROTEÍNAS SENSÍVEIS À MODULAÇÃO REDOX E
SOBRE A POLARIZAÇÃO DE CÉLULAS THP-1**

Versão corrigida da tese

São Paulo

Data de depósito na SPG
09/07/2021

CHEILA JULIANA CÉSAR GOMES

**ANÁLISE DOS MECANISMOS PRÓ-INFLAMATÓRIOS DO ÁCIDO ÚRICO
SOLÚVEL: EFEITO SOBRE PROTEÍNAS SENSÍVEIS À MODULAÇÃO
REDOX E SOBRE A POLARIZAÇÃO DE CÉLULAS THP-1**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Química, IQ-USP, como requisito necessário a obtenção do título de doutora em Ciências Biológicas (Bioquímica).

Orientadora: Profa. Dra. Flavia Carla Meotti

São Paulo

2021

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

G633a Gomes, Cheila Juliana César
Análise dos mecanismos pró-inflamatórios do ácido úrico solúvel: efeito sobre as proteínas sensíveis à modulação redox e sobre a polarização de células THP-1 / Cheila Juliana César Gomes. - São Paulo, 2021.
140 p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Bioquímica.

Orientador: Meotti, Flavia Carla

1. Ácido úrico solúvel. 2. Proteínas redox sensíveis. 3. Polarização de macrófagos. 4. Resposta imune Th2. 5. THP-1. I. T. II. Meotti, Flavia Carla, orientador.

*“J’ai demandé à Dieu la force pour atteindre le succès,
et Dieu m’a rendu faible afin que j’apprenne humblement à obéir.*

*J’ai demandé la santé pour faire de grandes choses,
et Dieu m’a donné l’infirmité pour que je fasse des choses merveilleuses.*

*J’ai demandé la richesse pour pouvoir être heureux,
et Dieu m’a donné la pauvreté pour pouvoir être sage.*

*J’ai demandé la puissance pour obtenir l’estime des hommes,
et Dieu m’a donné la faiblesse afin que j’éprouve le besoin de Dieu.*

*J’ai demandé un compagnon afin de ne pas vivre seule,
et Dieu m’a donné un cœur afin que je puisse aimer tous mes frères.*

*J’ai demandé toutes les choses qui pourraient réjouir ma vie,
et j’ai reçu la vie afin que je puisse me réjouir de toutes choses.*

*Je n’ai rien eu de ce que j’avais demandé, mais j’ai reçu tout ce que j’avais espéré.
Presque en dépit de moi-même, mes prières que je n’avais pas formulées ont été
exaucées.*

Je suis parmi les hommes le plus richement comblé.”

Ostra feliz não faz pérola

“A ostra para fazer uma pérola, precisa ter dentro de si um grão de areia que a faça sofrer. Sofrendo, a ostra diz para si mesma: “preciso envolver essa areia pontuda que me machuca com uma esfera lisa que lhe tire as pontas...” Ostras felizes não fazem pérolas... Pessoas felizes não sentem a necessidade de criar. O ato criador, seja na ciência ou na arte, surge sempre de uma dor. Não é preciso que seja uma dor dóida... por vezes a dor aparece como aquela coceira que tem o nome de curiosidade. Este [...] está cheio de areias pontudas que me machucaram. Para me livrar da dor, escrevi. ”

Rubem Alves.

Dedico aos meus pais [in memoriam]

AGRADECIMENTOS

Agradeço às pessoas que me ajudaram na realização deste trabalho e aquelas que, de modo indireto, foram essenciais para a sua realização.

À minha família e amigos próximos, companheiros de todas as horas, momentos difíceis e felizes que, mesmo à distância ou próximo, foram fundamentais para esse período que levou alguns anos de minha vida, guardo vocês em meu coração, deixo o meu muito obrigada por tudo e minha gratidão eterna!

A minha orientadora, Flavia Meotti, por sua orientação! Obrigada por me permitir desenvolver e a liberdade de testar neste trabalho! Obrigada ao meu grupo de pesquisa!

Aos meus amigos “experimentais” que admiro como humanos e como pesquisadores éticos que são; a minha amiga e colaboradora Dra. Ana Regina Geciauskas Lage Castillo pelas dicas, noites e madrugadas experimentais, apoio e conselhos! Ao grupo de pesquisa do prof. Henning Ulrich, eu os agradeço! As minhas amigas e colegas de doutorado, Ângela Yaya Candela e à Jéssica de Oliveira Faria por dicas experimentais, conselhos, reagentes e a grande ajuda experimental! Vocês foram essenciais!

Aos excelentes técnicos do Instituto de Química Fernando Rodrigues Coelho, Edlaine Linares e Janaína Nicanuzia dos Prazeres do laboratório de Bioquímica de Oxidantes e Radicais Livres e EPR da prof. Ohara Augusto por tantas ajudas e dicas experimentais! Eu os agradeço muito!

Ao grupo da profa. Alicia J. Kowaltowski, a técnica Camile C. Ortiz, aos estudantes de doutorado e amigos Pâmela Kakimoto e Julian Serna pelas dicas, empréstimos de anticorpos, reagentes e amizade!

Aos nossos vizinhos de corredor...

Ao grupo do professor Alexandre Cardoso e ao seu grupo de pesquisa! Agradeço as pós-docs. Ana Zen e Rebeka Tomasin, aos estudantes de doutorado Ana Maria, Mayara, Geovani e, em especial, ao Antônio, vocês me ajudaram muito! Muito obrigada!

Ao Laboratório de Processos Fotoinduzidos pelo uso de equipamentos, às técnicas Helena C. Junqueira e Alessandra A. de Sousa por me abrirem literalmente portas!

Aos técnicos do CEFAP-ICB Jô Martins, Mário e Yuri pela ajuda na microscopia e programas de análises para triagem de alto conteúdo.

A gentil professora Yolanda Cuccovia; a Professora Graziela Rosein e ao professor Roberto Salinas e ao grande grupo do lab. e visitantes, obrigada pelo convívio!

Aos funcionários do Instituto de Química por todo o trabalho, especialmente aos ligados às secretarias de Bioquímica e de Assuntos Acadêmicos.

Agradeço às agências de fomento à pesquisa (Capes e Fapesp)!

Obrigada à corajosa Alexandra Elbakyan por permitir acesso democrático ao conhecimento científico!

Gostaria de agradecer a todos meus amigos, e destaco alguns que estiveram nessa fase tão importante em minha vida! Sou muito grata a vocês que compartilharam comigo muitas lições, aflições, apresentações, cafés, *croissants*, almoços, estudos em grupos, conversas...

Aos mais próximos que participaram em tantas coisas em minha vida acadêmica, exemplos de pessoas, profissionais e acadêmicos: Carolina Bráz, Douglas Mendel, Gabi Alexandria, Isabella Ogusuku, João Luz, Isaac Matos, Larissa A. de Carvalho, Mario A. Rodrigues, Phellipe Vitale, Samantha Paco, Thaís Reichert, Glaucevane Guedes...eu amo a nossa amizade!

E aos outros tantos amigos... Sandroca (Sandra Sousa), Doris, Angie Davallos, Felipe Akihiro, Caio Bezerra, Thierry Puerblo, Marcos Cardoso, Dayana Aragão, Íris Todeschini, Tatiana Stabellini, Valdomiro Vagner, Peter Park, Gustavo Carretero, Carolina Lacerda, Lorena e Amanda...

Aos amigos da vida toda, pessoas inteligentes e amáveis da Organização Toca do Estudante! Uma família que encontrei, sinto-me feliz por conhecê-los! Saibam que os amo e os levo comigo para aonde eu for! Serei eternamente grata a todos vocês! Muito obrigada, Zé e Ju! Família Lino! Márcio, Evaldo, Rebeca, Paulo! Dani, Emerson, Carol Pimentel, Joseane, Isadora, Felipe, Laurinho, Isabelle Varginha, Isabelli Barretos, Lilian, Fernando, Renan, Vitor, Max, Thales, Giovanna, Carol Santos...

Agradeço também as pessoas não citadas aqui, porém não menos importantes!

Por fim, eu dou graças ao meu bom Deus, muito obrigada por tudo!!!
Obrigada! Obrigada! Obrigada!

Este trabalho foi realizado no laboratório de Processos Redox na Resposta Inflamatória (LABPPRI), Departamento de Bioquímica, do Instituto de Química (IQ), da Universidade de São Paulo (USP), com auxílio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento Profissional de Pessoal de Nível Superior (CAPES), processo número 33002010017P0 e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) 2013/07937-8 (CEPID).

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Características de subtipos de macrófagos em humanos.....28

Tabela 02. Lista de anticorpos primários, conjugados e secundários.....49

LISTA DE TABELAS SUPLEMENTARES

Tabela A.I: Medida da intensidade de fluorescência para CD14.....	110
Tabela II: Medida da intensidade de fluorescência para CD16.....	111
Tabela III: Medida da intensidade de fluorescência para CD16/CD14.....	112
Tabela IV: Medida da intensidade de fluorescência para CD11b.....	113
Tabela V: Medida da intensidade de fluorescência para CD45.....	114
Tabela VI: Medida da intensidade de fluorescência para Prx1.....	115
Tabela VII: Medida da intensidade de fluorescência para Prx2.....	116
Tabela VIII: Medida da intensidade de fluorescência para Prx2/Prx1.....	117
Tabela IX: Medida da intensidade de fluorescência para a STAT3.....	118
Tabela X: Medida da intensidade de fluorescência para o Nrf2.....	119
Tabela XI: Medida da intensidade de fluorescência para CD163.....	120
Tabela XII: Medida da intensidade de fluorescência para SOCS3.....	121
Tabela XIII: Medida da intensidade de fluorescência para Trx.....	122
Tabela XIV: Medida da intensidade de fluorescência para CD36.....	123
Tabela XV: Medida da intensidade de fluorescência para CD40.....	124
Tabela XVI: Medida da intensidade de fluorescência para CD80.....	125
Tabela XVII: Medida da intensidade de fluorescência para CD68.....	127

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Ácido úrico e formação do urato monossódico.....	19
Figura 02: Metabolismo de purinas e síntese do ácido úrico.....	21
Figura 03: Mecanismo <i>scavenging</i> do radical urato e oxidação.....	24
Figura 04: Perfis de polarização de macrófagos derivados de monócitos.....	27
Figura 05: Domínios estruturais do Nrf2 e Keap1.....	30
Figura 06: Sinalização do Nrf2-Keap1.....	31
Figura 07: Reação catalisada pela Trx.....	33
Figura 08: Degradação enzimática do grupo heme.....	34
Figura 09: Família de NF- κ B em mamíferos.....	38
Figura 10: Via de transdução de sinal do NF- κ B.....	41
Figura 11: Estrutura das STATs.....	43
Figura 12: Sinalização da JAK/STAT.....	45
Figura 13: Morfologia de células THP-1 diferenciada por PMA.....	51
Figura 14: Ensaio de viabilidade celular.....	60
Figura 15: Ácido úrico solúvel promove polarização de macrófagos.....	62
Figura 16: Perfil de citocinas da cultura das células THP-1.....	64
Figura 17: Perfil de citocinas da cultura de células macrófagos THP-1 tratadas por 8 h com ácido úrico solúvel.....	65
Figura 18: Perfil de citocinas da cultura de células macrófagos THP-1 tratadas por 24 h com ácido úrico solúvel.....	66
Figura 19: Ácido úrico solúvel promove alteração da expressão de proteínas envolvidas na polarização células THP-1.....	68
Figura 20: Nrf2 é regulado em macrófagos THP-1 por ácido úrico solúvel.....	69
Figura 21: Expressão da STAT3 é reduzida após o tratamento com o ácido úrico.....	71
Figura 22: Expressão do NF- κ B p65 por imageamento HCl após tratamento com ácido úrico solúvel.....	74

Figura 23: Expressão da STAT3 e do Nrf2 por imageamento HCl após o tratamento do ácido úrico solúvel.....	77
Figura 24: Expressão de CD68 por imageamento HCl após o tratamento com ácido úrico solúvel.....	78
Figura 25: Ácido úrico solúvel aumenta os níveis de proteínas LC3-II e p62.....	84
Figura 26: Ácido úrico solúvel não induz morte por apoptose.....	86

LISTA DE FIGURAS SUPLEMENTARES

- Figura A.1:** Caracterização fenotípica de macrófagos tratados com ácido úrico solúvel após 24 h. Macrófagos foram avaliados por citometria de fluxo quanto à porcentagem de marcação de CD14.....110
- Figura A.2:** Caracterização fenotípica de macrófagos tratados com ácido úrico solúvel após 24 h. Macrófagos foram avaliados por citometria de fluxo quanto à porcentagem de marcação de CD16.....111
- Figura A.3:** Caracterização fenotípica de macrófagos tratados com ácido úrico solúvel após 24 h. Macrófagos foram avaliados por citometria de fluxo quanto à porcentagem de marcação de CD14 e CD16.....112
- Figura A.4:** Caracterização fenotípica de macrófagos tratados com ácido úrico solúvel após 24 h. Macrófagos foram avaliados por citometria de fluxo quanto à porcentagem de marcação de CD11b.....113
- Figura A.5:** Caracterização fenotípica de macrófagos tratados com ácido úrico solúvel após 24 h. Macrófagos foram avaliados por citometria de fluxo quanto à porcentagem de marcação de CD45.....114
- Figura A.6:** Caracterização fenotípica de macrófagos tratados com ácido úrico solúvel após 24 h. Macrófagos foram avaliados por citometria de fluxo quanto à porcentagem de marcação de Prx1.....115
- Figura A.7:** Caracterização fenotípica de macrófagos tratados com ácido úrico solúvel após 24 h. Macrófagos foram avaliados por citometria de fluxo quanto à porcentagem de marcação de Prx2.....116
- Figura A.8:** Caracterização fenotípica de macrófagos tratados com ácido úrico solúvel após 24 h. Macrófagos foram avaliados por citometria de fluxo quanto à relação de expressão da Prx1 e Prx2.....117
- Figura A.9:** Caracterização fenotípica de macrófagos tratados com ácido úrico solúvel após 24 h. Macrófagos foram avaliados por citometria de fluxo quanto à porcentagem de marcação de STAT3.....118
- Figura A.10:** Caracterização fenotípica de macrófagos tratados com ácido úrico solúvel após 24 h. Macrófagos foram avaliados por citometria de fluxo quanto à porcentagem de marcação da expressão do Nrf2.....119
- Figura A.11:** Caracterização fenotípica de macrófagos tratados com ácido úrico solúvel após 24 h. Macrófagos foram avaliados por citometria de fluxo quanto à porcentagem de marcação de CD163.....120
- Figura A.12:** Caracterização fenotípica de macrófagos tratados com ácido úrico solúvel após 24 h. Macrófagos foram avaliados por citometria de fluxo quanto à porcentagem de marcação de SOCS3.....121

Figura A.13: Caracterização fenotípica de macrófagos tratados com ácido úrico solúvel após 24 h. Macrófagos foram avaliados por citometria de fluxo quanto à porcentagem de marcação de Trx.....	122
Figura A.14: Caracterização fenotípica de macrófagos tratados com ácido úrico solúvel após 24 h. Macrófagos foram avaliados por citometria de fluxo quanto à porcentagem de marcação de CD36.....	123
Figura A.15: Caracterização fenotípica de macrófagos tratados com ácido úrico solúvel após 24 h. Macrófagos foram avaliados por citometria de fluxo quanto à porcentagem de marcação de CD40.....	124
Figura A.16: Caracterização fenotípica de macrófagos tratados com ácido úrico solúvel após 24 h. Macrófagos foram avaliados por citometria de fluxo quanto à porcentagem de marcação de CD80.....	125
Figura A.17 Caracterização fenotípica de macrófagos tratados com ácido úrico solúvel após 24 h. Macrófagos foram avaliados por citometria de fluxo quanto à expressão da marcação de CD68.....	126
Figura A.18: Expressão basal do fator de transcrição Nrf2 nuclear e citosólico obtidos de extratos fracionado de pró-monócito THP-1 e da THP-1 diferenciada após 48 h por western-blot. Expressão basal HO-1 de pró-monócito THP-1 e da THP-1 diferenciada após 48 h de extrato total por western-blot.....	128
Figura A.19: Expressão basal de Integrina β 1 em THP-1 monócito e THP-1 diferenciada após 48 h.....	130
Figura A.20: Expressão do fator de transcrição NF- κ B p65 total após 24 h de tratamento com ácido úrico solúvel.....	131
Figura A.21: Expressão da STAT3 total após 24 h de tratamento com ácido úrico solúvel.....	132
Figura A.22: Expressão basal das proteínas Prx1, Prx2, Prx4 e PDI obtidas de células THP-1 e THP-1 diferenciada por 48 h por western-blot.....	133
Figura A.23: Expressão temporal do Nrf2 e HO-1, e das Peroxirredoxinas típicas após 0, 24, 48, 72, 96 e 120 h de diferenciação de células THP-1 com uso do PMA.....	134
Figura A.24: Expressão da Prx1 em condições não-redutoras e redutoras após tratamento com ácido úrico solúvel.....	135
Figura A.25: Expressão da Prx2 em condições não-redutoras e redutoras após tratamento com o ácido úrico solúvel.....	136
Figura A.26: Expressão do NF- κ B p65 por HCCS após tratamento por ácido úrico solúvel.....	137

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AUs: Ácido úrico solúvel
AP-1: Proteína ativadora 1
CD: *Cluster of Differentiation*
CNS/bZIP: *Cap'n'collar (CNC)- basic region leucine zipper (bZIP) protein*
CO: monóxido de carbono
C4b: *Complement C4-B precursor*
DC: *double glycine repeat and C-terminal*
FACS: *Fluorescence-activated by Cell Sorting*
FSC: *Forward Scatter*
GM-CSF: fator de crescimento de colônia de macrófago-granulócito
HCI: *High Content Imaging*
HMGB1: *High Mobility group Box 1*
HTS: *High throughput-Screening*
ICAM: *Intercellular Adhesion Molecular 1*
iC3b: *inactivated C3b*
IFN γ : Interferon gamma
Ig: Imunoglobulina
IL: Interleucina
JAK: Janus quinase
Keap1: *Kelch like ECH-associated protein 1*
MR: *manose receptor*
Neh: *Nrf2-ECH homology*
Nrf2: *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*
NF- κ B: *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*
PARP-1: Poli (ADP Ribose) polimerase-1
PBS: tampão salina-fosfato
PDI: Proteína dissulfeto isomerase
PIAS: *protein inhibitor of activated STAT*
PMA: *phorbol 12-myristate 13-acetate*
PPAR: *peroxisome proliferator-activated receptor*
PRR: *pattern recognition receptor*
Prx1: Peroxiredoxina-1
Prx2: Peroxirredoxina-2
Prx4: Peroxiredoxina-4
ROI: *region of interest*
SFB: soro fetal bovino
sMAF: *small Maf (musculoaponeurotic fibrosarcoma) protein*
SOCS3: *Suppressor of cytokine signaling 3*
STAT3: *Signal transducer and activator of transcription 3*
SSC: *side Scatter*
TAM: *tumor-associated macrophage*
tBHQ: *tert-butyl hidroquinona*
THP-1: *Tamm-Horsfall Protein 1*

César-Gomes, C.J. **Análise dos mecanismos pró-inflamatórios do ácido úrico solúvel: efeito sobre proteínas sensíveis à modulação redox e sobre a polarização de células THP-1** [tese (Doutorado em Bioquímica e Biologia Molecular)]. São Paulo, Instituto de Química, Universidade de São Paulo; 2021.

Vários estudos epidemiológicos estabelecem correlação positiva entre os níveis de ácido úrico sérico e o aumento do risco para doenças cardiovasculares. Fatores dietéticos e socioeconômicos, além da presença de comorbidades estão diretamente associados aos níveis séricos de ácido úrico. Países desenvolvidos apresentam maior incidência e prevalência da gota e alguns grupos étnicos são particularmente susceptíveis à hiperuricemia. Cristais de ácido úrico são descritos por iniciar e perpetuar resposta inflamatória, e sinalizar um padrão de resposta molecular associado ao dano (DAMP), permitindo a diferenciação de macrófagos para perfis pró-inflamatórios. Por outro lado, os efeitos do ácido úrico em sua forma solúvel ainda carecem de estudos. Macrófagos derivados de precursores monocíticos apresentam diferenciação específica e respondem a um conjunto de fatores extrínsecos, resultando em perfis distintos, um fenômeno conhecido como polarização. Assim, os macrófagos podem ser classicamente ativados para uma resposta Th1 (*T helper 1*) e polarizados a um perfil pró-inflamatório (M1, resposta Th1) ou a um perfil alternativo e oposto, um perfil de resolução da inflamação (M2, resposta Th2, *T helper 2*). Nesse sentido, buscamos analisar os efeitos do ácido úrico solúvel sobre vias de modulação da polarização fenotípica de macrófagos e modificação redox. Utilizamos a linhagem monocítica humana THP-1, a qual foi diferenciada em macrófagos-símile por acetato miristato de forbol (PMA; 5 ng.mL^{-1}) por 48 h, seguidas da incubação com ácido úrico em meio ausente de tióis e soro fetal bovino por 8h ou 24h (0-1000 μM). A expressão de fatores de transcrição e marcadores de polarização foi realizada através de citometria de fluxo, western-blotting e por microscopia de fluorescência com alto conteúdo de imagens (HCI). Em concentrações fisiológicas, verificamos que o ácido úrico solúvel regulou positivamente a frequência de células para receptor manose CD206, um marcador clássico de perfil alternativo/M2 e regulou negativamente a expressão óxido nítrico sintase induzível (iNOS), um marcador M1, sugerindo inicialmente uma modulação para o perfil de polarização M2. Além disso, as proteínas redox-sensíveis, heme oxigenase-1 (HO-1) e tiorredoxina (Trx) tiveram sua expressão reduzida e aumentada, respectivamente, pelo tratamento com ácido úrico. Os fatores de transcrição Nrf2 e STAT3 tiveram regulação negativa após a exposição ao ácido úrico solúvel. Os resultados apresentados nesta tese sugerem uma função do urato no *priming* de macrófagos através da alteração da polarização destas células.

Palavras-chaves: ácido úrico solúvel, polarização de macrófagos, macrófago M1, macrófago M2 e proteínas redox sensíveis.

César-Gomes, C.J. **Analysis of the pro-inflammatory mechanisms of soluble uric acid: effect on redox sensitive proteins and THP-1 cell polarization** [thesis (ph.D in Biochemistry and Molecular Biology)]. São Paulo, Instituto de Química, Universidade de São Paulo; 2021.

Several epidemiological studies have established a positive correlation between high serum uric acid levels and increased risk for cardiovascular diseases. Developed countries have a higher incidence and prevalence of gout and some ethnic groups are particularly susceptible to hyperuricemia. Although hyperuricemia is a prevalent condition, it has still controversy biological consequences. Uric acid crystals are described as capable of initiating and perpetuating inflammatory responses, by activating the damage-associated molecular response pattern (DAMP) cascade, allowing macrophage differentiation to inflammatory profiles. In spite of that, biological response to soluble uric acid are not completely understood. Monocyte-derived macrophages respond to a set of extrinsic factors that result in different profiles and can be polarized to a proinflammatory (M1) or anti-inflammatory (M2) profile. In this thesis, we analyzed the effects of soluble uric acid on redox-modulated pathways and the phenotypic polarization of macrophages. We used human monocytic THP-1 cell line, differentiated into macrophage by phorbol myristate acetate (PMA; 5 ng.mL⁻¹) for 48 h. After differentiation, cells were incubated with soluble uric acid in medium without thiols and fetal bovine serum for 8 h and 24 h (0-1000 µM). The expression of transcription factors and polarization markers were assessed by flow cytometry, western-blotting and fluorescence microscopy with high content imaging (HCI). At physiological concentrations, soluble uric acid positively regulated the frequency of cells for mannose receptor CD206, a classic marker of the anti-inflammatory M2 profile and negatively regulated the inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression, a proinflammatory M1 marker, suggesting that the soluble uric acid changes the polarization profile to M2 profile. In addition, the redox-sensitive proteins heme oxygenase-1 (HO-1) and thioredoxin (Trx) had their expression decreased and increased, respectively, after exposure to urate. STAT3 and Nrf2 transcription factors were down-regulated upon soluble uric acid exposure. The results presented in this thesis suggest a role of uric acid in macrophage priming through the alteration of cell polarization.

Keywords: soluble uric acid, macrophage polarization, M1, M2, redox sensitive proteins.

SUMÁRIO

Lista de tabelas.....	x
Lista de tabelas Suplementares.....	xi
Lista de Figuras.....	xii
Lista de Figuras Suplementares.....	xiv
Lista de Abreviaturas e Siglas.....	xvi
Resumo.....	xvii
Abstract.....	xviii
1. Introdução.....	19
1.1. Ácido úrico.....	19
1.2. Polarização de Macrófagos e heterogeneidade.....	26
1.3. Vias de sinalização de proteínas redox sensíveis.....	30
1.3.1. Nrf2.....	30
1.3.1.1. Tiorredoxina.....	34
1.3.1.2. Heme oxigenase-1.....	35
1.3.2. NF- κ B.....	36
1.3.3. <i>Janus Kinases</i> e <i>STATs</i>	42
2. Justificativa.....	47
3. Objetivos.....	48
4. Materiais e Métodos.....	48
4.1. Reagentes & anticorpos.....	48
4.2. Cultura celular & Diferenciação.....	50
4.3. Tratamento	51
4.4. Ensaio de Citometria de fluxo.....	52
4.5. Dosagem de citocinas.....	54
4.6. Fracionamento celular e enriquecimento nuclear.....	55
4.7. Quantificação de proteínas	56
4.8. SDS-PAGE e <i>Imunoblotting</i>	56
4.9. Ensaio de translocação nuclear do NF- κ B, Nrf2 e STAT3 por HCl.....	57
4.10. Ensaio de Apoptose e Viabilidade celular.....	58
4.11. Análise Estatística.....	59
5. Resultados.....	60
5.1. Viabilidade celular após exposição ao ácido úrico.....	60
5.2. Ácido úrico solúvel modifica a polarização fenotípica de macrófagos.....	61
5.3. Expressão de proteínas após tratamento com ácido úrico.....	67
5.4. Ensaio de translocação do NF- κ B p65, STAT3 e Nrf2 por HCl.....	69
5.5. STAT3 é regulada por concentrações fisiológicas de ácido úrico solúvel... ..	70
5.6. Expressão do fator NF- κ B p65, STAT3 e Nrf2 por HCl.....	71
5.7. A análise da autofagia após o tratamento do ácido úrico.....	83
5.8. Ácido úrico solúvel não induz morte por apoptose.....	85
6. Discussão.....	87
7. Conclusões.....	96
Referências.....	97
Apêndice.....	110

1. Introdução

1.1 Ácido úrico

O ácido úrico, $C_5H_4N_4O_3$ (7,9-dihidro-1H-purina-2,6,8(3H)triona), é um componente heterocíclico obtido como produto final do metabolismo de purinas em humanos e primatas superiores (Mandal & Mount, 2015; Ridi & Tallima, 2017). Um ácido fraco ($pK_1=5,4$), o ácido úrico circula predominantemente como íon desprotonado sob condições fisiológicas e se apresenta como componente de baixa solubilidade, alcançando o limite em fluidos extracelulares de 0,42 mmol/L em humanos hígidos (Figura 01) (Chhana et al, 2015; Martillo et al, 2014, Li et al, 2019). Acumula-se no plasma em concentração que pode variar de 1,5 a 6,0 $mg.dL^{-1}$ (90 a 360 μM) e 2,5 a 7,0 $mg.dL^{-1}$ (150 a 420 μM) em mulheres e homens saudáveis respectivamente. Em concentrações superiores, torna-se um fator de risco para a formação de cristais e desenvolvimento da inflamação asséptica (Li et al, 2019; Kang & Johnson, 2020).

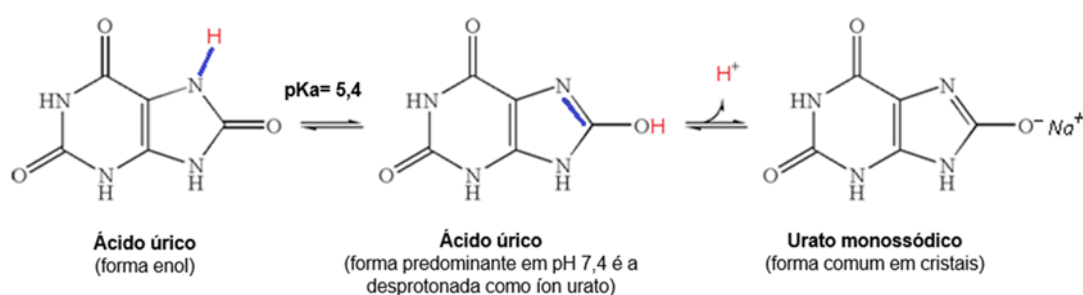


Figura 01: Ácido úrico e a formação do urato monossódico. Em pH fisiológico (7,4) a 37°C, a forma iônica predomina. O urato pode combinar com íons Na^+ presentes nos fluidos plasmáticos e em maior quantidade formando o urato monossódico, e precipitar, formando cristais. Adaptado de Martillo et al (2014).

Essa disfunção é resultado de uma acentuada produção de ácido úrico em órgãos como o fígado, intestinos e músculos, por secreção renal defeituosa,

ou ambas. Aproximadamente 90% dos casos de hiperuricemia são decorrentes de prejuízos das funções renais (Richette & Bardin, 2010). Algumas pesquisas descrevem que a hiperuricemia esteja associada a defeitos nas funções das proteínas responsáveis pelo transporte do ácido úrico, tal como transportador de urato do tipo 1 (SLC22A12/URAT1), e o transportador de glicose (SLC2A9/GLUT9), membro 2 da subfamília G de transportadores de cassete de ligação de ATP (ABCG2) e transportadores de ânions orgânicos (OAT, *do inglês*) (Döring et al, 2008; Dalbeth et al, 2016; Martinon, 2009; Matsuo et al, 2009; So & Thorens, 2010). Ademais, fatores locais e individuais como temperatura, pH, estresse mecânico, componentes da cartilagem, quantidade de íons Na⁺ séricos são essenciais para nucleação, formação e deposição de cristais de urato monossódico e o desenvolvimento de uma hiperuricemia sintomática e artrite gotosa.

A artrite gotosa é uma condição da hiperuricemia prolongada, sendo caracterizada pela formação de cristais de urato monossódico no espaço articular e periarticular, em especial, a 1ª articulação metatarsfalangeana, dorso do pé e joelhos. Esses cristais desencadeiam uma severa e auto-limitada resposta inflamatória (Chhana et al, 2015; Martillo et al, 2014). É a artrite inflamatória mais comum em adultos. Crises agudas se resolvem em um período dentro de 7-10 dias, e intercala períodos assintomáticos, os chamados períodos intercríticos. Essa condição sustentada por longo período de tempo pode resultar em mais frequentes e severas crises e podem atingir membros superiores e outras articulações resultando em uma poliartrite. Na ausência de terapia e tratamento para redução de níveis circulantes de ácido úrico, lesões granulomatosas podem ser formadas ao longo de anos em áreas de acúmulo de

cristais de urato monossódico, formando tofos (So Bursil et al, 2018, Dalbeth et al, 2019). A descrição do metabolismo oxidativo de purinas e formação do ácido úrico está ilustrado na Figura 02.

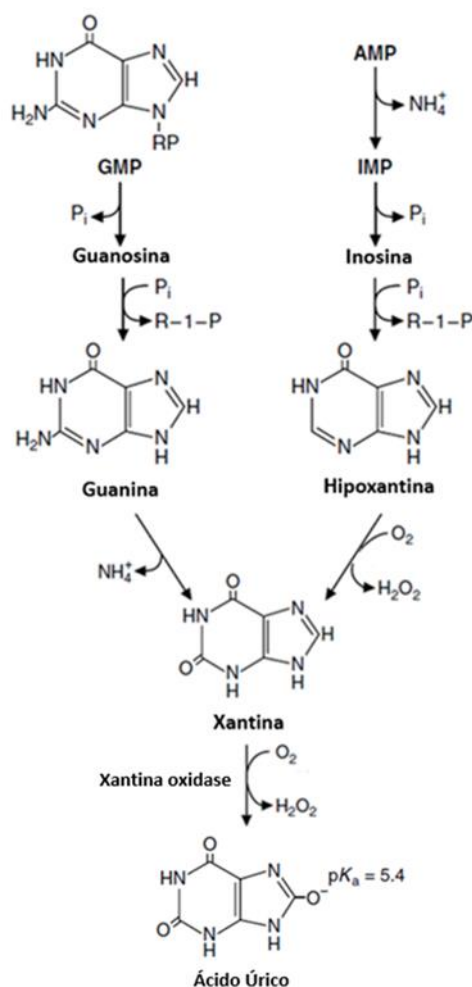


Figura 02: Metabolismo de purinas e síntese do ácido úrico. Representação esquemática do metabolismo das purinas para a síntese do ácido úrico como produto final em humanos e primatas superiores.

A hiperuricemia é classicamente definida pela elevação de urato sérico além do limite de solubilidade de 6,8 a 7,0 mg.dL^{-1} , na ausência de episódios de inflamação por cristais, é caracterizada como assintomática (Boss & Seegmiller, 1979; Khanna et al, 2012; Bursill et al, 2019, Joosten et al, 2020). Apesar de ser uma condição modificável e ser considerada um fator de risco independente para

inflamação (Kono et al, 2010), artrite gotosa (Kuo et al, 2015; Dalbeth et al, 2016; Oh et al, 2019), doenças cardiovasculares (Fang & Alderman, 2000; Feig et al, 2008; Tanaka et al, 2017; Rahimi-Sakak et al, 2019; White et al, 2016), hipertensão (Ali et al, 2019; Johnson et al, 2003; Perlstein et al, 2006), diabetes (Banduru & Shankar, 2011; Xiong et al, 2019), síndrome metabólica (Soltani et al, 2013), doença renal (Kang & Nakagawa, 2005), problemas neurológicos (Fang et al, 2013), alterações de comportamento (Sutin et al, 2014), neoplasias (Fini et al, 2012) e aumento da mortalidade (Cho et al, 2018; Meisinger et al, 2008; Storhaug et al, 2013) existem descrições na literatura que colocam que pelo menos metade da capacidade antioxidante sérica humana advém do urato (Ames et al, 1981; Proctor, 1970) e que a manutenção de altos níveis dessa molécula está associada a uma resposta adaptativa conferida ao longo da evolução (Johnson et al, 2003; Johnson & Rideout, 2004; Johnson et al, 2008; Chang, 2014; Johnson et al, 2018).

A presença do ácido úrico como produto final do metabolismo de nucleotídeos purínicos em mamíferos superiores se deve ao fato de que mutações independentes introduziram códons de parada prematuros (códons 33 e 187) ao gene da uricase ou urato oxidase (EC 1.7.3.3). Além disso, a presença de um sítio de *splicing* aberrante ao transcrito permitiu uma consequente perda gradual da funcionalidade do gene (Wu et al, 1989; Wu et al, 1992). Por pressão seletiva, a evolução permitiu que ácido úrico fosse o produto final dessa via em primatas superiores, devido à ausência da uricase, confere uma vantagem como um sistema antioxidante alternativo ao ascorbato (Figura 02) (Ames et al, 1981; Frei et al, 1989). Ainda, hipotetiza-se que o acúmulo gradativo em fluidos extracelulares do ácido úrico possibilita a manutenção da pressão arterial em

situações de dietas de baixo consumo de sal e permitiu a condição bípede aos homínídeos durante o período Mioceno (Mazzali et al, 2001; Mazzali et al, 2002; Watanabe et al, 2002; Johnson et al, 2003; Johnson & Rideout, 2004; Johnson et al, 2008; Johnson et al, 2018).

Sua descrição como antioxidante se deve ao seu baixo potencial de redução ($E^\circ = 0,59 \text{ V}$) e, devido a sua alta concentração no plasma, é considerado o principal antioxidante de baixo peso molecular neste fluido. O urato é capaz de reduzir radicais livres através da doação de um elétron ou outros oxidantes por dois elétrons. Ainda, sua regeneração e estabilidade no plasma, inibe a reação de Fenton através de sua capacidade de quelar íons metálicos como Fe^{+3} , Fe^{+2} , Cu^{+2} e Cu^+ e reagir com radicais hidroxila (Becker, 1993). A oxidação por um elétron por radicais livres ou catalisada por hemeperoxidases converte o ânion de urato em radical urato. Isso pode levar a uma reação em cadeia de radicais livres ou gerar outros oxidantes como o hidroperóxido de urato (Figura 03). Nesse caso, tem-se o papel pró-oxidante do ácido úrico (Meotti et al, 2011; Patrício et al, 2015; Silva et al, 2018; Turner et al, 2018).

Estudos descrevem que as propriedades antioxidantes do ácido úrico não estão relacionadas aos seus efeitos sobre células inflamatórias e na inflamação (Alberts et al, 2019; Grainger et al, 2013; McLaughlin, 2014). Uma tese publicada em 2014, McLaughlin descreve que monócitos obtidos de voluntários hiperuricêmicos apresentam síntese diminuída de citocinas pró-inflamatórias (Interleucina-1 β , IL-1 β e o fator de necrose tumoral, TNF) e aumento da síntese da Interleucina-10, IL-10, uma citocina anti-inflamatória, frente a exposição de

LPS *ex vivo*. O autor identificou duas vias de sinalização envolvidas nas propriedades do ácido úrico solúvel sobre a supressão de fenótipo de monócitos: redução da ativação da MAPK e da via do NF- κ B (McLaughlin, 2014). Estudo prévio do mesmo grupo também apresentou resposta similar em cultura de monócito frente ao desafio do LPS (Grainger et al, 2013). Também foi descrito por estimular e modificar resposta funcional do endotélio vascular (Papežíková et al, 2013). Ademais, a maturação e diferenciação de macrófagos ocorre durante o estado de inflamação da gota (Martin et al, 2011) e em cultura de macrófagos *ex vivo* capaz de promover troca de perfil polarização fenotípica quando associado ao LPS (Melchor et al, 2014). Apesar do extenso conjunto de dados sobre os efeitos do ácido úrico em células inflamatórias, os exatos alvos moleculares responsáveis pelo *priming* e ativação ainda não estão estabelecidos.

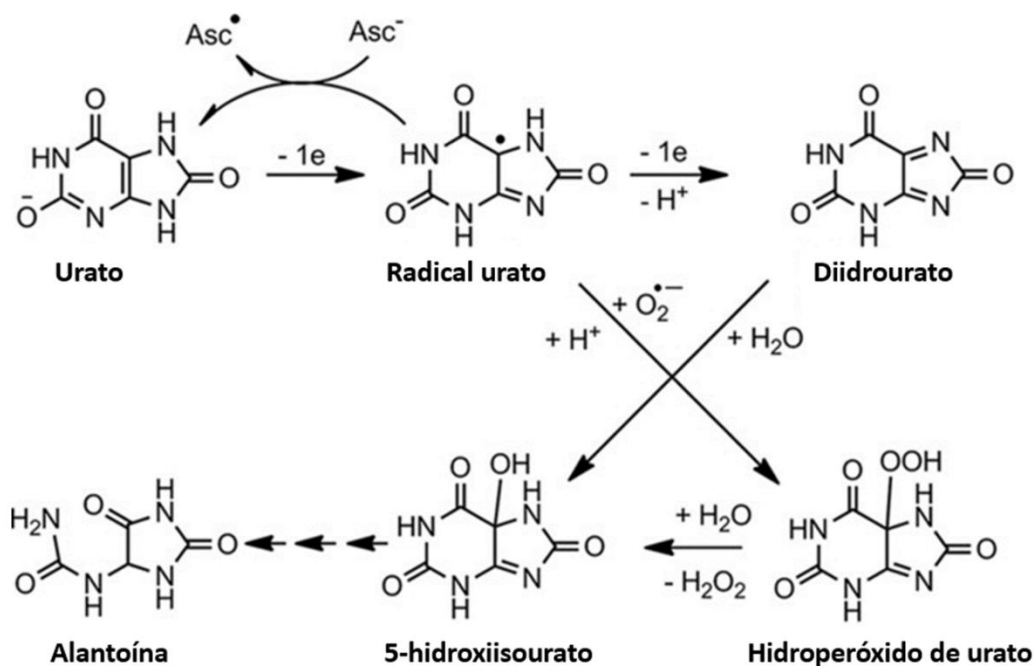


Figura 03: Mecanismo de oxidação do ácido úrico e formação de intermediários oxidantes como o radical urato e hidropéroxido de urato. Após doar um elétron, o radical de urato pode retornar a ácido úrico ao abstrair um elétron do ascorbato. Uma cascata

de reação de radicais livres pode acontecer caso o radical urato não seja reduzido pelo ascorbato. Ao doar um segundo elétron, o radical de urato é oxidado a desidrouato. Alternativamente, este radical pode combinar-se ao ânion radical superóxido para produzir hidroperóxido de urato até sua oxidação completa à alantoína. Adaptado de Turner et al (2018).

1.2. Polarização de Macrófagos e heterogeneidade

Macrófagos atuam em uma diversidade funções na imunidade inata e adaptativa. Apresentam, ao menos, três funções básicas para a manutenção da homeostase: fagocitose, apresentação de antígenos, e secreção de citocinas. Macrófagos são derivados de precursores monocíticos e respondem a um conjunto de fatores extrínsecos que os influenciam na expressão de proteínas regulatórias e de superfície, apresentando um chamado estado de polarização celular. O conceito é referente a características fenotípicas em um dado tempo e espaço expressando características proteicas e funcionais em relação à inflamação (Murray et al, 2014; Murray, 2017).

A literatura divide essas subpopulações com funções diametralmente opostas, em dois subtipos: macrófagos classicamente polarizados M1 são caracterizados como macrófagos pró-inflamatórios com alta habilidade de produção de citocinas pró-inflamatórias que medeiam a resistência à patógenos, têm alta capacidade microbicida, produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ROS/RNS), são ativados por componentes bacterianos como LPS isolado ou em combinação com citocinas que desencadeiam reposta imune de linfócitos Th1, entre elas, interferon-gamma (IFN γ). Estes macrófagos são caracterizados pela alta expressão de interleucina-1 β (IL-1 β), IL-6, IL-12, IL-23 e fator de necrose tumoral (TNF α) e oxido nítrico sintase induzível (iNOS). Eles podem ser identificados pela presença de moléculas do complexo de

histocompatibilidade classe II (MHC II), CD68, CD80 e CD86, SOCS3 e iNOS (Barros et al, 2013, Martinez & Gordon, 2014).

Já macrófagos classicamente polarizados M2 são caracterizados por resposta anti-inflamatória e são induzidos por citocinas produzidas por células do tipo linfócitos Th2 tais como IL-4, IL-10 e IL-13. Macrófagos M2 são caracterizados pela expressão de receptores de manose CD206 e CD163 e produção de citocinas IL-6, IL-10 e TGF β , um fator de transformação de crescimento. Além disso, macrófagos M2 são caracterizados pela baixa expressão da iNOS e IL-12. Funcionalmente, atuam na resolução da inflamação, apresentam alta capacidade fagocítica e de pró-angiogênese e atuam no remodelamento tecidual. São encontrados também no microambiente tumoral (Mosser & Edward, 2008; Murray, 2014; Murray, 2017; Sica & Montovani, 2012; Gordon & Martinez, 2010).

Macrófagos M1 e M2 são também caracterizados pelo metabolismo energético diferencial (Biswas et al, 2013; Mehta et al, 2017). Atualmente, o espectro de classificação é ampliado e engloba mais subclasses para o perfil de ativação M2 (Figura 04; Tabela 01). Macrófagos humanos não-polarizados (M Φ ou M0) podem ser reconhecidos pela expressão do fator 1 estimulador de colônias de macrófagos/CD115, a integrina α M/CD11b e pela expressão CD16^{high}/CD14^{low} e não apresentam expressão de marcadores inflamatórios (Montovani, 2006; Murray et al, 2014; Yunna et al, 2020).

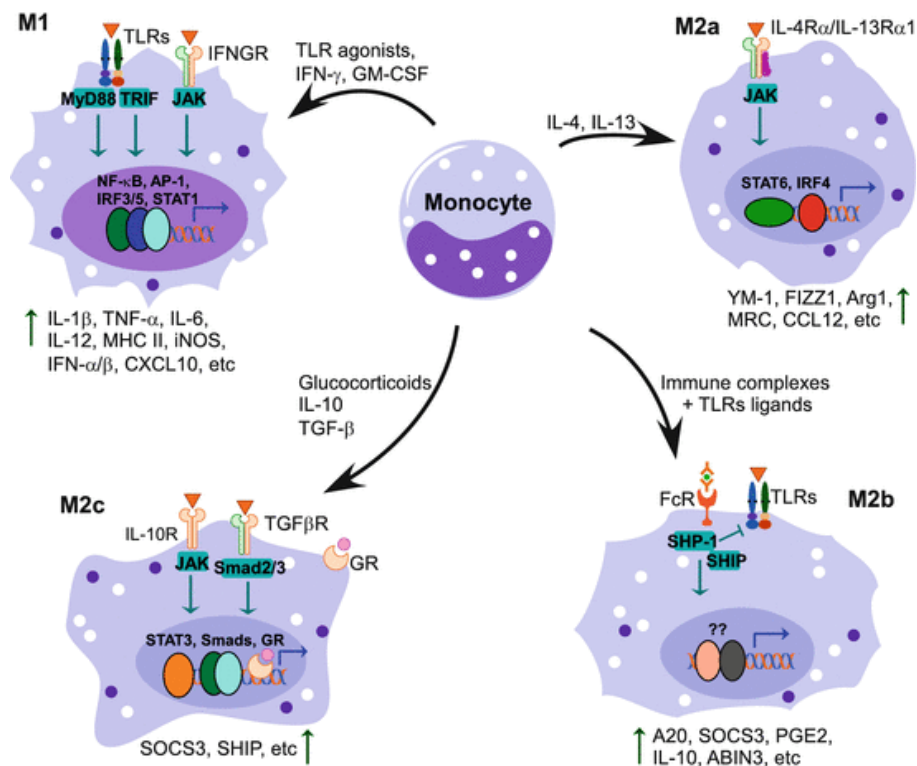


Figura 04: Perfis de polarização de macrófagos derivados de monócitos. Retirado de Cui & Liu (2015).

Outros perfis são descritos na literatura, entre eles, o Mox (Kadl et al, 2010; Chinetti-Gbaguidi et al, 2015; Fraternali et al, 2015). Macrófagos Mox podem ser obtidos a partir da exposição de fosfolípidios oxidados. São caracterizados pela regulação de genes ligados à resposta ao estresse e homeostase redox, incluindo a ativação do Nrf2, e apresentam regulação dos genes envolvidos na atividade antioxidante como *Hmox1*, *Srxn1*, *Txnrd1* e *Gsr* (Glutathiona dissulfeto redutase). Além disso, macrófagos Mox expressam alguns marcadores inflamatórios tais como IL-1 β e cicloxigenase-1 (COX-1), via ativação do TLR2. Em lesões de aterosclerose, esses macrófagos compreendem 30% do total de macrófagos em placas com menor atividade fagocítica e quimiotática (Kadl et al, 2010).

Tabela 01: Características de subtipos de macrófagos em humanos

Fenótipo	Classificação tradicional	Estímulo(s)	Marcadores
M1	Pro-inflamatório, ativado classicamente	Citocinas Th1 (IFN γ , TNF, IL-1 β) e/ou LPS, ou GM-CSF	IL-1 β , TNF, IL-6, IL-12, IL-23, CXCL10, CXCL11, CD68, CD86, CD80, MHC II, IL-1R, TLR2, TLR4, iNOS, SOCS3
M2a	Anti-inflamatório, ativado alternativamente	Citocinas Th2 (IL-4, IL-13), infecção fúngica e/ou helmíntica	CD206(MR), SR, IL-1Ra, fator XIIIa, CD200R, CCL18, Estabilina-1, CD163, MHC II, TGM2, DecoyR, IL-1R II, CCL17, CCL22, CCL24
M2b	Ativado alternativamente	Combinações de complexos imunes e/ou IL-1 β ou LPS	IL-10 ^{hi} , IL-12 ^{lo}
M2c	Ativado alternativamente	IL-10, TGF- β e/ou glicocorticoides	MR
M2d	Ativado alternativamente	IL-6, LIF, Adenosina	VEGF
M4	N/A	CXCL4	MMP7, S100-A8, MR
Mox	N/A	Fosfolípidios oxidados	HO-1, SRXN1, TrxR1, Nrf2
M(Hb)	N/A	Complexos de Hemoglobina e Hepatoglobina	CD163, MR
Mhem	N/A	Heme	CD163, ATF-1
HA-mac	N/A	Complexos de Hemoglobina e Hepatoglobina	CD163 ^{hi} , HLA-DR ^{lo}

Abreviações: ATF-1, Fator de transcrição-1 dependente de AMP cíclico; CXCL4, Quimiocina 4; DecoyR, Hi, high; HLA-DR (*Human leukocyte antigen DR isotype*); LIF, fator inibidor de leucemia; Lo, Low ; MHC, complexo principal de histocompatibilidade II; MR, receptor de manose; MMP7, Matriz de Metaloproteinase-7; N/A, não se aplica; SOCS, supressor de sinalização de citocina; SR, receptor scavenger; SRXN1, Sulfirredoxina-1; TGM2, transglutaminase 2; TrxR1, Tiorredoxina redutase-1; VEGF, fator de crescimento endotelial vascular. (Adaptado de Chinetti-Gbaguidi et al, 2015; Duluc et al, 2007; Röszer, 2015)

1.3 Vias de sinalização de proteínas redox sensíveis

1.3.1. Nrf2

O fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2, Nrf2 (*Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*), é um fator de transcrição redox sensível, codificado pelo gene NFE2L2, auto- e hetero-induzível, pertencente à família de Cap'n'collar (CNC), subfamília de fatores de transcrição de zíper de leucina básica (bZIP). A família CNC é caracterizada pela presença de 43 aminoácidos conservados na porção N-terminal no domínio de ligação ao DNA. Em vertebrados, essa família compreende o fator p45 NFE2 (*Nuclear factor erythroid-derived 2*), o Nrf1, Nrf2 e o Nrf3. Classicamente, essas proteínas atuam na resposta ao estresse e sinalizam resposta gênica em regiões reconhecidas como elementos de resposta, promovendo a ativação coordenada transcricional para um conjunto de enzimas antioxidantes e proteínas com função de detoxificação (Sykietis & Bohmann, 2010; Wakabayashi et al, 2010).

O Nrf2, membro da família CNC mais estudado, em humanos é uma proteína de 605 resíduos de aminoácidos definida pela presença de sete domínios estruturais conservados, os domínios Neh (*Nrf2-ECH Homology*) e apresenta distintas funções para o funcionamento como fator de transcrição redox sensível: **Neh1** é um domínio com a estrutura de zíper de leucina básica em que se dimeriza com as proteínas sMaf [*small Maf (musculoaponeurotic fibrosarcoma) protein*], o domínio **Neh2**, domínio que permite a ligação do Nrf2 a proteína repressora, o Keap1 (*Kelch like ECH-associated protein 1*); o domínio **Neh3** fornece estabilidade a estrutura e possui o domínio de transativação e de recrutamento-helicase. **Neh4** e **Neh5** atuam como domínios de transativação e se ligam aos elementos de resposta ao AMP (cAMP Response Element Binding Protein, CREB) e ao RAC (*receptor-associated*

coactivator); possui atividade histona acetil-transacetilase. O domínio **Neh6** regula negativamente o Nrf2 através dos motivos DSGIS e DSAPGS, motivos de ligação ao β -TrCP1 (E3-ubiquitina, uma E3-ubiquitina ligase contendo sequências repetidas de β -transducina). O domínio **Neh7** medeia a repressão do Nrf2 pelo receptor de retinoide-alfa (RXR α) através de uma interação física (Figura 05) (Canning et al, 2015).

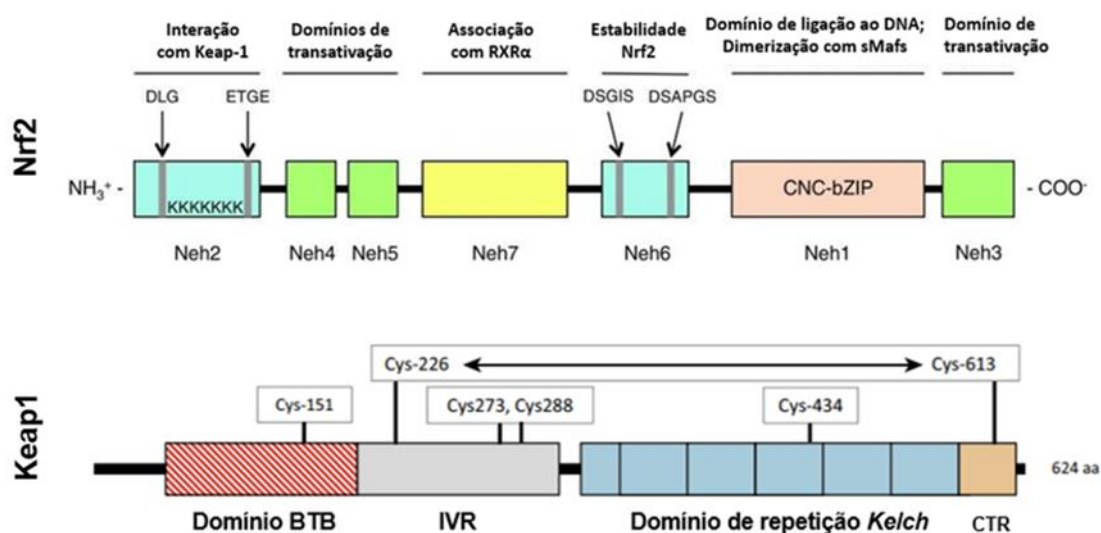


Figura 05: Representação esquemática dos domínios estruturais do Nrf2 e Keap1. A sequência superior representa o fator de transcrição Nrf2 humano, o qual compreende uma estrutura de sete domínios Neh (Nrf2-ECH Homology). O domínio Neh1 é o domínio com a estrutura CNC/bZIP [human Cap'n'collar(CNC)-basic region leucine zipper (bZIP) protein] responsável pela ligação e dimerização com as proteínas sMaf e essencial para a ligação aos elementos de resposta antioxidante (ARE, antioxidant response element); o domínio Neh2 é responsável pela interação com o Keap1 através dos motivos DLG e ETGE, apresenta sete resíduos de lisina representados na figura por seu símbolo/letra K, alvos de ubiquitinação; Neh3, Neh4 e o Neh5 são domínios de transativação; Neh6 é um domínio rico em serina e regula a estabilidade do Nrf2. Neh7 interage com receptor de retinoide-alfa (RXR α). DLG e ETGE são motivos de ligação ao Keap1; DSGIS e DSAPGS são motivos de ligação ao β -TrCP1 (não representado). A sequência inferior representa a proteína repressora do Nrf2, a Keap1 (Kelch-like ECH associated protein 1) e seus quatro domínios: o domínio BTB [Broad complex, Tramtrack, and Bric-à-Bric (BTB) domain] representa o domínio de dimerização do Keap1 e de recrutamento Culina 3-ubiquitina E3 ligase. As regiões de repetição Kelch e a porção C-terminal (CTR) participam da estabilidade de motivos DLG e ETGE ao Nrf2. Adaptado de Tonelli et al (2018) e Hayes & Dinkova-Kostova (2014).

Em condições basais, a expressão constitutiva do Nrf2 é mantida na ausência de indutores e sua concentração se mantém baixa graças à atividade de poliubiquitinação e degradação proteossomal mediada pelo Keap1 (a meia-vida do Nrf2 dentro célula varia de 10 a 30 minutos). O Keap1 (*Kelch like ECH-associated protein 1*), é uma proteína adaptadora do substrato também redox-sensível, uma E3 ubiquitina ligase, em que duas moléculas de Keap1 estão ligadas aos motivos estruturais ETGE e DLG do domínio Neh2 do Nrf2. Ambos os motivos se ligam individualmente a um bolsão hidrofóbico no domínio DC (*double glycine repeat and C-terminal*) do Keap-1 e os resíduos de lisina (K) entre os dois motivos são alvos da ubiquitinação (Ma, 2013; Suzuki & Yamamoto, 2015) (Figura 06).

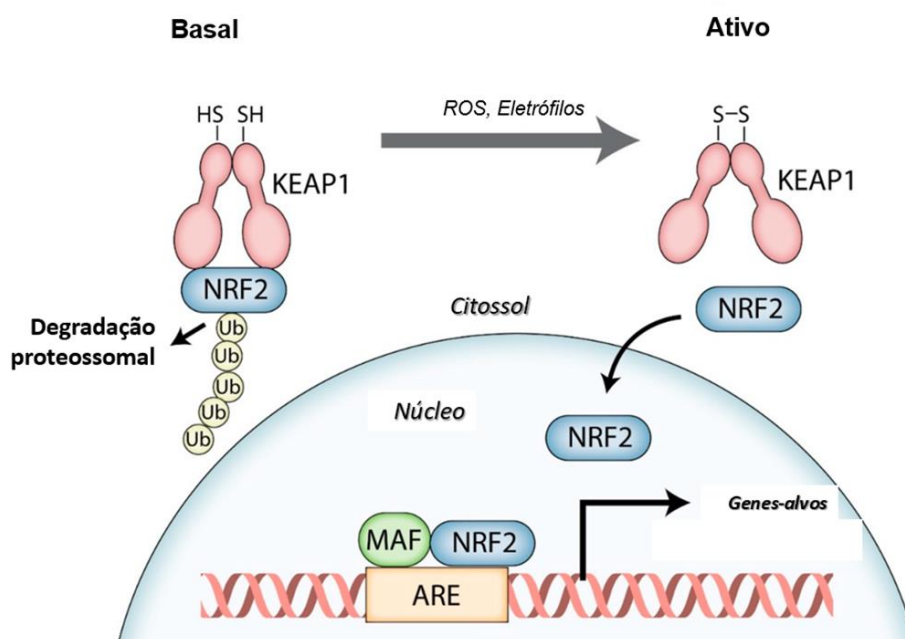


Figura 06: Sinalização do Nrf2-Keap1. Adaptado de Hiebert & Werner (2019).

Essa interação do homodímero-*Keap1* a uma molécula do Nrf2 garante a manutenção de um *pool* constitutivo necessário para iniciar uma resposta à presença de indutores (eletrófilos e oxidantes). Mediante indução, resíduos de cisteínas-sensores do Keap-1 são oxidados o que resulta na sua instabilidade e perda de

atividade E3 ligase, desligando-o do Nrf2. O Nrf2 desligado migra para região nuclear e dimeriza com proteína sMaf (sMafF, sMafG, sMafK). O dímero Nrf2-sMaf reconhece e se liga a regiões de sequência consenso (variável) para elementos de resposta ao Nrf2, a sequência ARE (5'-NTGAG/CNNNGC-3', *Antioxidant Response Element*) apresenta localizados em sítios regulatórios dos promotores de genes permitindo a transcrição de genes, principalmente da classe II (Suzuki & Yamamoto, 2015; Canning et al, 2015; Tonelli et al, 2018). O significado biológico do Nrf2 está associado principalmente à resposta antioxidante através da codificação de genes da classe I (citocromo CYP p450) e classe II (enzimas de detoxificação e proteínas com propriedades antioxidantes) em que a sua ativação desencadeiam as seguintes funções: aumento dos níveis de tióis celulares, da atividade da via das pentoses fosfato e síntese de NADPH (Tebay et al, 2015), aumento da expressão de receptores ligados à exportação e transportadores de resistência a drogas. O fator também acentua o reconhecimento, o reparo e remoção de proteínas danificadas, e vias de reparo no DNA (Espinosa-Diez et al, 2015; Jayakumar et al, 2015), regulação de outros fatores de transcrição como NF-κB e via de autofagia (Morgan & Liu, 2011, Komatsu et al, 2010; Wakabayashi et al, 2010), modificação de expressão de fatores de crescimento, receptores e chaperonas moleculares (Xu & Huang, 2020; Pajares et al, 2018). Além de inibir a inflamação através da inibição da síntese de citocinas (Kobayashi et al, 2016). Ainda, há descrições do envolvimento do Nrf2 em processos de regulação da diferenciação e proliferação hematopoiética e desenvolvimento, porém não é essencial (Chan et al, 1996; He et al, 2020).

Os principais genes regulados pelo Nrf2 estão atrelados à resposta antioxidante, entre eles: a NAD(P)H quinona oxirredutase 1 (NQO-1), a glutamato-cisteína ligase (GCLC), sulfiredoxina(SRXN1) e a tiorredoxina redutase 1

(TRX/TXNRD1), heme oxigenase-1 (HO-1/ HMOX1), glutationa S-transferase e enzimas da síntese de glutationa (GSH) (Ma, 2013). No entanto, na revisão desta tese nos atemos a mais detalhes às enzimas Trx e HO-1 por ser foco de interesse desta pesquisa.

1.3.1.1. Tiorredoxina/Trx

A tiorredoxina (Trx), 12 kD, proteína ubiquamente expressa desde Archea até o mais evoluído dos cordados, é uma enzima que atua em diversos processos de regulação e sinalização redox através de reações de redução de dissulfeto. As Trxs são caracterizadas pela presença de três resíduos conservados de prolina, em que um deles é localizado no motivo CGPC entre as cisteínas catalíticas. Essa enzima está presente, principalmente no citossol e nas mitocôndrias, onde atua catalisando reações de redução de outras enzimas como as Peroxirredoxinas (Prxs, EC 1.11.1.15), além de atuar na redução de oxidantes como o peroxinitrito, protegendo outras proteínas da oxidação e, conseqüente inativação (Nakamura et al, 2005; Collet & Messens, 2010). O sistema Tiorredoxina consiste da proteína Trx, da Trx redutase (TrxR) e do NADPH. A figura 07 ilustra a via de redução pela Trx.

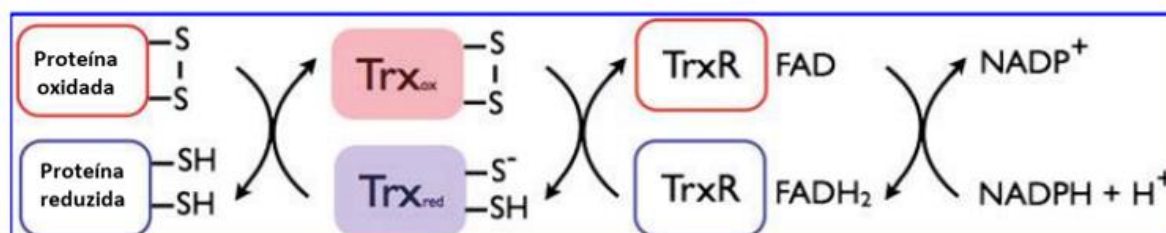


Figura 07: Reação catalisada pela Trx: o esquema representa o fluxo de elétrons em que a Trx reduz proteínas oxidadas com elétrons advindos do NADPH, via Tiorredoxina redutase (TrxR). Adaptado de Collet & Messens (2010).

1.3.1.2. Heme oxigenase-1

A heme-oxigenase-1 (HO-1, EC 1.14.99.3), 32 kD, uma das enzimas reguladas pelo Nrf2, é enzima microsossomal codificada pelo gene *HMOX1*, induzível pelo estresse e catalisa a quebra do grupo heme em biliverdina e posterior bilirrubina. A reação envolve a clivagem oxidativa do grupo heme da hemoglobina (Fe-protoporfirina-IX), catalisada pela HO-1, para gerar biliverdina, a qual é convertida rapidamente para bilirrubina pela biliverdina redutase. Ocorre liberação de ferro livre e monóxido de carbono (CO) em quantidade equimolar (Figura 08). Esse processo é reversível e a oxidação da bilirrubina por espécies lipofílicas resulta na formação de biliverdina, a qual pode ser reduzida novamente (via NADPH), perfazendo um ciclo (Stocker & Perrela, 2006; Naito et al, 2014).

Produtos advindos da atividade da HO-1 são caracterizados como moléculas de citoproteção por possuir propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes (Abraham & Kappas, 2008). A bilirrubina é um *scavenger* de radicais peroxila (Hatfield & Beclay, 2004) e o CO é envolvido na regulação positiva da interleucina-10 (IL-10) e antagoniza os efeitos do receptor de IL-1 (IL-1R), uma citocina pró-inflamatória (Piantadosi et al, 2011). IL-10 é uma citocina anti-inflamatória que ativa a sinalização da STAT3 (Ricchetti et al, 2004).

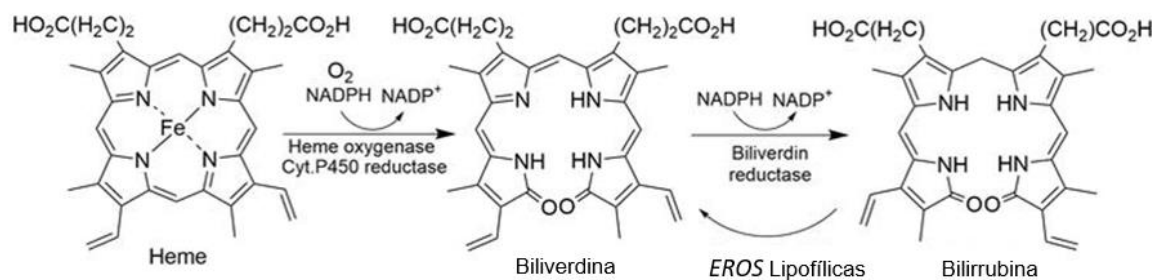


Figura 08: Degradação enzimática do grupo heme. Adaptado de Moussa et al (2019).

1.3.2 NF- κ B

O fator nuclear kappaB (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*, NF- κ B/Rel) compreende uma família de proteínas diméricas estruturalmente relacionadas e conservadas evolutivamente entre os eucariotos, porém ausentes em algumas espécies (Waterhouse et al, 2007; González-Crespo & Levine, M., 1994). Sua primeira descrição foi publicada em 1986 por Ranjan Sen e David Baltimore em que descreve uma proteína de localização subcelular variável (núcleo-citossol), presente em linfócitos B imaturos e que se ligava a uma sequência consenso variável de 9 a 11 bp do DNA (5'-GGGRNWYYCC-3'), o chamado sítio κ B como um *enhancer* para a transcrição de cadeia leve de imunoglobulina (Sen & Baltimore, 1986).

Em mamíferos, a família dos fatores de transcrição NF- κ B reúne cinco polipeptídios-membros: a p50, p52, p65 (RelA), c-Rel e RelB (Figura 09A) codificados pelos genes NFKB1, NFKB2, RELA, REL e RELB respectivamente. Essa família partilha um domínio de dimerização (na região RHD), uma sequência de aproximadamente 300 aminoácidos na porção N-terminal. A classificação realizada por Nabel & Verma (1993) subdivide essas proteínas em duas subfamílias/classes, de acordo com a presença do domínio κ B (domínio de ligação ao DNA ou sítio κ B), localizada na porção C-terminal: a **subfamília Rel** [c-Rel, RelB, RelA (aka p65), *Drosophila* Dorsal e proteínas *Dif*] e as subunidades p105 e p100 ainda imaturas, correspondentes à **subfamília NF- κ B**, as quais passam por processamento via sistema ubiquitina-proteassoma e geram as subunidades menores NF- κ B1(p50) e NF- κ B2(p52) maduras, ao eliminarem a porção C-terminal (sequência de repetidas Anquirinas) (Figura 09A). Todas as proteínas da subfamília Rel podem formar dímeros (homo- ou heterodímeros), com exceção do RelB. Entretanto, heterodímeros são mais frequentes na natureza, devido à proximidade de cargas

opostas em resíduos próximos no cerne hidrofóbico no domínio de dimerização na porção C-terminal, sendo energeticamente mais favorável à sua formação (Chen et al, 1998; Nabel & Verma, 1993; Gilmore, 2006; Perkins, 2007).

A presença do domínio de homologia Rel (RHD) permite a dimerização, translocação por importação nuclear (via a sequência de localização nuclear, NLS) e ligação seletiva ao sítio κ B. Dímeros ao se ligarem ao sítio κ B (em promotores e *enhancers*) de genes-alvos regulam a transcrição e o recrutamento de co-ativadores e/ou co-repressores. O domínio de transativação (TAD) atua como regulador positivo de expressão gênica e está presente apenas na RelA/p65, c-Rel e RelB. A carência dessa região permite a regulação gênica negativa, a não ser que a p50 e/ou p52 esteja associada a outro monômero que apresente essa sequência. Embora os domínios TAD e RHD sejam independentes, ambos apresentam modificações pós-traducionais podendo afetar as interações com o sítio de ligação κ B (Hoffmann et al, 2006; Hayden & Gosh, 2008).

A diversidade das combinações de dímeros permite a regulação de variados genes a partir de interações e seletividade com sítios κ B específicos em promotores e *enhancers* através de estímulos discretos. Das quinze combinações de interações diméricas possíveis matematicamente, apenas doze foram identificadas em organismos vivos. As principais combinações encontradas são os arranjos p50-p50 (NF- κ B1-NF- κ B1), p65-p65 (RelA-RelA), p50-p65 (NF- κ B1-RelA), c-Rel-c-Rel, p50-p65-I κ B (NF- κ B1-RelA-I κ B) (Hoffmann et al, 2006). A literatura descreve o heterodímero p50/p65 genericamente apenas como NF- κ B, considerando-o como o principal mediador da resposta imune em mamíferos e também associado ao desenvolvimento secundário de órgãos linfoides e o mais frequente biologicamente (Huang et al, 1997). Estruturalmente, o NF- κ B/Rel se assemelha a forma de uma

“borboleta” quando ligada ao sítio κ B formando o complexo NF- κ B-DNA (Chen et al, 1998) As diferenças na sequência de aminoácidos da p50 e p65 explicam a estabilidade de dimerização. Os resíduos-chave envolvidos nesse processo estão descritos na Figura 09B-C.

Em condições basais e sem estímulo (estado inativo), na maioria das células, o heterodímero p50-p65 está localizado no citossol e aprisionado nessa região através da ligação não-covalente a uma proteína inibidora do NF- κ B, o I κ B. Ainda em mamíferos, as três principais formas possíveis de ligação podem acontecer com os inibidores do tipo I κ B α , I κ B β e I κ B ϵ , porém I κ B α é o inibidor mais frequente. A ativação dessa via de sinalização é altamente regulada e dependente da degradação desses inibidores com translocação dos heterodímeros do citossol ao núcleo. Um diverso conjunto de sinais pode disparar a sinalização para o NF- κ B. Pahl (1999) descreve 150 ativadores e genes-alvos regulados pelo NF- κ B e a maioria participa da resposta imune à inflamação (principalmente genes de resposta primária como sinalização TNF e IL-1 β) e ao estresse (entre eles a NOS2 e a ciclooxigenase, COX-2).

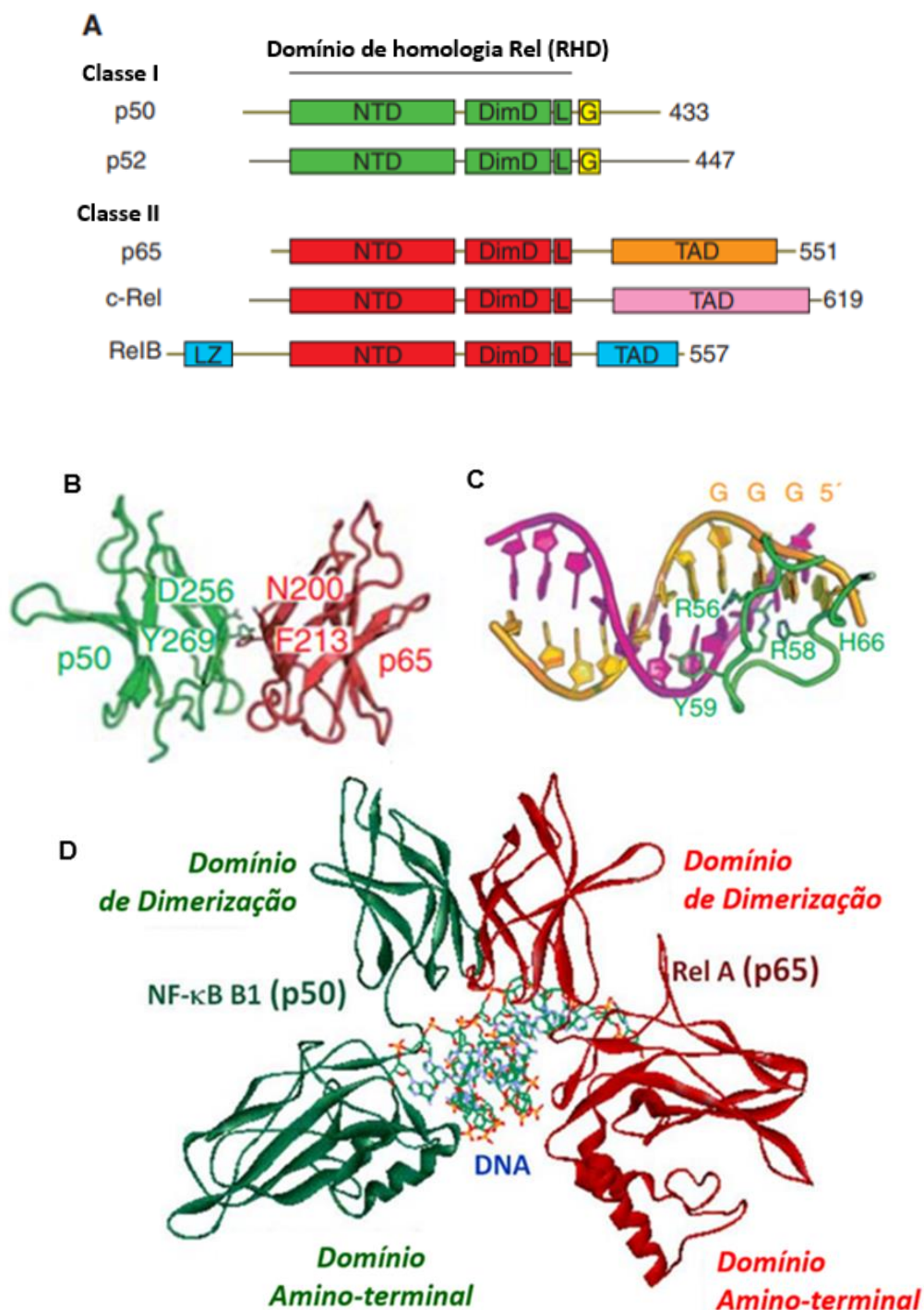


Figura 09: Família de NF- κ B em mamíferos (**A**), cinco proteínas são transcritas pelo genoma em mamíferos (p50, p52, p65, c-Rel e RelB). Cada uma das subunidades contém um domínio de homologia Rel (DHR), esse consiste de dois domínios, um domínio N-terminal (NTD) e um domínio de dimerização (DimD), ligado por uma alça curta flexível ao domínio C-terminal também flexível, contendo uma região de sinal de localização nuclear (L). As subunidades p65, c-Rel e RelB apresentam um domínio de transativação (TAD) e a cauda C-terminal íntegra. LZ representa região de zíper de Leucina; G representa sequência rica em Glicina; em (**B**) a representa a conformação em fita da região RHD quando complexada a estrutura do DNA. As figuras **C** e **G** representam a estrutura do complexo NF- κ B1-RelA-DNA, duas subunidades do NF- κ B B1/p50 (em verde) e RelA/p65 (em vermelho). (**E**) representa os domínios de dimerização e os aminoácidos-chaves responsáveis pela

interação. A representação da estrutura de fita é vista abaixo da hélice do DNA e o cerne hidrofóbico (posição longitudinal em C, transversal em G). Adaptado de Huxford & Ghosh (2009) e Chen et al (1998).

Ao se ligarem a esses receptores de superfície (receptores do tipo *Toll*, TLRs, receptores de citocinas e receptores de antígenos como TCR, receptor de célula T e TCB, receptor de células B) promovem uma resposta intracelular facilitada pela presença de proteínas adaptadoras TRAF e/ou RIP para o domínio citosólico do receptor, recrutando o complexo quinase IKK (composto pelas subunidades catalíticas, IKK α e IKK β e duas moléculas do domínio regulatório, NEMO, *NF- κ B essential modifier/modulator*, ou ainda descrita como IKK γ). Esse complexo, especialmente a subunidade catalítica IKK β , fosforila resíduos de serina nas posições 32 e 36 do I κ B α conduzindo-o à ubiquitinação e conseqüente degradação. Desligado de seu inibidor, o dímero transloca para o núcleo e se liga à seqüência κ B [ou *enhancer(s)*] para uma resposta celular transiente e cíclica como outros fatores de transcrição constitutivos (Figura 10). Embora a atividade do NF- κ B seja induzível na maioria das células, ele pode ser detectado na sua forma constitutiva, como proteína nuclear em linfócitos B, macrófagos, neurônios e células tumorais (Perkins, 2007; Tanaguchi & Karin, 2018; Oeckinghaus & Ghosh, 2009).

Já a via de sinalização não-clássica (não-canônica) é ativada por um conjunto menor de ativadores/receptores de sinais (linfotoxina B, LT β ; fator ativador de células B e ligantes para o CD40) e resulta na ativação da subunidade catalítica IKK α e da quinase indutora do NF- κ B (NIK), seguida da fosforilação da p100 pela subunidade alfa do IKK. O processamento para a sua forma madura em p52 leva à dimerização com o monômero RelB (p52-RelB) e ativação de sítios κ B distintos. A via não-canônica está atrelada ao desenvolvimento de órgãos linfoides secundários (Gilmore, 2006; Perkins, 2007; Hayden & Gosh, 2009). Os mecanismos de

terminação da sinalização do NF- κ B é ainda é pouco compreendido, ou mesmo, como na sua forma ativa, o complexo NF- κ B-DNA é reprimido. Entretanto, sabe-se que a regulação negativa da família NF- κ B se dá através modificações pós-traducionais como acetilações, fosforilações e ubiquitinação de componentes essenciais à resposta de ativação e regulação negativa de fatores de transcrição e interferências de outras vias (Hayden & Ghosh, 2008; Pradère et al, 2016; Dorrington & Fraser, 2019).

O significado biológico dessa família de fatores de transcrição está associado a uma gama de ações pleotrópicas, envolvendo vias distintas de regulação à resposta imune inata e adaptativa, e da inflamação. O NF- κ B medeia processos de morte celular por apoptose, adesão, proliferação, resposta ao estresse, remodelamento tecidual, angiogênese e metástase. Além disso, pode interferir em vias de sinalização atípicas que podem ser dependentes e independentes do complexo IKK (Perkins, 2007, Hayden & Gosh, 2008).

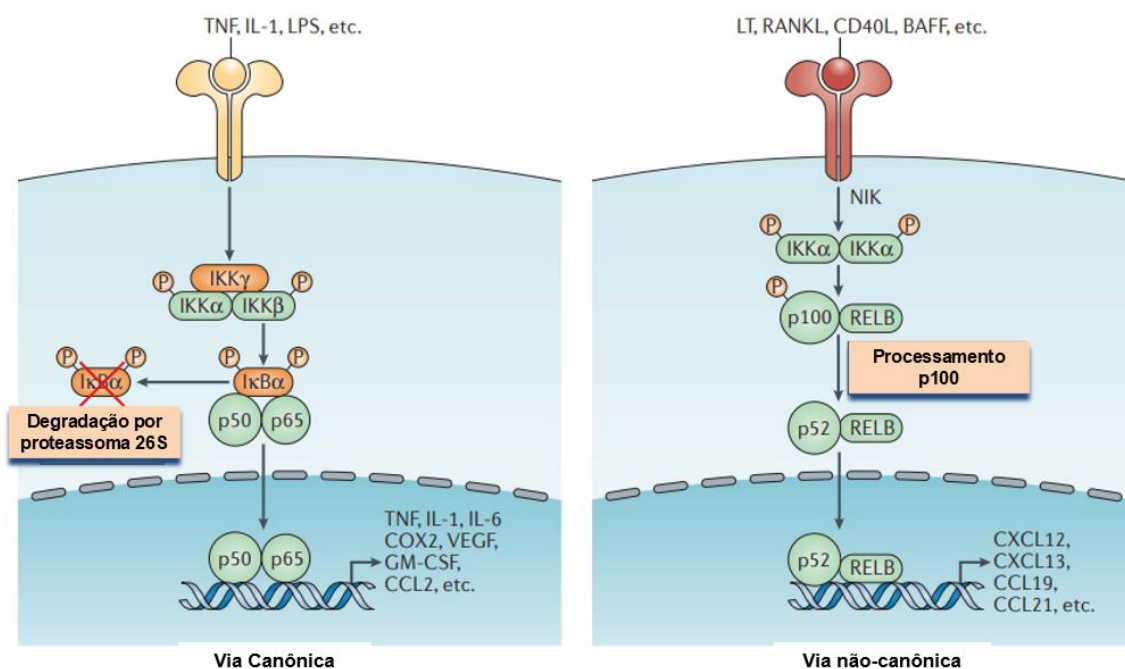


Figura 10: Via de transdução de sinal do NF- κ B. Na via canônica (clássica), dímeros do NF- κ B1/RelA são mantidos no citoplasma por interação com duas moléculas I κ B independentes (em geral, I κ B α). A interação do ligante ao um receptor de superfície do TNF α -R, IL-1 e os ligantes dos receptores do *tipo-Toll* (TRL) e/ou engajamento de receptores de células B e T recruta proteínas adaptadoras (TRAF e RIP) para o domínio citosólico do receptor. Esses receptores, por sua vez, recrutam o complexo IKK que contém as subunidades catalíticas α e β e duas proteínas sensoras (NEMO) diretamente nos adaptadores citoplasmáticos (em virtude da atividade ubiquitina ligada a K63 de NEMO). Esse grupo de moléculas ativa o complexo IKK, e por conseguinte, fosforila os resíduos S32 e S36 promovendo o desligamento do I κ B e subsequente degradação pelo proteossoma 26S. A via não-canônica (não-clássica) é ativada por linfotoxina (LT), ligante do receptor ativador kappaB (RANKL), ligante do receptor CD40 e fator de ativação de células B da família TNF (BAFF) e sua atuação em uma função essencial à indução de genes e estruturas relacionadas no microambiente tumoral e desenvolvimento de órgãos linfoides. LPS pode atuar em concentrações discretas e induzir essa via não-clássica. Adaptado de Taniguchi & Karin, 2018.

1.3.3 Janus Kinases e STATs

As Janus quinases (JAK) são transdutores de sinais conectadas a ativadores de transcrições (STAT). Compreendem uma das maiores vias de sinalização conversora de sinal de citocinas e fatores de crescimento envolvidos na regulação da proliferação e diferenciação de células imunes, apoptose e vias de sobrevivência celular. As JAK/STATs representam as vias de sinalização com mecanismos mais

conservados evolutivamente em metazoários para diferentes grupos de citocinas e ligantes, incluindo interferons (IFNs) e interleucinas, fatores estimuladores de colônia e hormônios (eritropoietina, hormônio do crescimento e prolactina) (Bromberg & Darnell Jr., 2000; O'shea et al, 2015).

As STATs compreendem uma família de sete membros de fatores de transcrição latentes: a STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5(a/b) e STAT6 codificados por sete diferentes genes respectivamente, distribuídos em três diferentes cromossomas identificados em mamíferos: *Stat1* e *Stat4* estão localizados no cromossoma 2 (banda q12 a q13), *Stat3*, *Stat5a*, e *Stat5b* estão localizados no cromossoma 17 (banda q11-1 a q22), e *Stat2* e *Stat6* estão localizados no cromossoma 12 (banda q13 a q14-1), codificando proteínas com sequências de ~750-850 resíduos de aminoácidos (Lim & Cao, 2006;).

As proteínas STATs compartilham cinco domínios estruturais e funcionais: (1) domínio amino-terminal, um domínio *coiled-coil*, um domínio de ligação ao DNA (DBD), domínio *Linker* (domínio de ligação), e um domínio de ativação SH2 (*Sr2 Homology 2*) (Darnell Jr., 1997; Lim & Cao, 2006). Embora as STATs apresentem similaridade estrutural, cada membro apresenta um domínio de ativação transcricional (**TAD**) que atua como sensor a um conjunto de estímulos extracelulares específicos (Kisseleva et al, 2002). O domínio N-terminal está envolvido com a translocação nuclear e ativação; o domínio **coil-coiled** (bobina em espiral) apresenta a ativação da via por fosforilação de tirosinas; o domínio **DBD** facilita o reconhecimento das STATs às sequências consenso nos promotores dos genes; o domínio **Linker** conecta o domínio DBD ao domínio de ativação e regula o processo de transcrição; e o domínio **SH2** atua no recrutamento de STATs para os

receptores de citocinas, e a ligação da STAT a JAK (JAK-STAT) (R  b   et al, 2013; Hirano et al, 2000) (Figura 11).

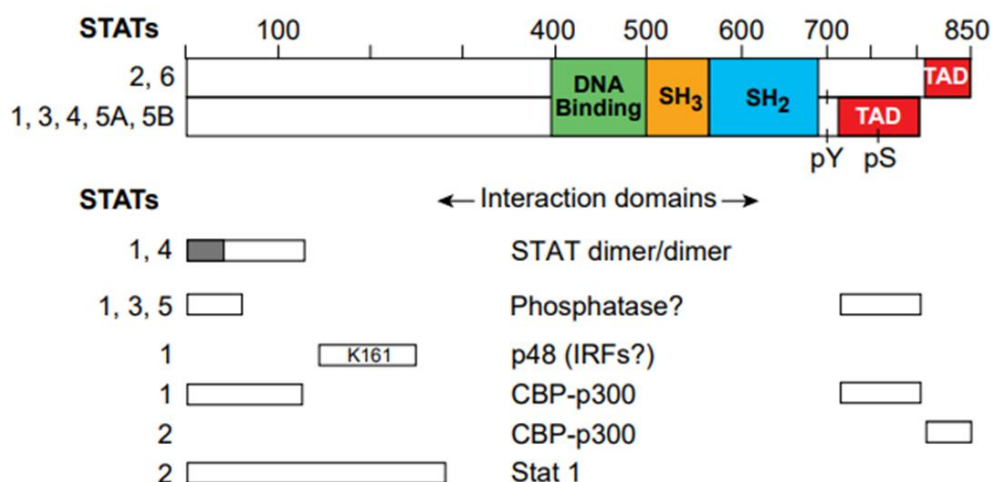


Figura 11: Estrutura das STATs. Retirado de Darnell Jr. (1997).

O modelo de ativa  o da via depende de uma série de três fosforila  es realizadas pelas JAKs através de uma intera  o não-covalente para receptores específicos. A dimeriza  o/oligomeriza  o causada pela fosforila  o leva   opo  i  o estrutural da JAK e   transforila  o de resíduos de Tyr, liberando sua atividade catalítica intrínseca desencadeada pela liga  o da citocina ao receptor. A via canônica de ativa  o da JAK/STAT se inicia pelo recrutamento das STATs pelas JAKs através pela fosforila  o de um único resíduo de Tyr localizados no domínio SH2 da STAT (em torno do resíduo 700). Uma vez fosforilada, são desligadas do receptor e translocam para o núcleo. No núcleo, esses fatores reconhecem suas sequências consenso e regulam uma variedade de genes (Levy & Darnell Jr, 2002).

Na via canônica, o estímulo pelas citocinas como IL-6 e IL-10, leva   fosforila  o do resíduo (Y705) da STAT3 pela JAK, com ativa  o, dimeriza  o e entrada no núcleo, ligando-se   sequência consenso GAS (TTC/ANNNG/TAA) ou

(AGTTTCNNTTCNC/T) (Figura 12). STAT3 é realizada por IFNs ou por fatores de crescimento, ou mesmo, pela ativação de receptores como o receptor de crescimento epidérmico (EGFR, um proto-oncogene tirosina quinase), ou ainda, pela via de sinalização MAPK/ERK que regula a expressão de genes envolvendo a proliferação celular, ocorre a diferenciação específica e a promoção de uma resposta inflamatória (Shuai & Liu, 2003).

A ativação não-canônica da STAT3 pode ocorrer através da fosforilação do resíduo S727, sendo regulada por meio da PKC, MAPKs e CDK5. Enquanto a fosforilação da Y705 é essencial para sua dimerização e translocação nuclear, a fosforilação do resíduo S727 é necessária para alcançar a máxima resposta da ativação da STAT3 (Lufe et al, 2007; Schuringa et al, 2001; Wen & Darnell Jr, 1997). A desativação desta via pode acontecer através da acetilação do resíduo K685 (Hirano et al, 2000; Yu et al, 2014). Para outras STATs, a regulação negativa e a inativação acontecem principalmente através de proteínas contendo domínio SH2 induzível por citocina (CIS), reguladores de supressão de citocinas, as SOCS (*suppressors of cytokine signaling*), proteína de ligação à JAK (JAB), inibidor de STAT induzido por STAT (SSI), proteína de inibidora de STAT ativada (PIAS) e fosfatases, ou pela via ubiquitina-proteassoma. Essas proteínas impedem a ativação (fosforilação) da STATs (Lim & Cao, 2006).

A importância e o significado biológico da STAT3 estão atrelados à resposta de imunossupressão, ao ambiente tumoral e à polarização de células para perfis M2 (Rébé et al, 2013).

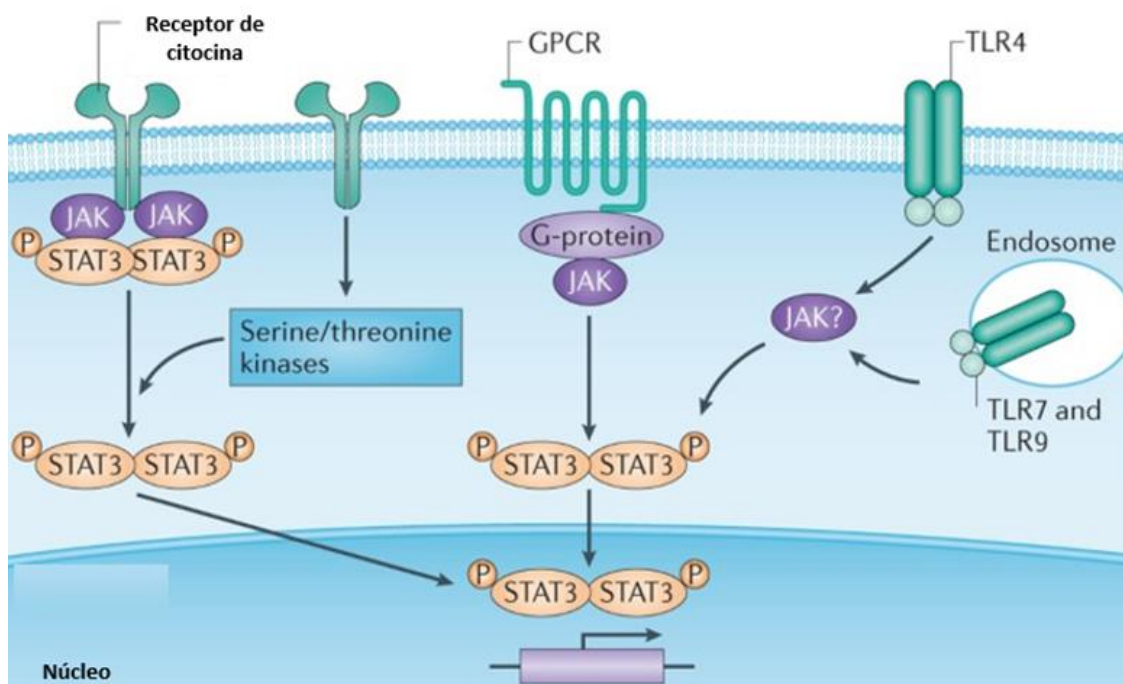


Figura 12: Sinalização da JAK/STAT3. Adaptado de Yu et al (2014).

2. Justificativa

A polarização de macrófagos é um processo regulado por muitas vias de sinalização e pelo microambiente, envolvendo vias de sobrevivência e de viabilidade celular em que a concentração e tempo de exposição a esses sinais definem um padrão de expressão fenotípico (Fraternale et al, 2015). Os macrófagos são regulados por uma diversidade de sinais metabólicos e imunoregulatórios local e/ou sistêmico que influenciam suas condições basais e de respostas aos sinais de dano, entre esses sinais está o ácido úrico (Shi et al, 2003). Embora seja bastante descrito na literatura que metabólitos solúveis influenciem a resposta de polarização de células fagocíticas, pouco é sabido como essas moléculas atuam e modulam a resposta inicial de ativação à inflamação em macrófagos e a resposta imune primária (*priming*), além da participação de via redox-sensíveis nesse processo (Deng et al, 2013; Sobotta et al, 2015; Glass & Natoli, 2016).

Reconhece-se que o ácido úrico está envolvido em uma multiplicidade de doenças inflamatórias como artrite gotosa, síndrome metabólica, doenças cardiovasculares e neurológicas (Dehlin et al, 2020; Foster et al, 2020; Proctor, 2008; Borghi et al, 2017; Pakpoor et al, 2015). Entretanto, ainda existem muitas lacunas na literatura sobre os mecanismos pelos quais o ácido úrico modula a resposta inflamatória. Esta tese visa contribuir na elucidação de vias de polarização deflagradas pela exposição ao ácido úrico solúvel em linhagem de células diferenciadas em macrófagos.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Este trabalho tem por objetivo analisar os efeitos do ácido úrico solúvel sobre proteínas sensíveis à modulação redox e de marcadores de polarização de macrófagos *in vitro*.

3.2. Objetivos Específicos

- . Analisar o perfil de marcadores de polarização de macrófagos pelo tratamento com ácido úrico na sua forma solúvel por citometria de fluxo e Western-blotting;
- . Avaliar o perfil de citocinas liberadas pelos macrófagos após a exposição ao ácido úrico na sua forma solúvel por citometria de fluxo;
- . Investigar as possíveis vias de sinalização redox e inflamatória na polarização de macrófagos por Western-blotting e por microscopia de fluorescência com alto conteúdo de imagens (HCI);
- . Analisar a viabilidade celular após a incubação com ácido úrico.

4. Materiais & Métodos

4.1 Reagentes & Anticorpos

Todos os reagentes utilizados deste estudo foram obtidos do fabricante Sigma-aldrich/Merck (Reino Unido). A tripsina 0,25% foi obtida de LGC Biotecnologia (BR30045-01), Cotia, Brasil. O *kit* BD *Bead Array (CBA) Inflammatory Human Cytokines* (Catálogo No. 551811) foi utilizado para quantificação de citocinas no sobrenadante de cultura de células. A descrição de todos os anticorpos utilizados neste trabalho está localizada na Tabela 1 abaixo.

Tabela 02. Lista de Anticorpos Primários, Conjugados e Secundários utilizados

Especificidade	Clone/Clonalidade	Isotipo	Hospedeiro	Fabricante	Nº Cat.
Arginase-1	sl6arg/Monoclonal	IgG1, κ	Mouse	Invitrogen	#14-9779-82
β-Actina	mAbcam 8226 /Monoclonal	IgG1	Mouse	Abcam	ab8226
Actina	Policlonal	IgG	Rabbit	Sigma-aldrich	A2103
Caspase-1	Policlonal	IgG	Rabbit	Abcam	ab17820
CD11b	EPR1344/Monoclonal	IgG	Rabbit	Abcam	ab133357
CD14-FITC	MEM-15/Monoclonal	IgG1	Mouse	EXBIO	IF-293-T100
CD16-PE	3G8/Monoclonal	IgG1	Mouse	EXBIO	IP-646-025
CD29/Intergrina β1	LM609/Monoclonal	IgG1	Mouse	Millipore-Merck	MAB1976
CD36	Policlonal	IgG	Rabbit	Abcam	ab78054
CD40	Policlonal	IgG	Rabbit	Abcam	ab58391
CD45-PE-Cy7	HI30 (RUO)/Monoclonal	IgG1, κ	Mouse	BD Pharmingen™	557748
CD68	KPI/ Monoclonal	IgG1, κ	Mouse	eBioscience Invitrogen	#14-0688-82
CD80-FITC	2D10.4 /Monoclonal	IgG1, κ	Mouse	eBioscience Invitrogen	#11-0809-42
CD163	GHI/61/Monoclonal	IgG1, κ	Mouse	BioLegend	#333602
CD206	15-2/Monoclonal	IgG1	Mouse	Abcam	ab8918
HO-1	HO-1-1/Monoclonal	IgG1	Mouse	Abcam	ab13248
iNOS/NOS	Clone 6/iNOS/NOS Tipo II(RUO)/ Policlonal	IgG2a	Rabbit	BD Pharmingen™	610333
Lamina B1	Policlonal	IgG	Rabbit	Abcam	ab16048
LC3	Policlonal	IgG	Rabbit	Sigma-aldrich	L8918
NF-κB p65 (c-20)	Policlonal	IgG	Rabbit	Santa Cruz Biotechnology	sc-372
Nrf2	EP1808Y/Monoclonal	IgG	Rabbit	Abcam	ab62352
PDI	Policlonal	IgG	Rabbit	Sigma-aldrich	P7496
Peroxiredoxin-1/Prx-1	3G5/Monoclonal	IgG1	Mouse	Abfrontier	LF-MA0214
Peroxiredoxin-2/Prx-2	Policlonal	IgG	Rabbit	Sigma-Aldrich	R8656
Peroxiredoxin-4/Prx-4	9A3/Monoclonal	IgG	Rabbit	Sigma-Aldrich	07-612
p62	SQSTM1/p62 Monoclonal	IgG2a, κ	Mouse	Abcam	ab56416
STAT3	124H6/Monoclonal	IgG2a	Mouse	Cell Signaling	#9139
SOCS3	1B2/Monoclonal	IgG1, κ	Mouse	Thermo Fisher	37-7200
Thioredoxin/TRX	Policlonal	IgG	Rabbit	Abcam	ab26320
Anticorpo sec. (Conjugado)	Clone/Clonalidade	Hospedeiro/ Isotipo	Reatividade	Fabricante	Nº Cat.
Anti-Mouse IgG (Fab specific)- Peroxidase antibody produced in goat	Policlonal	Goat/IgG	Mouse	Sigma-aldrich	A9917
Anti-Rabbit IgG (whole molecule)HPeroxidase	Policlonal	Goat/IgG	Rabbit	Sigma-aldrich	A0545
Goat anti-Mouse IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed, Alexa fluor 488	Policlonal	Goat/IgG	Mouse	ThermoFisher Scientific	A-11029
Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed, Alexa Fluor 647	Policlonal	Goat/IgG	Rabbit	ThermoFisher Scientific	A-21244
HRP Goat Anti-Rabbit IgG Antibody (Peroxidase)	Policlonal	Goat/IgG	Rabbit	Vector Laboratories	PI-1000

4.2 Cultura & diferenciação celular

Células de linhagem de leucemia monocítica (THP-1) foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (THP-1; BCRJ, Rio de Janeiro, Brasil) e mantidas em ambiente umidificado a temperatura controlada a 37°C com 5% CO₂ em meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 (Vitrocell Embriolife, Campinas, Brasil) suplementado com 20% (v/v) de soro fetal bovino inativado, SFB (Vitrocell & Embriolife, Campinas, Brasil) e 60 µg.mL⁻¹ de Penicilina (Sigma-aldrich, P3032), 100 µg.mL⁻¹ de Estreptomicina (Sigma-aldrich, S9137) estéril, pH=7,4. As células foram mantidas em cultura em densidade 2 a 4 × 10⁵ células.mL⁻¹ em garrafas plásticas de cultura (75 ou 175 cm³) e utilizadas por até 12 semanas após o descongelamento.

As células THP-1 foram diferenciadas em macrófagos-símile (1 × 10⁶ células.mL⁻¹) utilizando 5 ng de 12-miristato-13-acetato de forbol (PMA, Sigma-Aldrich, código 524400) por 48 h em placas de seis poços de fundo chato (Figura 13) (Corning Costar®) (Park et al, 2007).

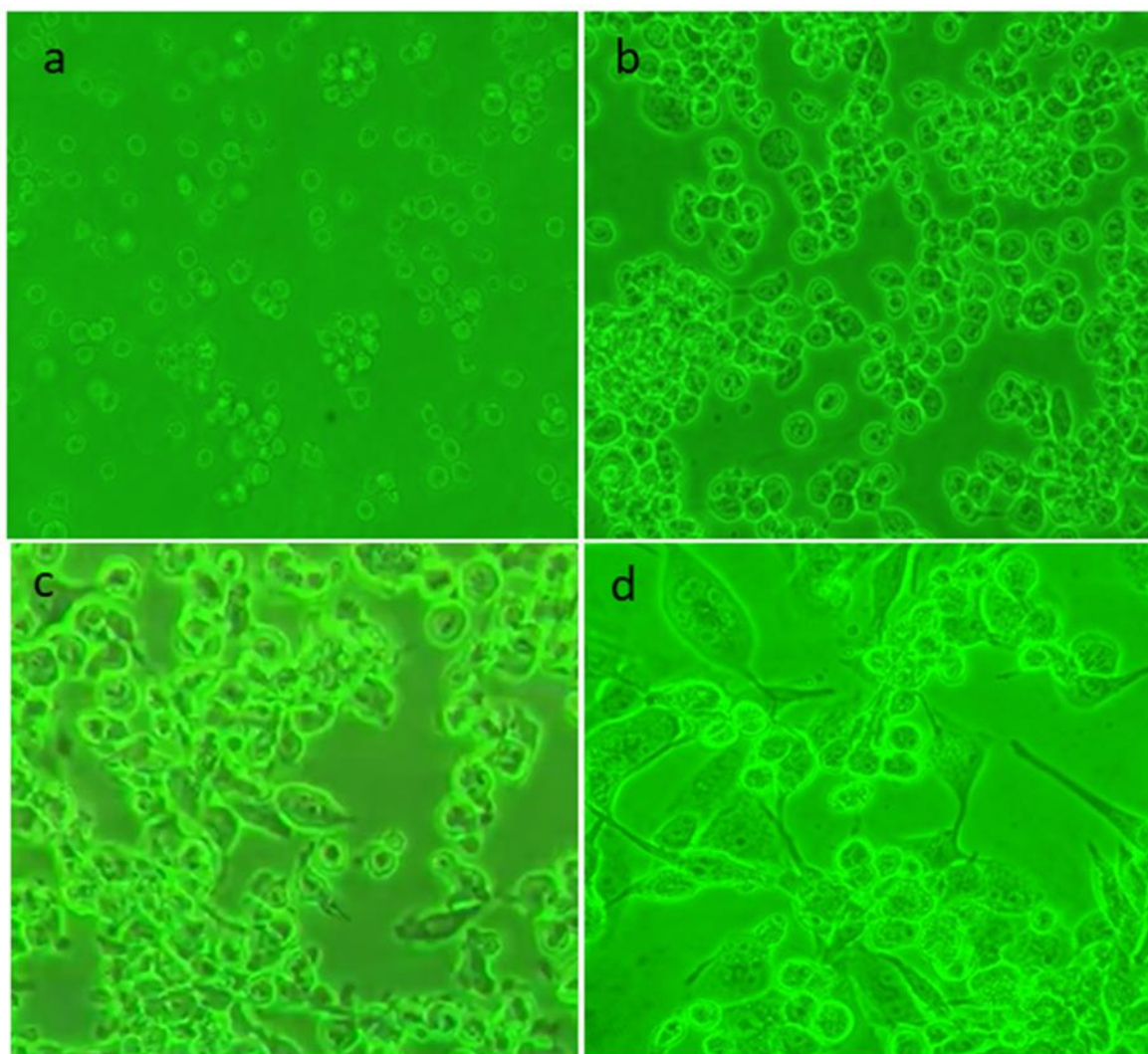


Figura 13: Morfologia de células THP-1 (Cell line: human leukemic monocyte) não-diferenciadas (a), diferenciadas após 12 h (b), 24 h (c) e 48 h (d) em macrófagos-símile por acetato miristato de forbol (PMA, $5 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$). Células THP-1 crescidas em suspensão já apresentam aderência ao plástico e características morfológicas de macrófagos típicos. Imagens representativas de microscópio óptico invertido (Nikon Eclipse TS100, 400x).

4.3 Tratamento com Ácido úrico solúvel

Após o período de diferenciação de 48 h anteriormente descrito, o meio RPMI 1640 em que as células THP-1 foram diferenciadas foi substituído por um novo meio RPMI 1640 sem SFB e tióis [(glutaciona, metionina e cistina) Vitrocell & Embriolife, Campinas, Brasil], suplementado com ácido úrico solúvel solubilizado em meio básico (20 mM ácido úrico e 40 mM NaOH) com as seguintes concentrações finais:

100 μM , 300 μM , 500 μM , 750 μM ou 1 mM, Sigma-Aldrich, U2625, lote #BCBM5312V] por 8 h e/ou 24 h.

Para avaliar o fenótipo produzido pelo ácido úrico solúvel, induziu-se um controle positivo de polarização das células para o subtipo M1 (inflamatório) e outro controle para o subtipo M2 (anti-inflamatório). O subtipo M1-condicionante foi produzido pela incubação com 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de LPS (L6529, Sigma-Aldrich) + 20 ng/mL de IFN γ (713906, BioLegend). O subtipo M2a-condicionante foi produzido pela incubação com 20 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ de IL-4 (574006, BioLegend) (Kadl et al, 2010; Forrester et al, 2018). Macrófagos não-polarizados (M Φ) foram gerados a partir da diferenciação por 48h com PMA, conforme descrito acima. Um grupo de células foi tratado com *tert*-butil hidroquinona, tBHQ (20 μM), um ativador do fator de transcrição Nrf2 e utilizado como controle positivo de ativação desse fator de transcrição (Imhoff & Hansen, 2010). Um grupo controle em que as células foram mantidas em RPMI 1640 completo foi utilizado para identificar se a manutenção das células por 24 h em meio sem antioxidantes e sem SFB afetaria as vias que estávamos estudando.

4.3 Ensaio de Citometria de Fluxo

Após a diferenciação e os tratamentos descritos acima, as células foram lavadas com tampão fosfato salina (137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 4,3 mM de Na₂HPO₄-7H₂O, 1,4 mM de KH₂PO₄, pH=7,4) e descoladas das placas de cultivo usando uma solução de 5 mM de EDTA dissolvido em tampão fosfato-salina/5-10 minutos. As células que permaneceram aderidas foram gentilmente descoladas usando raspador de células, centrifugadas a 400xg por 10 minutos e fixadas em solução tamponada de paraformaldeído 4%, pH 7,2 (Sigma-Aldrich, cat. n° 158127) em temperatura ambiente por 30 minutos. Sítios de ligações inespecíficas (Fc) foram

bloqueados utilizando solução 4% SFB (Vitrocell Embriolife, Campinas, Brasil) em PBS, pH=7,4 em temperatura ambiente por 30 minutos.

Para detecção de marcadores de superfície e proteínas intracelulares, as células foram incubadas com os anticorpos primários e/ou conjugados *overnight* (tempo mínimo de incubação 16 h) sob leve agitação. Os anticorpos utilizados para caracterizar os perfis de diferenciação foram: anti-CD14-FITC (1:10), anti-CD16-PE (1:10) e anti-CD11b (1:100); anti-CD45-PerCP-Cy7 polarização para M1 foram: anti-iNOS (1:100), anti-CD80-FITC (1:20), anti-CD86-PE-Cy5 (1:20), anti-SOCS3 (1:500), anti-CD68 (1:100); ou polarização para M2 foram: anti-CD206 (1:100), anti-CD163 (1:50), anti-CD36 (1:100) e anti-CD40 (1:200). Outras proteínas foram incluídas neste estudo para verificar a possível regulação produzida durante o tratamento de ácido úrico e fenótipos híbridos: anti-HO-1 (1:100) (Naito et al, 2014), anti-Tiorredoxina/TRX (1:200) (Kadl et al, 2010), anti-STAT3 (1:200) (Koscó et al, 2013; Sobotta et al, 2015) anti-Nrf2 (1:100) (Kadl et al, 2010), anti-Prx1(1:500) e anti-Prx2 (1:500) (Valero et al, 2015).

As amostras foram analisadas em um sistema acústico de citometria de fluxo composto de quatro cores e três lasers, Attune® *Acoustic Focusing Cytometer* (Life Technologies, Thermo Scientific). As voltagens de fluorescência e limites foram ajustadas utilizando-se células não marcadas para cada grupo. *Forward Scatter* (FSC) e *Side Scatter* (SSC) foram utilizados para identificar populações, medir granulidade e tamanho das células. A autofluorescência foi determinada no canal de fluorescência BL-1 (laser azul, excitação 488 nm, emissão 530/30). A imunofluorescência foi comparada com os respectivos controles não marcados ou apenas marcada com anticorpos secundários. Ao menos vinte mil eventos foram

gravados para cada amostra. Todos os dados foram analisados pelo programa FlowJo™, versão 10.6.1 (tree Star Inc., Ashland OR, USA).

4.4 Dosagem de Citocinas

Para a quantificação de citocinas no sobrenadante foi utilizado método multiplex de CBA que quantifica simultaneamente seis citocinas inflamatórias por citometria de fluxo: Interleucina-1 β , Fator de necrose tumoral (TNF α), Interleucina-6 (IL-6), Interleucina-8 (IL-8), Interleucina-10 (IL-10) e Interleucina-12p70 (IL-12p70) através do *kit Cytokine Bead Array measurements, the Human Inflammatory Cytokines* (CBA) (Catálogo No. 551811, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) e seguindo suas recomendações.

As células foram diferenciadas e tratadas conforme descrito nos itens 4.2 e 4.3, os sobrenadantes foram coletados e centrifugados (1500 rpm por 10 minutos,). Os sobrenadantes livres de células foram imediatamente congelados em gelo seco e mantidos devidamente estocados a -80 °C até a análise. Para a análise, as amostras foram imediatamente descongeladas e homogeneizadas. O método CBA contém uma mistura de seis grupos de microesferas modificadas de carboxilato associados a anticorpos monoclonais conjugados ao fluoróforo ficoeritrina (PE) e, quando incubados com a(s) amostra(s)-teste, formam um sanduíche que emite diferentes intensidades de fluorescência no canal vermelho. As análises foram adquiridas em aparelho FACS Canto II (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). A curva de calibração foi determinada por um padrão de citocinas e apresentou um limite de detecção de 20 pg.mL⁻¹ a 5.000 pg.mL⁻¹. A fluorescência emitida pelo complexo-sanduíche foi medida em quantidade mínima de 300 eventos para cada

amostra. Os dados foram analisados usando programa FCAP Array™, versão 3.0 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

4.5 Fracionamento celular, enriquecimento nuclear e citosólico

Para avaliar a abundância relativa de proteínas fosforiladas e não-fosforiladas e o total de proteínas possivelmente reguladas pelo tratamento com o ácido úrico solúvel, as amostras foram preparadas para obter as frações nuclear e citosólicas enriquecidas. Para tanto, células tratadas com ácido úrico solúvel foram lavadas com PBS estéril aquecido (pH 7,4) e lisadas com tampão de lise A [10 mM de HEPES (pH 7,9), 10 mM de KCl, 0,1 mM de EDTA, 0,1 mM de EGTA, 1 µM de DTT] + coquetel inibidor de protease (Cat. n. 11836153001, Roche®) com auxílio de um raspador de células e mantidas no gelo por 15-30'. Em sequência, as amostras receberam 17 µL de IGEPAL 10% e o lisado foi homogeneizado vigorosamente por 15 segundos. O lisado foi centrifugado por 800xg por 5 minutos a 4°C para separar a fração citosólica. A fração citosólica corresponde ao sobrenadante e foi reservada. O precipitado restante foi suspenso em 65 µL de tampão B [20 mM de HEPES (pH 7,9), 0,4 M de NaCl, 1 mM de EDTA, 1 mM de EGTA, 1 µM de DTT]®, incubado em gelo por 15 minutos e homogeneizado a cada 2 minutos/15". A fração enriquecida nuclear foi obtida após a centrifugação de 15.000xg/5' a 4°C.

Para a extração proteica total, as células foram lavadas com PBS aquecido para 37°C (pH=7,4) e raspadas com 80-100 µL de tampão RIPA (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, IGEPAL 1%, SDS 0,1% e deoxicolato de sódio 0,5%) + inibidor completo de proteases (cat. n. 11836153001, Roche®), depois incubadas em gelo por 15 a 30 minutos. As amostras foram centrifugadas por 20.000 xg/15' a 4°C.

4.6 Quantificação total de proteína

A concentração total de proteínas no lisado celular foi determinada pelo método colorimétrico de Bradford (Bradford, 1976). Para a quantificação, foi realizada uma curva de calibração (0 a 10 µg/mL) utilizando como proteína padrão a albumina de soro bovino (BSA). A leitura da absorbância foi realizada em 595 nm.

4.7 SDS-PAGE e Immunoblotting

As frações enriquecidas do núcleo e citossol obtidas através do protocolo descrito no item 4.5 foram separadas por eletroforese em gel de resolução de 10-15% de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) em voltagem constante (200 volts por 40 a 60 minutos) e transferidas para membranas de PVDF (cat#1620177, Bio-Rad) utilizando método de transferência úmida. As membranas foram bloqueadas em 5% de leite desnatado (Molico®) em TBS-T (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,9% NaCl e 0,1% Tween 20) por 2 horas. Os anticorpos primários anti-β-actina (1:2000), anti-arginase-1 (1:500), anti-caspase-1 (1:500), anti-LC3 (1:1000) anti-NF-kB p65 (1:250), anti-STAT3 (1:1000), anti-Nrf2 (1:2000), anti-PARP1 (1:1000), anti-Prx1 (1:10.000), anti-Prx2 (1: 10.000), anti-tioredoxina (1:1000) e anti-β1-Integrina (1:250) foram incubados *overnight* em câmara fria. As membranas foram lavadas três vezes por 10 minutos com TBS-T e então incubadas respectivamente com o anticorpo secundário (1:10.000) por 2 h. Os imunoblottings foram revelados por método ECL (*Clarity Western ECL Substrate kit*, Cat#170-5061, Abcam).

O controle de carregamento foi verificado utilizando uma proteína ubíqua estrutural actina (anticorpo anti-actina 1: 2.000, código A2103) ou β-actina (1: 2.000, código ab8226), ou ainda, normalização com a coloração de Comassie através de 25-30 µg de extrato celular e/ou proteína purificada. O *stripping* das membranas foi

realizado quando a proteína investigada apresentava peso molecular próximo à proteína *housekeeping* de normalização. O equipamento UVITEC 4.7 Cambridge foi utilizado para a obtenção das imagens. As membranas foram cortadas para a montagem e combinação de figuras. Todas as imagens das membranas de Western-blotting foram analisadas pelo programa ImageJ®.

4.8 Ensaios de translocação nuclear do NF-κB p65, Nrf2 e STAT3

As células foram diferenciadas e tratadas conforme descrito no item 4.2. Em sequência, a cultura foi lavada com PBS aquecido em mesmo volume do meio aplicado para diferenciação (137 mM de NaCl, 2,7 Mm de KCl, 10 mM de Na₂HPO₄, 1,8 mM de KH₂PO₄, 1 mM de CaCl₂ e 0,5 mM de MgCl, pH=7,4) e seguiu-se o protocolo padrão de imunofluorescência para células fixadas. Brevemente, as células foram fixadas com 4% PFA/PBS por 15 minutos, lavadas duas vezes com PBS-glicina (0,1 M) por 5 minutos, e então permeabilizadas com 0,02% de Triton X-100 por 10 minutos. Os receptores Fc foram bloqueados em tampão 5% de BSA em PBS por 30 minutos. Os anticorpos anti-NF-κB p65 (1:100), anti-STAT3 (1:200), anti-Nrf2 (1:100) e anti-CD68 (1:100) ou a sonda faloidina-Alexa flúor 488 (1:200, A12379, Invitrogen) foram incubados *overnight* a 4°C, seguidos da marcação do anticorpo secundário Alexa Fluor 488 ou Alexa Fluor 647 (1:400) por 2 h em temperatura ambiente, seguidos da incubação com 4',6-diamino-2-phenylindole, DAPI (0,5 µg/mL, D9542, lot. 097M4033V, Sigma-Aldrich) por 10 minutos.

O ensaio de imageamento e dados de microscopia de imunofluorescência por triagem de alto desempenho baseado em conteúdo de imagens [*High-Content Imaging* (HCI), *High-Content Cell Screening* (HCCS), ou *High-Throughput-Screening* (HTS), também descrito como *Image Cytometry*] foi obtido usando o aparelho IN Cell

Analyzer 2200 (GE HealthCare, USA). Para cada poço investigado foram obtidas oito imagens dos campos selecionadas automaticamente e adquiridas com uma objetiva 40x em modo não-confocal. As imagens foram avaliadas qualitativamente para selecionar somente células não confluentes a fim de maximizar a inclusão para análise. Posteriormente, as imagens foram sequencialmente processadas para produzir máscaras binárias das regiões nucleares e citoplasmáticas definidas através das regiões de interesses ("ROI"). Essas regiões foram definidas por máscara de DAPI (canal azul) para região nuclear, enquanto a região citoplasmática foi definida pela subtração das máscaras dos canais vermelho e/ou verde da máscara do DAPI pelo equipamento InCell Investigator v.1.6.1 Software (GE, USA). As imagens foram organizadas e filtros de cor foram aplicados pelo programa Fiji®.

4.9 Ensaio de Apoptose e viabilidade celular

Macrófagos-símiles tratados com ácido úrico solúvel após 8 ou 24 h foram descolados da placa de cultura com solução 0,05% de Tripsina/2 mM de EDTA-PBS (sem Ca^{+2} e Mg^{+2}) e as células presentes no sobrenadante foram recuperadas por centrifugação (1500 rpm/10 minutos, Universal 32 Hettich Zentrifügen, Alemanha). Em sequência, as células foram incubadas com anexina V-FITC e iodeto de propídio (IP) seguindo recomendações do fabricante para detecção de apoptose (Calbiochem, Cat. No. PF032, lot. D00159427) por citometria de fluxo (FACSCanto II Flow Cytometer, BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Células vivas viáveis foram definidas como duplo-negativas para Anexina V e IP, células em estado de apoptose como simples-positiva para Anexina V, células mortas por apoptose duplo-positivas para Anexina V e IP.

Para avaliar a citotoxicidade, os níveis da enzima desidrogenase láctica (LDH) foram quantificados em sobrenadantes dessas culturas de células tratadas após 24 h de tratamento com ácido úrico solúvel. Para isso, utilizamos um quite colorimétrico para determinação LDH, seguindo as recomendações do fabricante (Doles, Goiânia, Brasil, lote DHLA-3101).

4.10 Análise Estatística

Todos os dados são expressos como média \pm erro padrão da média. Para a comparação dos grupos experimentais foi utilizado análise de variância (ANOVA) seguido do pós-teste de Bonferroni. $P < 0,05$ foi utilizado para considerar as diferenças significantes. GraphPad Prism® Software (versão 5.0) e Excel (Windows, 2016) foram utilizados para a análise dos dados.

5. Resultados

5.1. Quantificação da desidrogenase láctica (LDH) liberada em meio cultura

Para analisar a viabilidade celular da cultura de macrófagos-símile tratados apenas com ácido úrico solúvel em meio RPMI 1640 privado de SFB e tióis, realizamos o ensaio de LDH. O método analisa, de modo indireto, através da formação da enzima LDH a partir do piruvato, uma medida que indica dano a membrana celular e possível citotoxicidade experimental. Nesse ensaio, avaliamos após 24 h de tratamento com ácido úrico solúvel em sobrenadante, livre de células, a quantidade de LDH formado. O resultado demonstrou que concentrações da LDH foram significativamente reduzidas em concentrações de tratamento com ácido úrico solúvel de 300-1000 μM . Entretanto, a concentração de 100 μM alcançou concentração superior ao controle não-tratado e foi significativo estatisticamente (Figura 14). Consideramos avaliar a resposta de polarização ao ácido úrico solúvel a partir dos resultados prévios obtidas pelo nosso grupo (Carvalho, 2017).

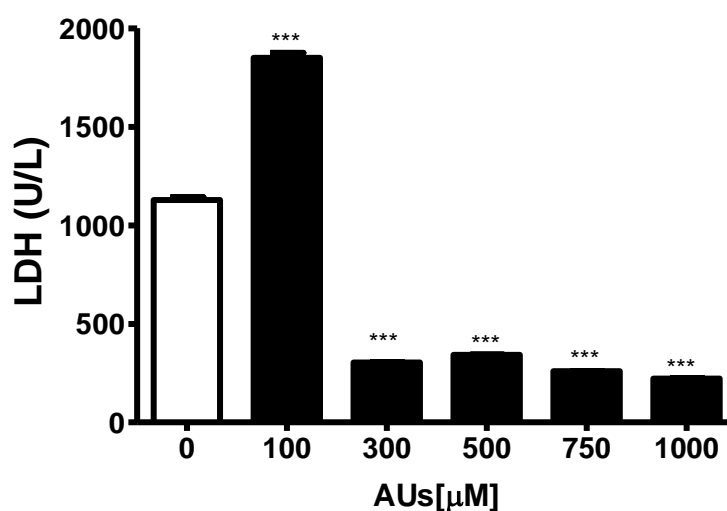


Figura 14: Ensaio de viabilidade celular por ensaio calorimétrico de LDH em sobrenadante após 24 h de tratamento com ácido úrico solúvel (AUs).

5.2. Ácido úrico solúvel modifica a polarização fenotípica de macrófagos

Inicialmente, buscamos identificar se o ácido úrico solúvel e em concentrações fisiológicas, poderia alterar o perfil de polarização de macrófagos. Células THP-1 foram diferenciadas em macrófagos-símile por 48 h com PMA e expostas por 24 h de tratamento com ácido úrico solúvel (0, 100, 300, 500 μ M) em meio de cultura especial (ausência de tióis, de metionina e SFB). O ácido úrico aumentou a expressão do receptor de manose CD206. A porcentagem de células positivas para CD206 foi 0,65 %, 43,7%, 86,2% e 94,51 % em células tratadas com 0, 100, 300 e 500 μ M respectivamente (Figura 15a). Entretanto, o ácido úrico solúvel diminuiu a expressão da enzima heme oxigenase-1 e da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS/NOS2). A frequência de células positivas para HO-1 foi de 96%, 97%, 96,9% e 2,62% (Figura 15b) e para iNOS foi 96%, 97%, 96,9% e 42,3% (Figura 15c) em células tratadas com 0, 100, 300 e 500 μ M respectivamente. CD11b foi utilizado como controle positivo para o protocolo de diferenciação em macrófago (Figura 15d).

Várias outras proteínas foram analisadas por FACS: CD14, CD16, CD11b, CD45 e CD68 foram utilizadas como marcadores globais de monócitos e macrófagos e como controle experimental. As proteínas STAT3, Nrf2, SOCS3, Trx, CD163, CD80, CD36, CD40 foram utilizadas para caracterizar o perfil clássico de inflamação/M1 ou perfil anti-inflamatório/M2, ou ainda, um perfil híbrido adquirido após a exposição do ácido úrico, porém os resultados obtidos com esses marcadores não demonstraram diferença de frequência (% células) entre os grupos tratados com ácido úrico solúvel [0 até 1000 μ M] (resultados em *dotplot* estão em dados suplementares - parte I, Figuras A.1 a A.17; tabelas I a XVII – localizados no Apêndice). As proteínas Prx1 e Prx2, sensíveis à modificação redox, também foram

analisadas e não apresentaram modificação de expressão significativa ou variação na frequência dos grupos tratados.

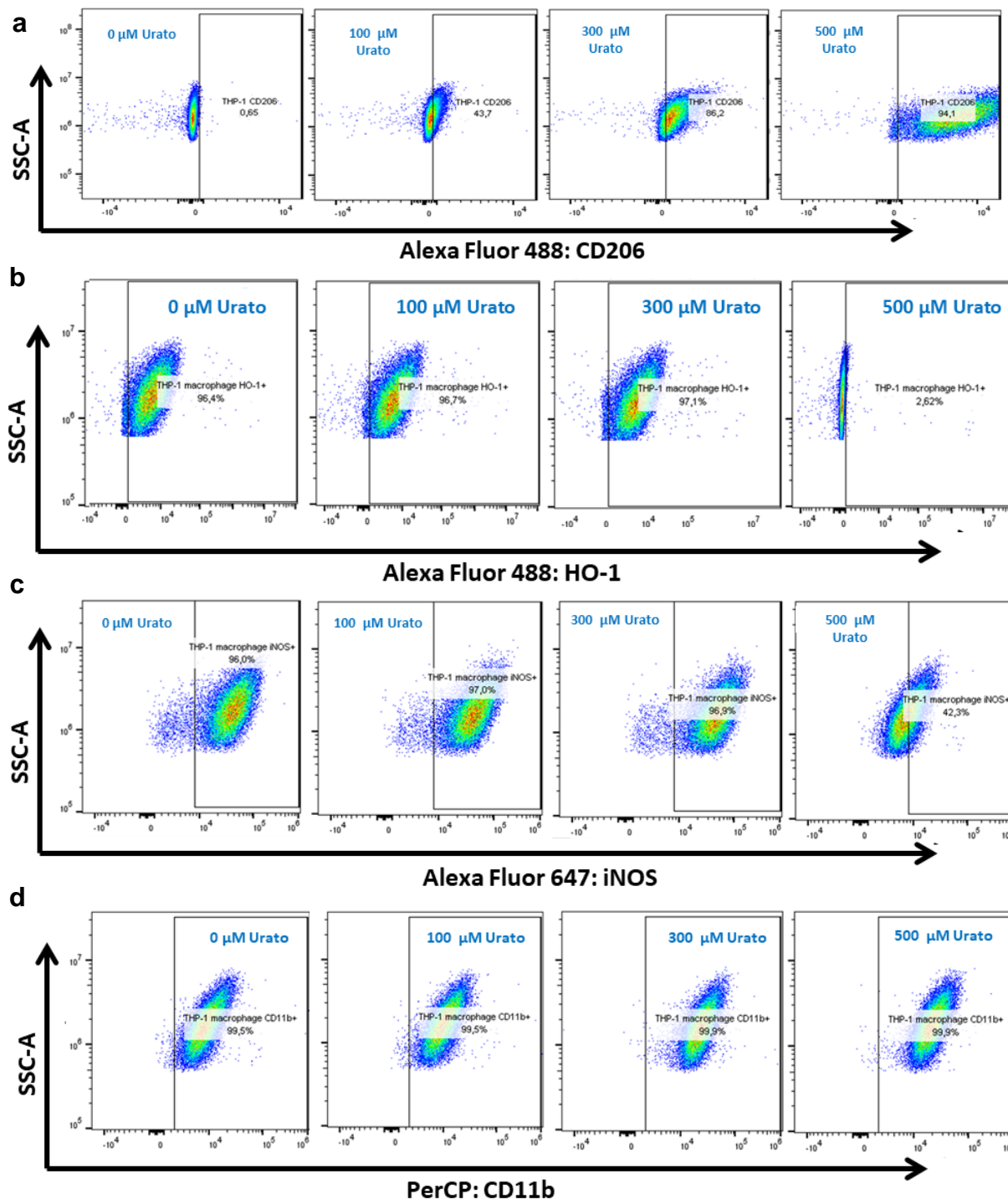


FIGURA 15: Ácido úrico solúvel promove polarização de macrófagos após 24 h de tratamento. Análise de citometria de fluxo demonstra que marcadores de polarização são regulados pelo ácido úrico solúvel. a) CD206 apresenta aumento de expressão de modo

dose-dependente em concentrações 0, 100, 300 e 500 μM , enquanto (b) HO-1 e (c) iNOS apresentam redução da expressão em concentrações fisiológicas de 500 μM ; d) CD11b foi utilizado como controle positivo experimental para fagócito. Números nos gráficos representam a frequência das populações, $n=2$.

Nós buscamos ainda avaliar o perfil de citocinas secretadas em cultura de células tratadas com a forma solúvel do ácido úrico. As citocinas avaliadas foram IL-12p70, TNF- α , IL-8, IL-6, IL-10 e IL-1 β após 8 h e 24 h, de modo a confirmar e caracterizar o perfil de polarização adquirido pelas células. Uma pré-avaliação do perfil de secreção de citocinas das células não-diferenciadas e diferenciadas com PMA (macrófago-símile) também foi realizada. Células THP-1 não diferenciadas apresentaram baixos níveis de secreção de citocinas inflamatórias. Entretanto, células THP-1 diferenciadas após 48 h apresentaram níveis elevados de IL-1 β e IL-8 (Figura 16). Esse padrão acentuado de expressão da IL-8 é encontrado em células da linhagem THP-1 diferenciada com PMA e apresenta características de ativação (Vitiello et al, 2004; Nishio et al, 2015). A avaliação do perfil de secreção de citocinas também foi realizado após 8 h e 24 h de exposição ao ácido úrico e não houve um padrão característico (Figura 17 e 18), conferindo resultados inconclusivos.

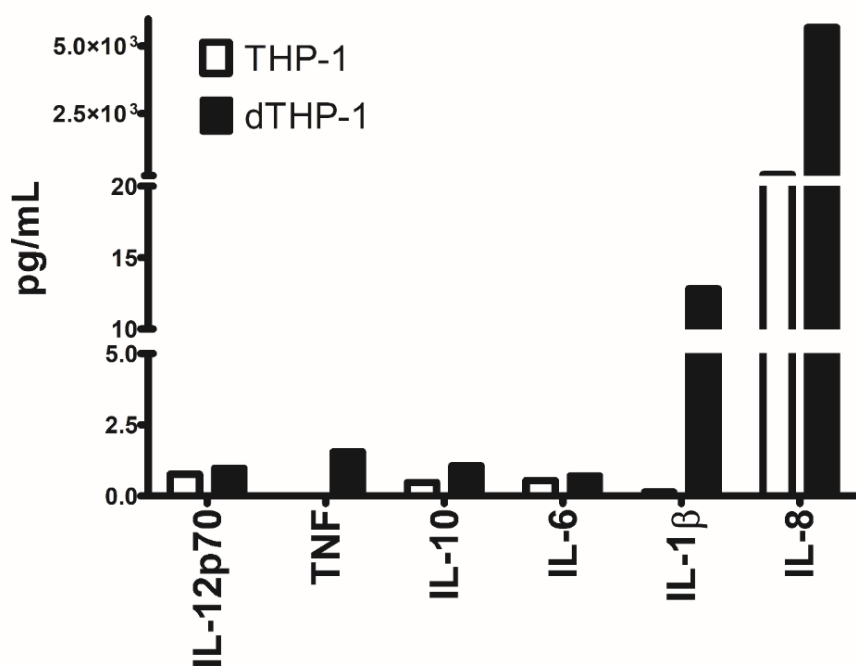


Figura 16: Expressão de citocinas obtidas do sobrenadante da cultura das células THP-1 não diferenciadas (THP-1) e diferenciadas (dTHP-1) com PMA (5 ng.mL^{-1} por 48h). O ensaio foi realizado através de um *Kit* multiplex para FACS para as citocinas IL-12p70, TNF, IL-10, IL-6, IL-1 β e IL-8 em sobrenadantes livres de células. (n=1).

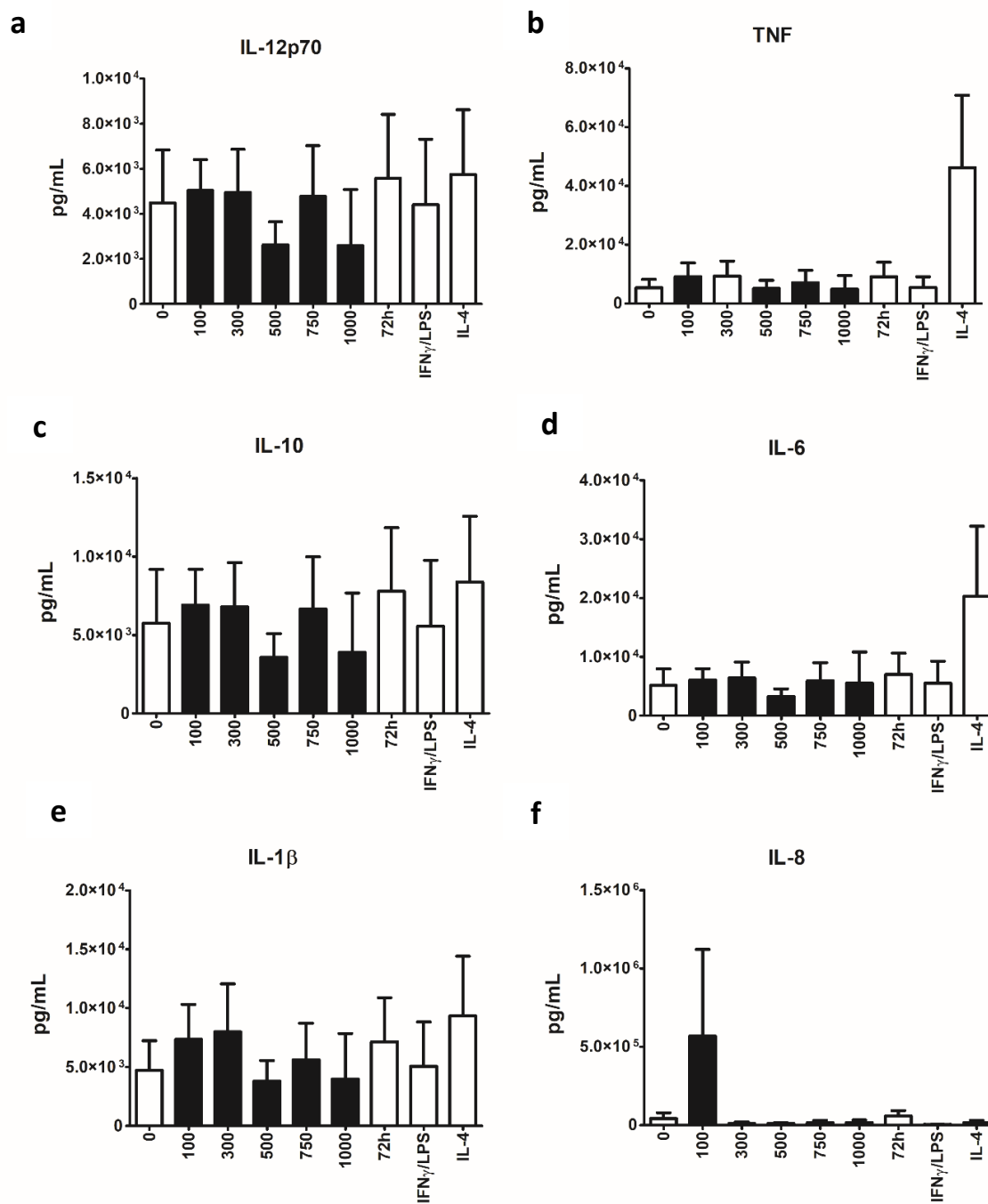


Figura 17: Expressão de citocinas obtidas do sobrenadante da cultura de células THP-1 diferenciadas com PMA e tratadas por 8 h com ácido úrico solúvel após 48 h de diferenciação. O ensaio foi realizado através de um quite multiplex para FACS para as citocinas IL-12p70, TNF, IL-10, IL-6, IL-1β e IL-8 em sobrenadantes livres de células. (n=03).

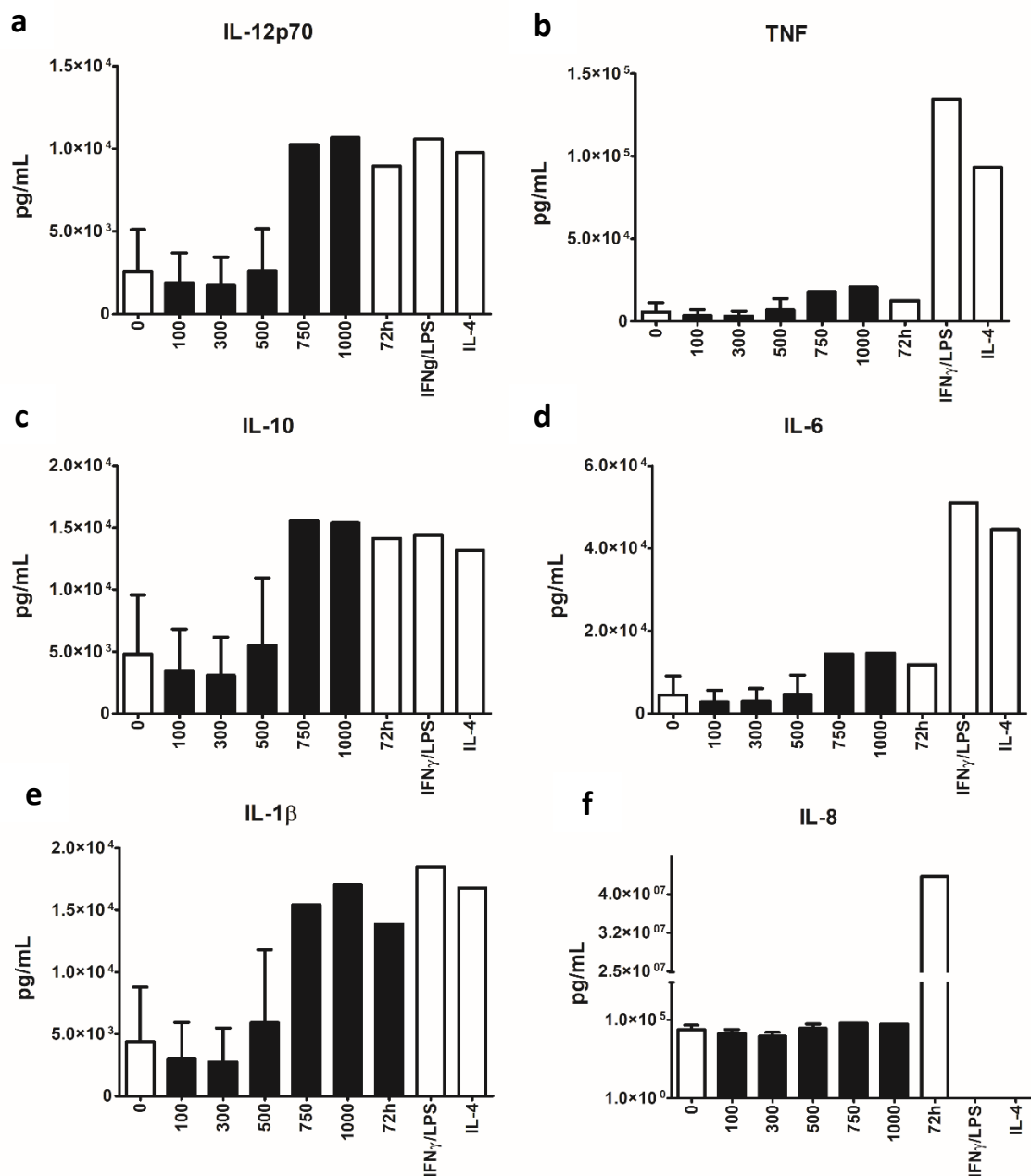


Figura 18: Expressão de citocinas obtidas do sobrenadante da cultura de células THP-1 diferenciadas com PMA e tratadas por 24 h com ácido úrico solúvel. O ensaio foi realizado através de um quíte multiplex para FACS para as citocinas IL-12p70, TNF, IL-10, IL-6, IL-1 β e IL-8 em sobrenadantes livres de células. (n=03, para valores até 500 μ M e n=01 para os demais)

5.3. Análise da alteração da expressão de proteínas em lisado celular total pelo tratamento com ácido úrico

Para confirmar através de outra técnica a expressão de proteínas envolvidas na polarização dos macrófagos, nós utilizamos Western blotting. Concentrações fisiológicas (300 a 500 μM) de ácido úrico solúvel regularam negativamente a expressão da iNOS (Figura 19a) e da HO-1 (Figura 19b) após 24 h de exposição. Apesar da expressão da iNOS dos controles utilizados neste experimento se apresentarem elevadas (0 μM = 0,234; dTHP-1=0,268), protocolos descrevem que a expressão da iNOS em células THP-1 diferenciadas se apresentam elevadas após a diferenciação em macrófagos por PMA, e ainda confere características de macrófagos ativados (Ozleyen et al, 2021).

Além disso, avaliamos também a expressão da Arg-1 e da Trx. Não observamos diferença de expressão da Arg-1, porém houve aumento da expressão da Trx pelo tratamento com ácido úrico nas concentrações de 100 a 750 μM (Figura 19b). Juntos, esses resultados demonstram que ácido úrico solúvel em concentrações fisiológicas regula um conjunto de proteínas e reduz a expressão de marcador clássico de inflamação, iNOS/NOS2 e a expressão da heme-oxigenase. Ademais, aumenta a expressão da Trx, provavelmente através da regulação da ativação do Nrf2.

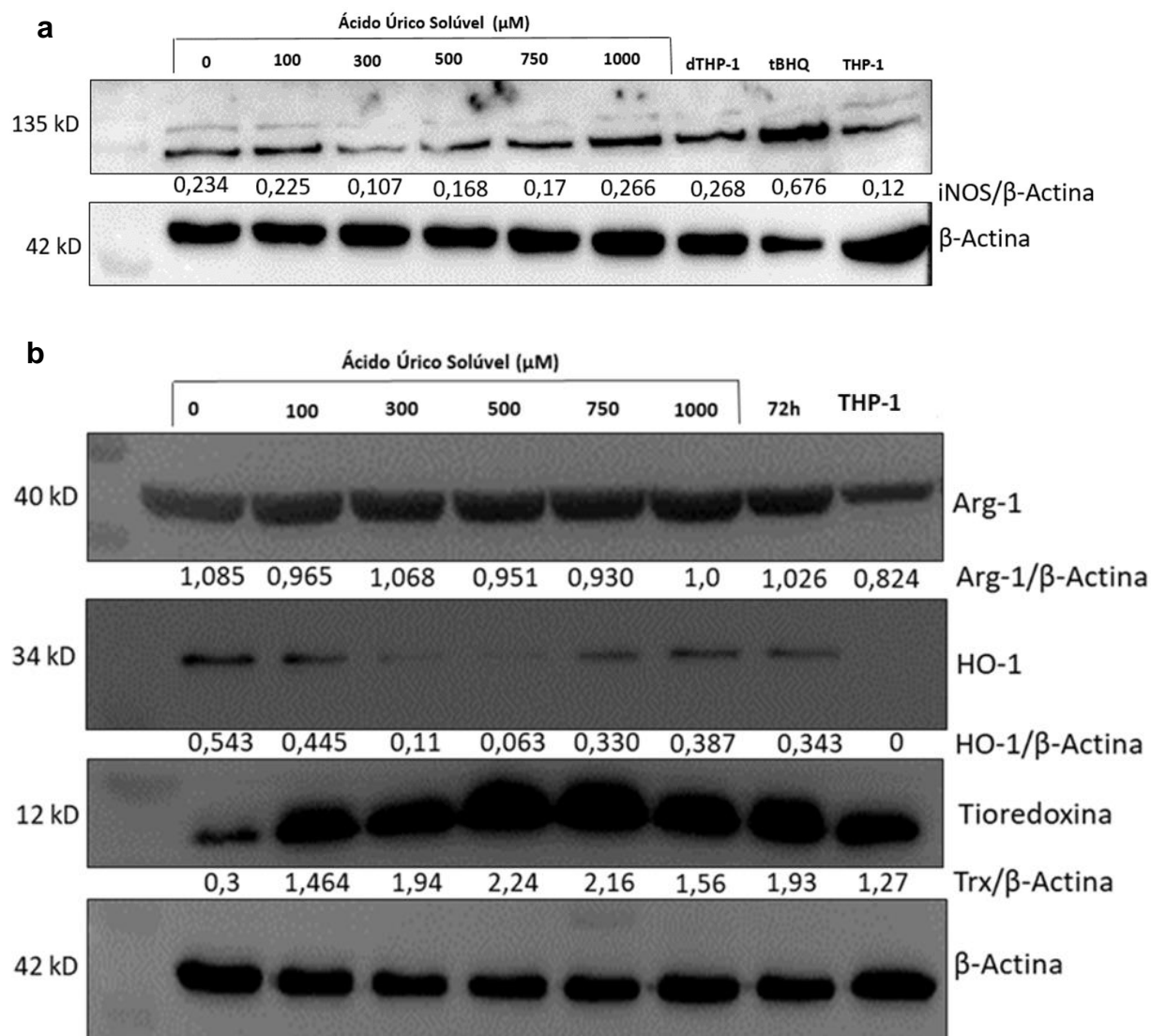


FIGURA 19: Ácido úrico solúvel promove alteração da expressão de proteínas após 24 horas de tratamento. Immunoblots de lisado celular total. Em a) iNOS/NOS2, marcador M1; b) Arg-1/Arginase-1, marcador M2; HO-1, tioredoxina. β -actina foi utilizada como controle interno de carregamento. Os números representam a densidade óptica (D.O.) e razão D.O./ β -actina. As linhas representam o tratamento com ácido úrico solúvel (0-1000 μM Urato); 72h representa controle para meio completo RPMI 1640 (48 h de diferenciação com PMA + 24 h em meio completo novo sem PMA); tBHQ (*tert*-Butil-hidroquinona 20 μM , controle positivo para Nrf2); M1 (IFN γ /LPS, 20 ng/mL + 1 $\mu\text{g/mL}$) controle positivo para perfil de ativação clássica M2 (IL-4), controle positivo para o perfil de ativação não-clássica. dTHP-1 (THP-1 diferenciada com PMA).

5.4. Análise da migração dos fatores de transcrição Nrf2 e NF- κ B para o núcleo após o tratamento com concentrações fisiológicas de ácido úrico solúvel

Para investigar o papel do ácido úrico na expressão e ativação de Nrf2 e NF- κ B, medimos a abundância relativa desses dois fatores de transcrição em frações de amostras de enriquecimento nuclear por Western blotting. Os resultados demonstraram que a expressão do Nrf2 no núcleo foi significativamente reduzida pelo tratamento com ácido úrico de 100 a 1000 μ M por 24 h (Figura 20). Houve ainda uma redução da expressão do NF- κ B p65 tanto no núcleo quanto no citosol na concentração de 500 μ M (Figura 20), porém essa redução não foi verificada pela expressão total do NF- κ B p65 em homogeneizado total (Figura A.20). Somados, esses resultados demonstram que um conjunto de proteínas são modificadas após a exposição do ácido úrico solúvel em cultura de macrófagos, podendo modificar o padrão de polarização através de vias de regulação inflamatória e controle redox.

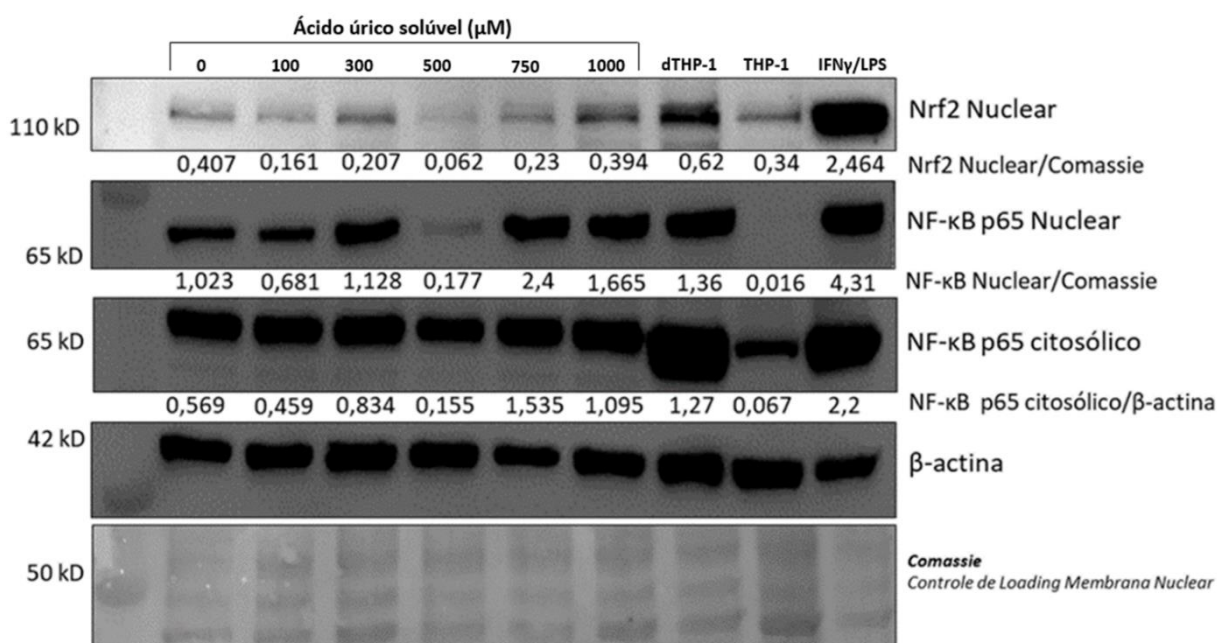


FIGURA 20: Nrf2 é regulado em macrófagos após o tratamento de ácido úrico solúvel. Após 24 h de tratamento com ácido úrico solúvel em THP-1 diferenciadas com PMA (5 ng.mL⁻¹

por 48 h) a migração do Nrf2 ao núcleo foi reduzida por concentrações fisiológicas de ácido úrico. Os números representam a densidade óptica (D.O.) e razão D.O./ β -actina ou razão D.O./Comassie. Para cada amostra foi utilizado o carregamento de 25 μ g de extrato nuclear ou citosólico. 0-1000 μ M de ácido úrico solúvel; 72 h representa controle com meio completo RPMI 1640 (48 h de diferenciação com PMA + 24 h em meio completo sem PMA); M1(IFN γ /LPS, 20 ng.mL⁻¹ + 1 μ g.mL⁻¹).

5.5. STAT3 é regulada por concentrações fisiológicas de ácido úrico solúvel

Para determinar se o ácido úrico interfere na migração do fator de transcrição STAT3 ao núcleo, realizamos Western-blotting das frações nuclear e citosólica, verificamos uma redução da expressão da STAT3 nuclear nos grupos tratados com ácido úrico (100 – 500 μ M) (Figura 21a). Além disso, a expressão total da proteína foi reduzida nestes mesmos grupos (Figura 21b; Figura A.21). As células THP-1 diferenciadas mantidas em meio carenciado de SFB e tióis apresentaram uma redução expressiva da STAT3 quando comparadas às células mantidas em meio completo, o que sugere que a falta de nutrientes do SFB, ou componentes do mesmo, e/ou a presença de um ambiente rico em tióis exerce efeito sobre a expressão da STAT3 nas células THP-1 diferenciadas. A diferenciação das células THP-1 por si levou a uma diminuição da STAT3. É provável que a diminuição da migração para a região nuclear da STAT3 seja decorrente da diminuição da expressão total.

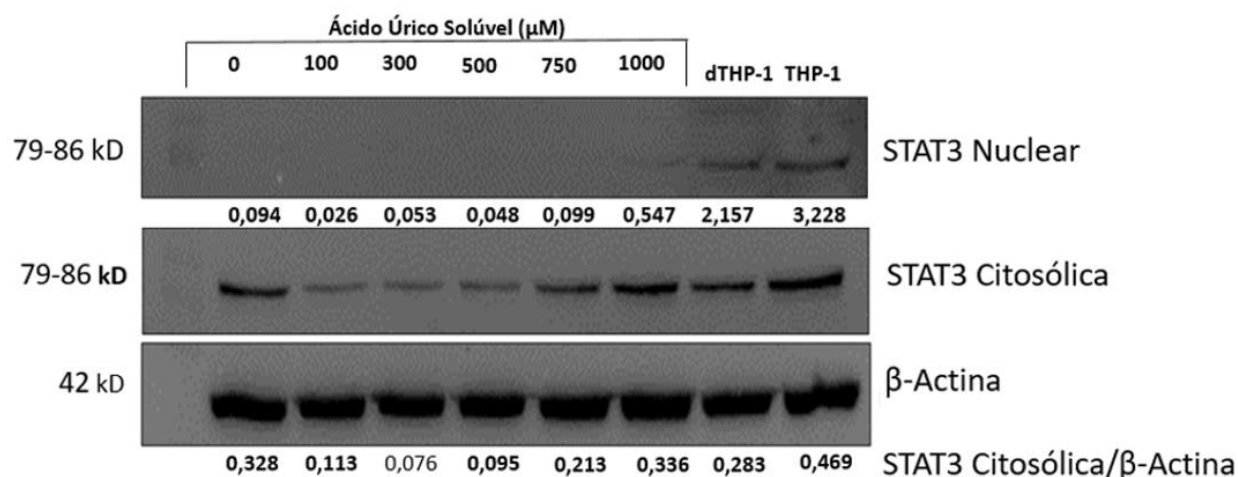


FIGURA 21: A expressão nuclear e total da STAT3 é reduzida após o tratamento com o ácido úrico. Após 24h de tratamento ao ácido úrico solúvel células THP-1 diferenciadas com PMA (5ng/mL por 48 h) apresentaram redução da expressão da STAT3. Os números representam a densidade óptica (D.O.) e a normalização do western-blotting foi feita pela razão D.O./ β-actina. Legenda: 0-1000 μM ácido úrico; dTHP-1 representa controle com meio completo RPMI 1640 (48 h de diferenciação + 24 h em meio completo) e THP-1 representa células THP-1 não diferenciadas. N=03.

5.6. Expressão do fator NF-κB p65, STAT3 e Nrf2 por *High Content Imaging* (HCI)

Neste estudo, nós executamos uma triagem de alto desempenho baseado em conteúdo de imagens a fim de monitorar a translocação dos fatores de transcrição NF-κB, STAT3 e Nrf2 ao núcleo mediante exposição ao ácido úrico solúvel por 24 h. Esse método analisa individualmente, em um dado momento ou dinamicamente em um curso de tempo, como cada célula responde a um dado estímulo (através de uma triagem celular fenotípica). Assim, parâmetros como morfologia, densidade e outras características observáveis podem ser analisadas (Buchser et al, 2014; Trask et al, 2012). Esse método de imagem foi utilizado como uma estratégia alternativa para avaliar a presença dos fatores de transcrição mencionados na região nuclear que pudessem ser reguladores da polarização das culturas de THP-1 diferenciadas submetidas ao ácido úrico solúvel. Além disso, uma das vantagens da escolha para uso do imageamento das culturas foi a possibilidade de manter o estado nativo das

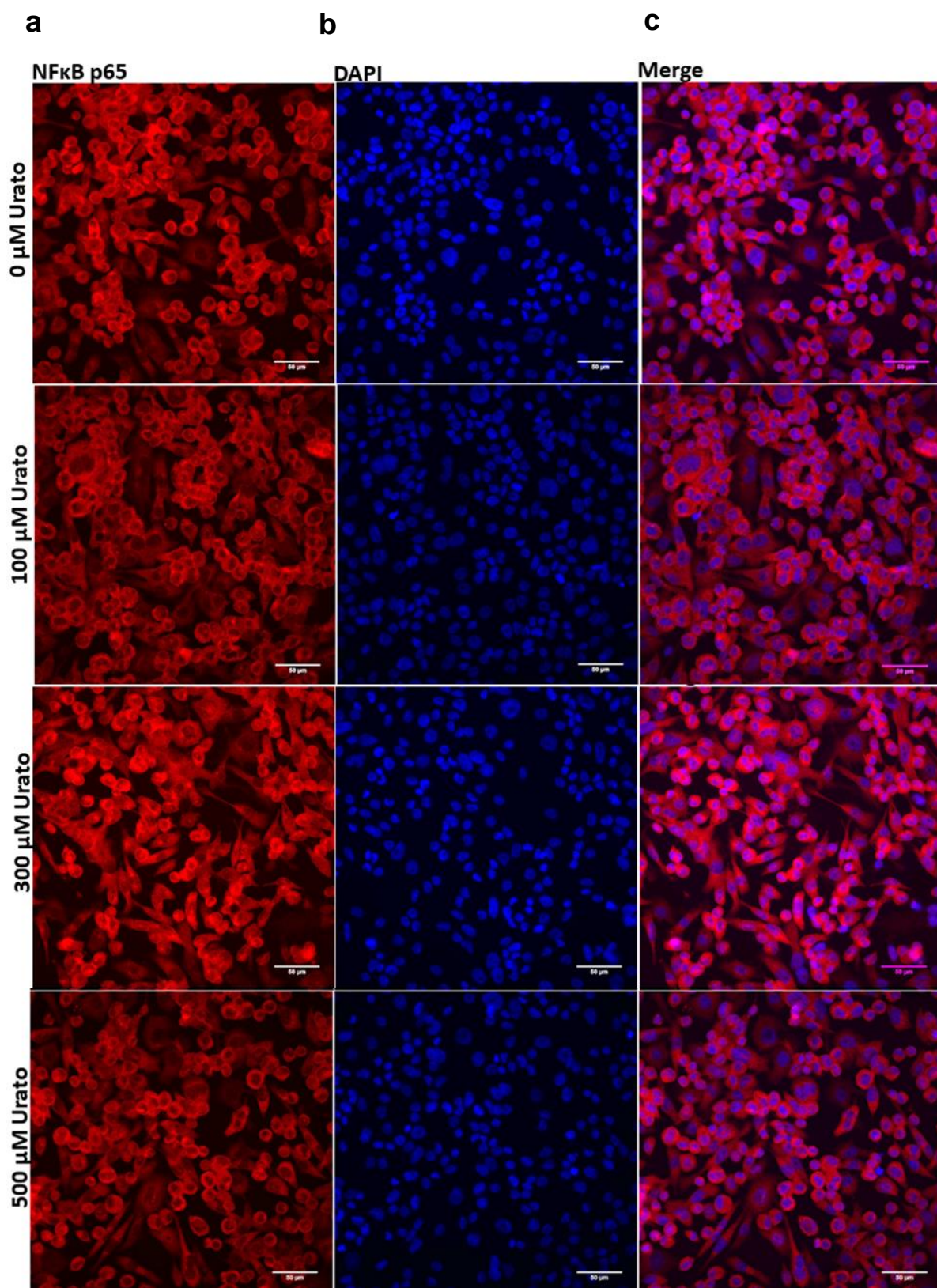
células aderentes e manutenção de sua morfologia, além de fornecer dados robustos através de uma metodologia alternativa aos parâmetros analisados por western-blotting.

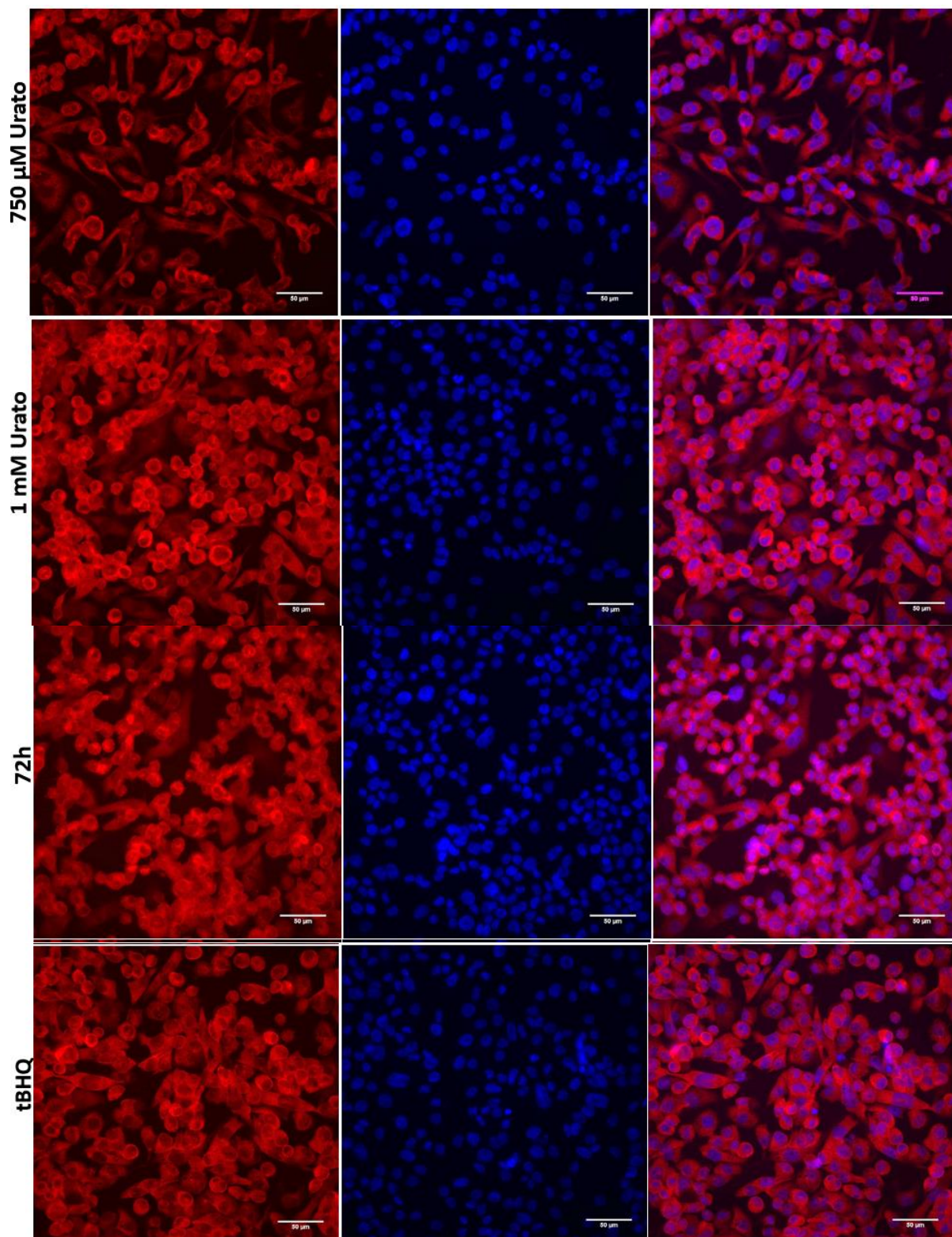
Inicialmente, testamos o parâmetro de densidade de semeadura das células THP-1 em placas de alta superfície de adesão a fim de reproduzir as características da cultura de célula THP-1 diferenciada utilizada nos experimentos anteriores (testamos densidade celular de 50, 100, 250 mil por poço). Avaliamos qualitativamente e selecionamos densidade de células não confluentes a fim de maximizar a inclusão para análise e refletir as características morfológicas da cultura. Os resultados do conjunto de imagens obtidas demonstraram que o fator de transcrição NF- κ B p65 apresenta expressão predominantemente na região citosólica, próxima a região nuclear (dados não apresentados). Além disso, pudemos conferir a partir do parâmetro de medida de ativação o NF- κ B p65 (razão núcleo:citossol), que a exposição ao ácido úrico solúvel por 24 h não resultou em mudança significativa em relação as células não tratadas. A média de intensidade de fluorescência das regiões delimitadas e definidas por regiões de interesse, como a região nuclear, não apresentou diferença estatisticamente significativa provocada pela exposição ao ácido úrico, porém houve uma tendência à redução da expressão da p65 nas concentrações de 500 μ M - 1 mM (Figura 22a-e; Figura A.26).

É digno de nota que os resultados obtidos da análise qualitativa do imageamento detectou que todas as células diferenciadas apresentam, em sua maioria, a expressão da p65 margeando o núcleo, localizando-se na região do citoplasma (dados não apresentados). Formas não diferenciadas de THP-1 (promonócitos) não apresentaram expressão detectável por western-blot. A literatura descreve que após a diferenciação com PMA, linhagens de células mieloides como

a THP-1 tendem a apresentar a ativação e aumento de expressão do NF- κ B, devido uma cascata de sinalização desencadeado pela PKC engajada na diferenciação celular e que envolve a via do NF- κ B (Sen & Baltimore, 1986; Noursadeghi et al, 2008). Além disso, os dados obtidos de maior densidade celular (250 mil células em placas de 48 poços) apresentam resposta similar à obtida anteriormente quanto à expressão total do NF- κ B p65 nos grupos tratados com ácido úrico em concentrações fisiológicas. Imagens representativas para a maior densidade são apresentadas no apêndice (Figuras A.26).

Da mesma forma em que foi realizado o ensaio de imageamento para a p65, foi realizado o ensaio de translocação para os fatores de transcrição STAT3 e Nrf2 utilizando os mesmos critérios. Os resultados obtidos para os fatores de transcrição STAT3 de imageamento por HCl demonstraram que o tratamento das culturas com meio carenciado de SFB levou a uma sutil redução da expressão da proteína STAT3, entretanto essa diferença não foi estatisticamente significativa para os grupos. Os resultados da média de intensidade de fluorescência para os campos analisados demonstraram que não há diferença estatisticamente relevante de expressão também para o fator de transcrição Nrf2 na região nuclear, porém uma tendência à redução da expressão desse fator acontece nos grupos expostos ao ácido úrico, corroborando dados obtidos por western-blotting das amostras fracionadas do núcleo. A figura 23a-d apresenta imagens representativas dos fatores de transcrição STAT3 e Nrf2 e a média de intensidade fluorescência obtida pela análise automática realizada pelo programa IN Carta. Para o controle de marcação experimental, utilizamos o grupo de diferenciação CD68 como controle positivo para macrófagos. Imagens representativas estão presentes na Figura 24a-c e a média de intensidade de fluorescência fornecida pelo marcador na figura 24d-e.





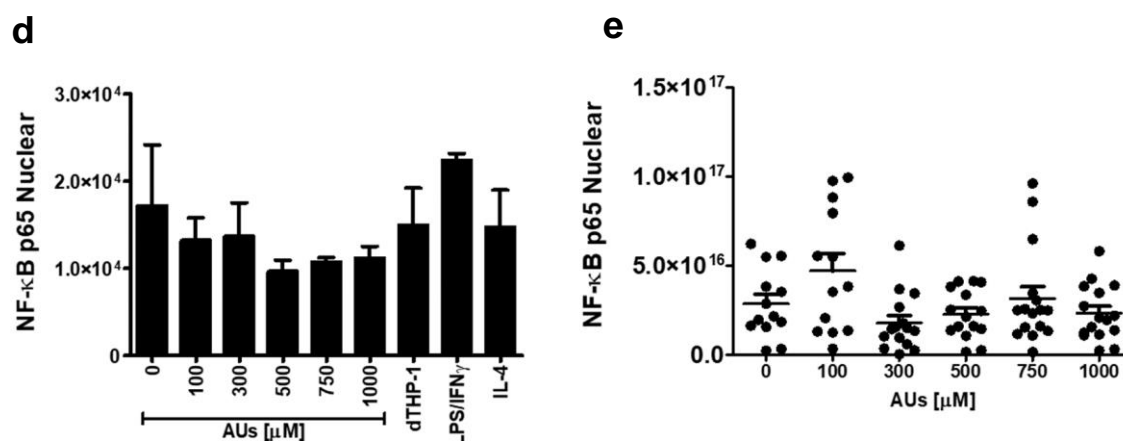
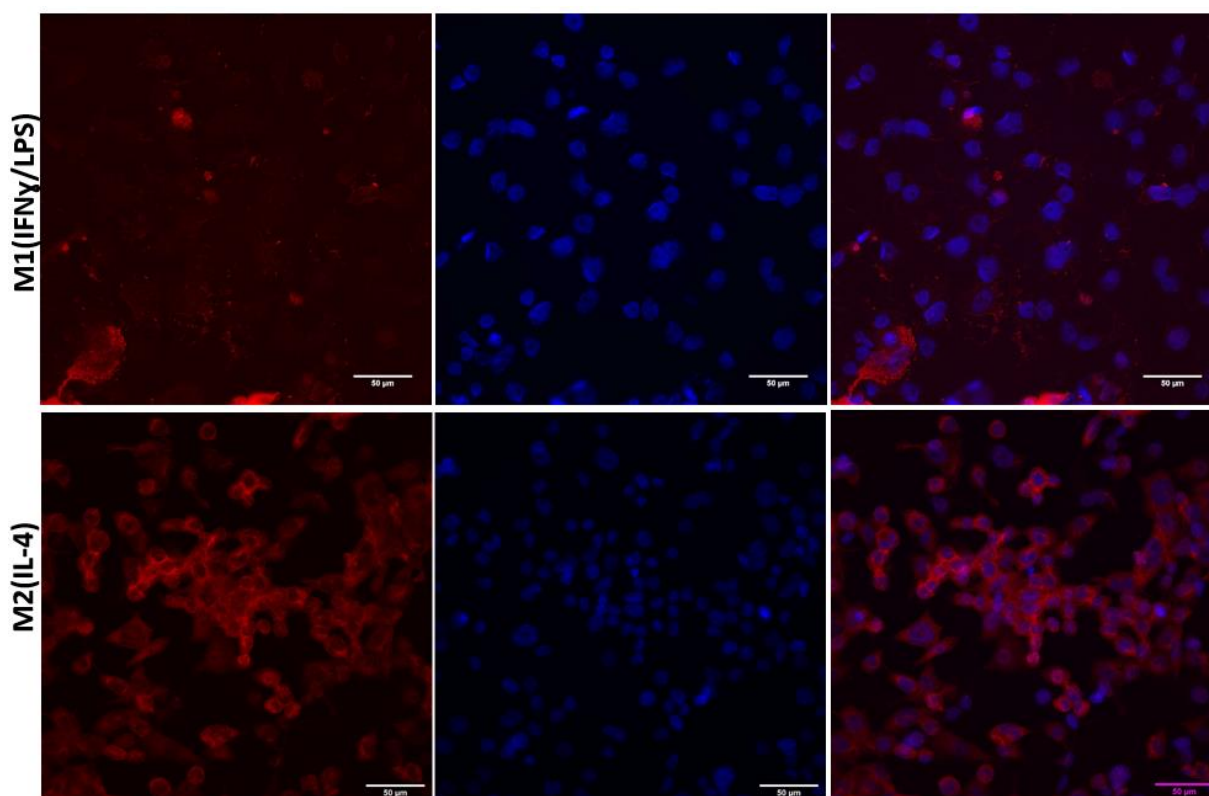
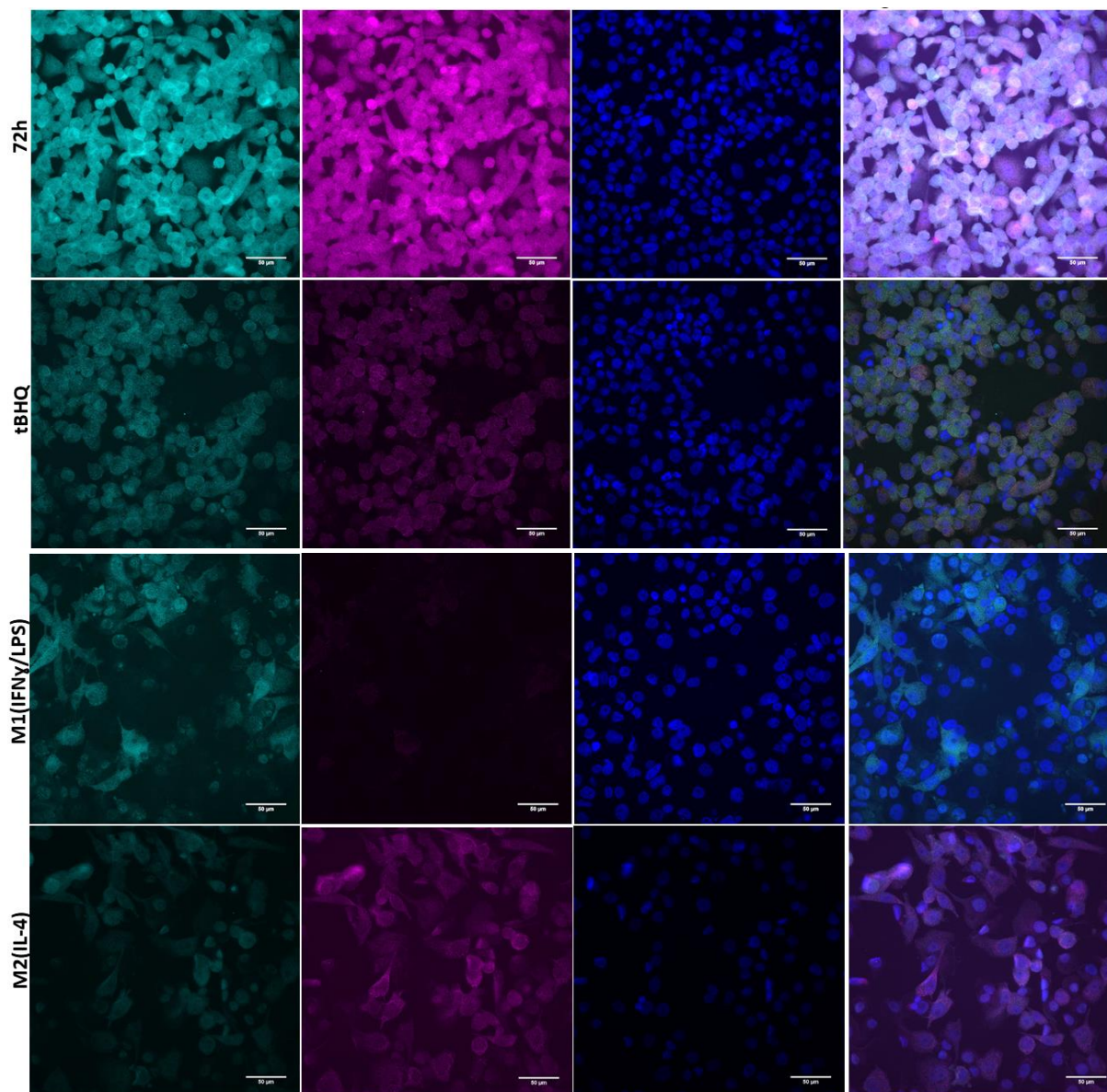


FIGURA 22: Expressão do NF-κB p65 por imageamento HCl após tratamento por ácido úrico solúvel. Tratamento ao ácido úrico solúvel em macrófagos-símile obtidos de células da linhagem THP-1 NF-κB p65 em vermelho (a, 1° painel da esquerda para a direita, canal Cy5), DAPI em azul (b, 2° painel da esquerda para a direita, canal DAPI) e Merge representa a sobreposição dos canais (c, 3° painel da esquerda para a direita). Média de Intensidade de fluorescência (por pixel) foi analisada pelo programa INCarta (GE, USA) de cada imagem obtida. Objetiva 40x, modo não-confocal. Legenda: 0-1000 μM Urato (ácido úrico solúvel); 72 h representa controle positivo para meio completo RPMI 1640 (48 h de diferenciação + 24 h em meio completo); tBHQ (tert-Butil-hidroquinona 20 μM, controle positivo Nrf2); M1(IFN_γ/LPS, 20 ng/mL + 1 μg/mL) controle positivo para perfil de ativação clássica M2(IL-4), controle positivo para o perfil de ativação não-clássica. Em (d) gráfico representativo da média da intensidade de fluorescência para NF-κB p65 na região nuclear quantificada a partir do canal vermelho, Cy5; (e) representa a dose-reposta da expressão da p65 ao ácido úrico solúvel. Densidade celular=1x10⁵. Dados são representativos de dois experimentos diferentes (n=2) com oito réplicas por cada condição testada.



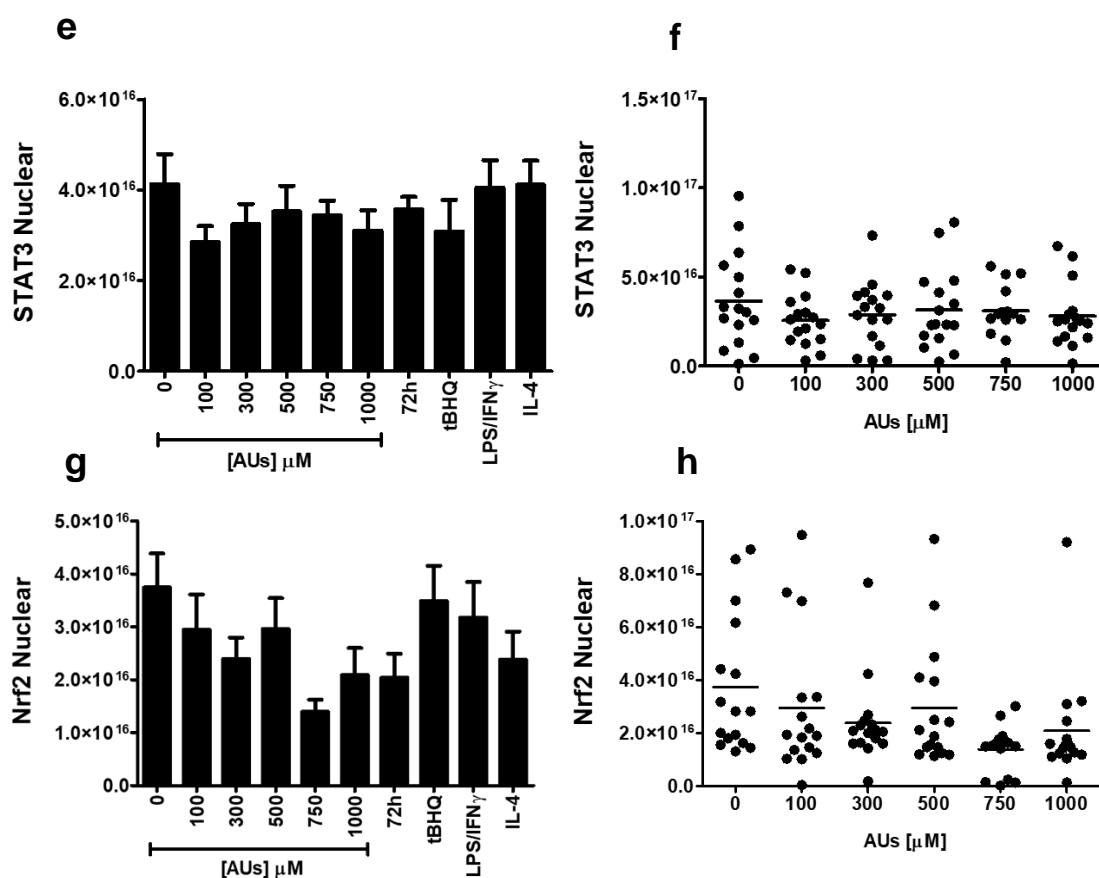
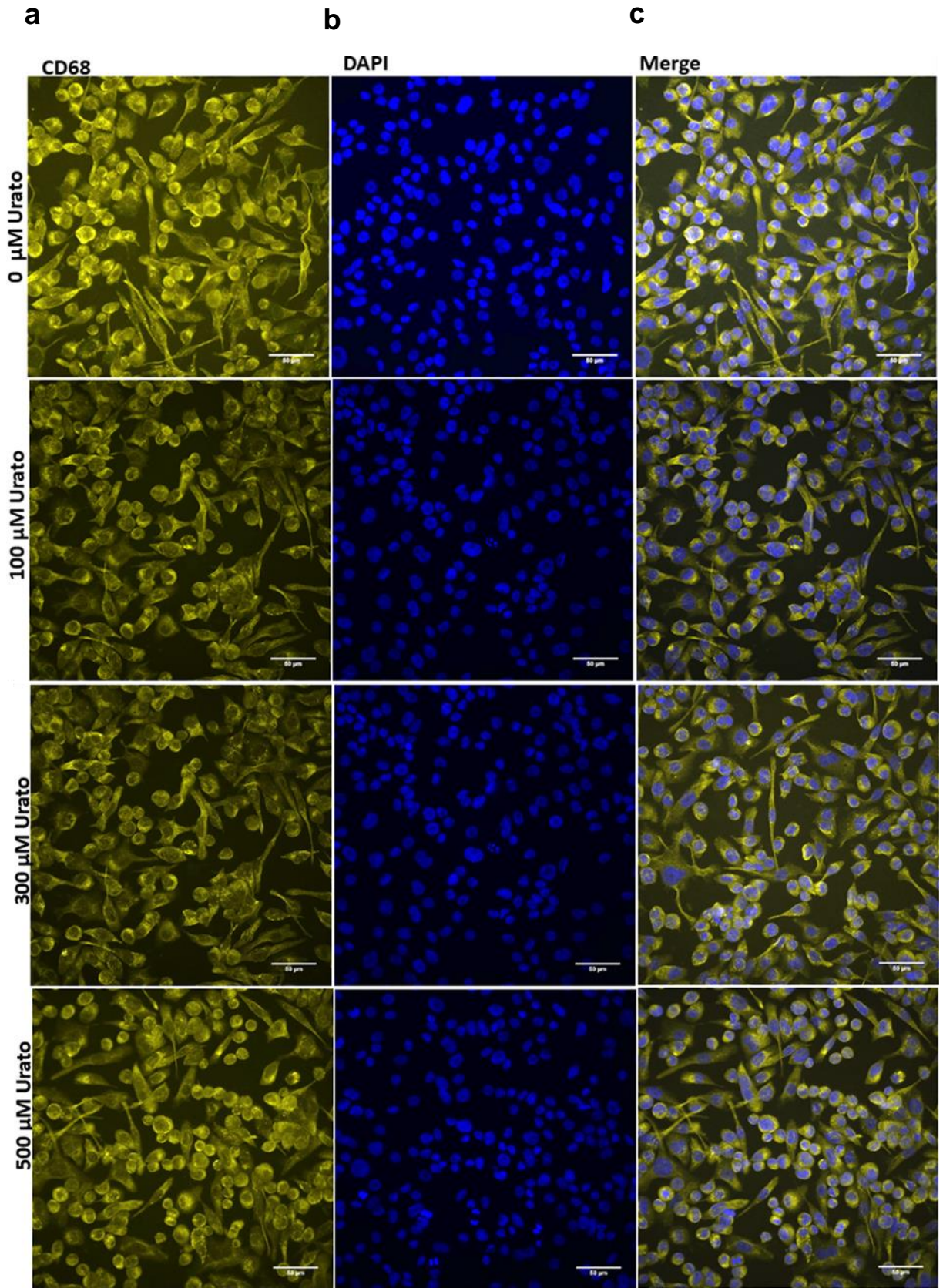
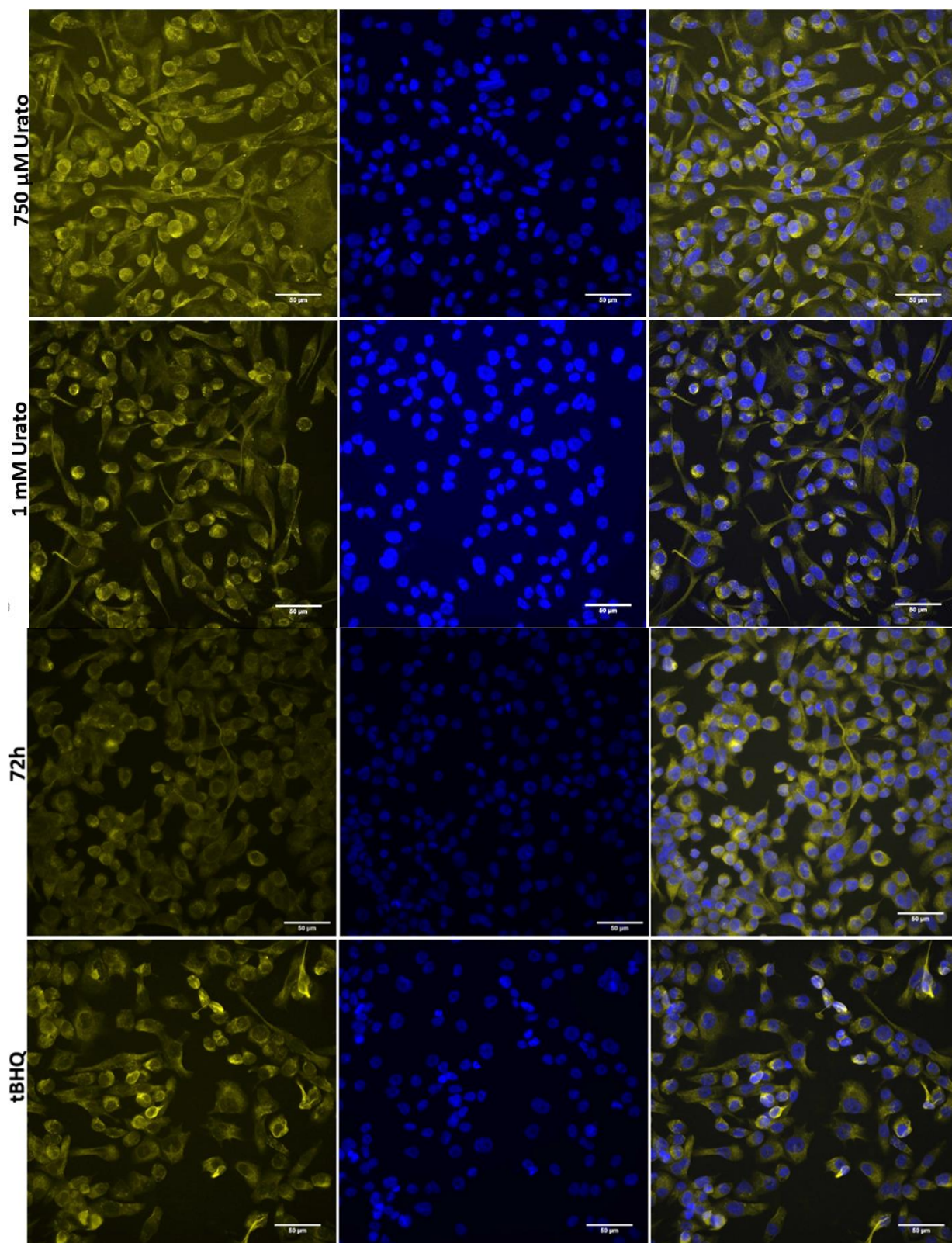


FIGURA 23: Expressão da STAT3 e do Nrf2 após o tratamento do ácido úrico solúvel. Expressão da STAT3 e Nrf-2 após 24 h de tratamento ao ácido úrico solúvel em macrófagos-símile obtidos de células da linhagem THP-1. Imagens pseudocoloridas são representativas para STAT3 em ciano (sinal ajustado para 7500 pixels para todas as imagens representativas da STAT3 por Fiji®; 1° painel da esquerda, canal FITC), Nrf2 em magenta (2° painel da esquerda para a direita, canal Cy5), DAPI em azul (3° painel da esquerda para a direita, canal DAPI) e Merge representa a sobreposição dos canais para a obtenção da imagem pseudocolorida (4° painel da esquerda para a direita). Média de Intensidade de fluorescência por pixel foi analisada pelo programa IN Carta (GE, USA) de cada campo obtido. Objetiva 40x, modo não-confocal. Legenda: 0-1000 μ M Urato (ácido úrico solúvel); 72 h representa controle positivo para meio completo RPMI 1640 (48 h de diferenciação + 24 h em meio completo); tBHQ (*tert*-Butil-hidroquinona 20 μ M, controle positivo Nrf2); M1(IFN γ /LPS, 20 ng/mL + 1 μ g/mL) controle positivo para perfil de ativação clássica M2(IL-4), controle positivo para o perfil de ativação não-clássica. (e) representa a média de intensidade de fluorescência dos campos analisados para a STAT3 no núcleo das células e (f) efeito de dose-reposta do ácido úrico de sua expressão; (g) representa a média de intensidade de fluorescência para o Nrf2 apresentada pela região nuclear e (h) efeito de dose-reposta do ácido úrico em sua expressão. Dados são representativos de dois experimentos diferentes (n=2) com oito réplicas por cada condição testada.





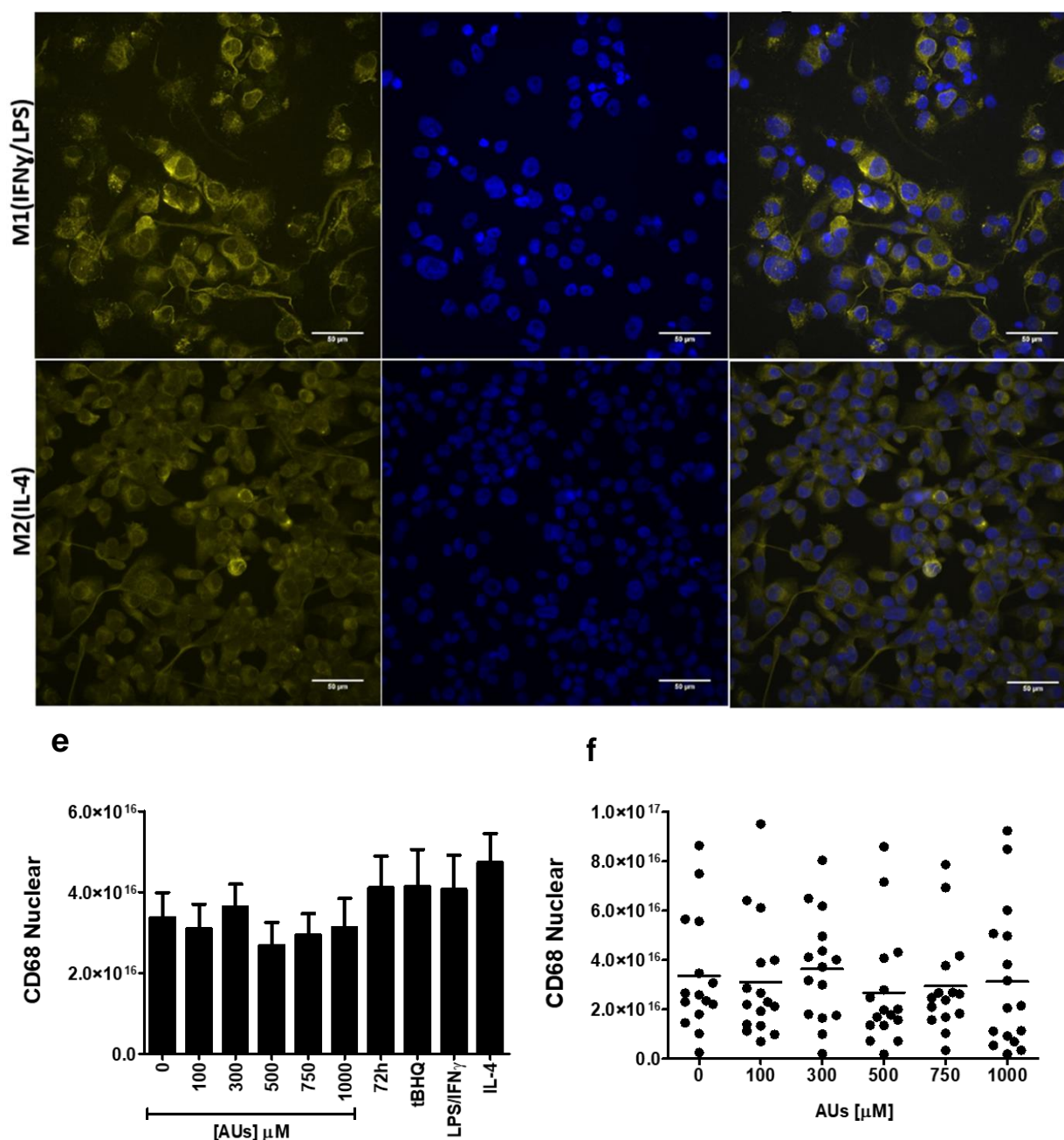


FIGURA 24: Expressão de CD68 após o tratamento com ácido úrico solúvel. Após 24 h de tratamento ao ácido úrico solúvel em macrófagos-símile obtidos de células da linhagem THP-1. Imagens pseudocoloridas representativas CD68 em amarelo (1º painel da esquerda, canal FITC), DAPI em azul (2º painel da esquerda para a direita, canal DAPI) e Merge representa a sobreposição dos canais para a obtenção da imagem pseudocolorida (3º painel da esquerda para a direita). Objetiva 40x, modo não-confocal. Legenda: 0-1000 μM Urato (ácido úrico solúvel); 72 h representa controle positivo para meio completo RPMI 1640 (48 h de diferenciação + 24 h em meio completo); tBHQ (*tert*-Butil-hidroquinona 20 μM , controle positivo Nrf2); M1(IFN γ /LPS, 20 ng/mL + 1 $\mu\text{g/mL}$) controle positivo para perfil de ativação clássica M2(IL-4), controle positivo para o perfil não-clássica. O gráfico (e) representa a média de intensidade de fluorescência dos campos analisados para controle experimental CD68 da região de interesse (núcleo) e (f) denota efeito de dose-reposta do ácido úrico em sua expressão. Dados são representativos de dois experimentos diferentes (n=2) com oito réplicas por cada condição testada.

5.7. Análise de autofagia após o tratamento do ácido úrico

A autofagia é um processo dinâmico de reciclagem celular que pode ser influenciada por vários estímulos externos e internos. Entre eles, o estímulo pela privação de nutrientes, fatores de crescimento e/ou hormonal, presença de sinais de dano e ainda, irá depender do estado de polarização fenotípica das células ao perfil M2 (Jung et al, 2020; Lum et al, 2005; Boakye et al, 2018). Durante a autofagia, partes do citoplasma e organelas são encapsuladas por vesículas intracelulares, os chamados autofagolisossomas (ou autofagossomo) e são degradados como processo normal. A proteína LC3 (*Microtubule-associated protein Light Chain 3*) é essencial para a formação do autofagolisossoma. A LC3 existe sob duas formas na célula, uma citoplasmática, a forma LC3-I (18 kD) e a forma LC3-II (16 kD) que é associada a membrana do fagossoma. A quantidade de formação de LC3-II está correlacionada à formação do autofagossomo, e em combinação, ambas as formas podem ser utilizadas para avaliar o processo de autofagia em curso (Mizushima & Tomatsu, 2007; Klionsky et al, 2008). Em nossos experimentos, as culturas de macrófagos-símiles foram privados de nutrientes durante o tratamento com ácido úrico, a fim de avaliar os efeitos dessa privação, analisamos proteínas envolvidas com a macroautofagia.

Em nossos resultados, o tratamento com ácido úrico após 24 h permitiu o acúmulo de LC3, indicando a extensão de formação do autofagossomo e indução da autofagia, verificado pelo aumento da expressão de LC3-II quando comparado com controle não-tratado (Figura 25). Concomitantemente, também foram analisados os níveis de expressão da p62/SQSTM-1 (Sequestosoma-1), uma proteína receptora e substrato seletivo de autofagia, responsável pela ligação à ubiquitina e altamente expressa em processos de autofagia. A p62 pode se ligar ao LC3 e,

consequentemente, servir como substrato da autofagia, uma medida alternativa para detecção de fluxo autofágico, porém ambas devem ser analisadas em conjunto (Chen et al, 2014; Mizushima & Yoshimori, 2007). O resultado da expressão da p62 por western-blot demonstra aumento após 24 h. Em conjunto, a LC3-II e a p62 indicam acúmulo de autofagossoma após tratamento com urato. A conversão de LC3-I para LC3-II é acompanhada pelo acúmulo da p62/SQSTM1 após 24 h de exposição ao ácido úrico solúvel.

Além disso, a caspase-1 também foi avaliada como uma proteína envolvida no processo de autofagia, sendo a autofagia um dos processos capazes de ativar a pró-caspase-1 em caspase-1 e, consequentemente, secretar as citocinas IL-1 β e IL-18 (Nakahira et al, 2011; Choe et al, 2014). Nossos resultados demonstram que um aumento da forma clivada e madura da caspase-1 foi acompanhado de um aumento dos níveis da p62.

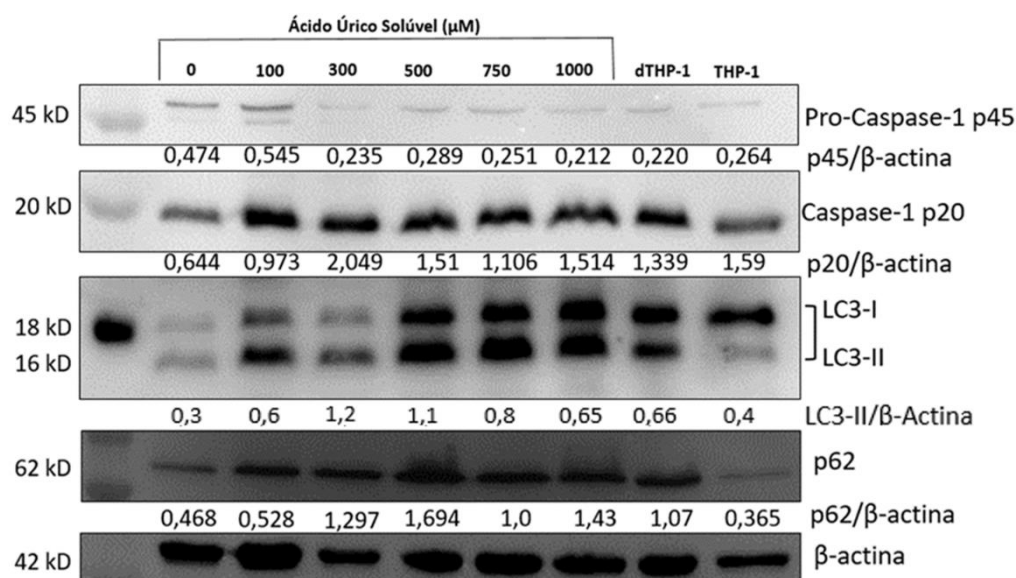


FIGURA 25: Ácido úrico solúvel aumenta os níveis de proteínas LC3-II e p62-sequestessoma-1 após 24 h após tratamento células THP-1 diferenciadas por PMA (5 ng.mL^{-1} por 48h). A conversão em LC3-II é acompanhada do acúmulo de p62. As linhas de 0-1000 μM urato representam o tratamento com ácido úrico solúvel; 72 h representa controle com meio completo RPMI 1640 (48 h de diferenciação + 24 h em meio completo). O controle de carregamento foi feito por β -actina. Os números representam a densidade óptica (D.O.) e a normalização do Western-blotting foi feita pela razão D.O./ β -actina (n=2).

5.8. Ácido úrico solúvel não induz morte por apoptose

Para investigar se o tratamento poderia induzir a apoptose foi realizado o ensaio de apoptose por citometria de fluxo após o tratamento com o ácido úrico solúvel por 24 h. Os resultados apresentados na figura 26a (painel) demonstraram que não houve morte por apoptose significativa provocada pelo ácido úrico solúvel. A frequência de células apoptóticas variou de 2,8 a 4,4% pelo tratamento com urato, enquanto os controles experimentais para meio completo e IL-4/M2 apresentaram 2,62% e 5,4% respectivamente (50 mil eventos). Esses resultados indicam que a baixa quantidade de morte celular por apoptose (< 5%) não inviabilizou o tratamento *in vitro*.

A expressão da PARP-1, a Poli (ADP-ribose) polimerase-1 (116 kD), uma enzima envolvida no reparo do DNA em resposta ao estresse ambiental, sensível à clivagem por proteínas *tipo-caspases* e que pode indicar processo de apoptose em curso, também foi avaliada (Munoz-Gámez, 2009). Durante a sinalização da apoptose pode ser clivada e inativada pela caspase-3. Quando clivada apresenta fragmentos de aproximadamente 89 e 24 kD indicado que a célula está engajada no processo apoptótico. No nosso modelo de tratamento por 24 h não verificamos a clivagem da PARP-1 por western-blot (26b).

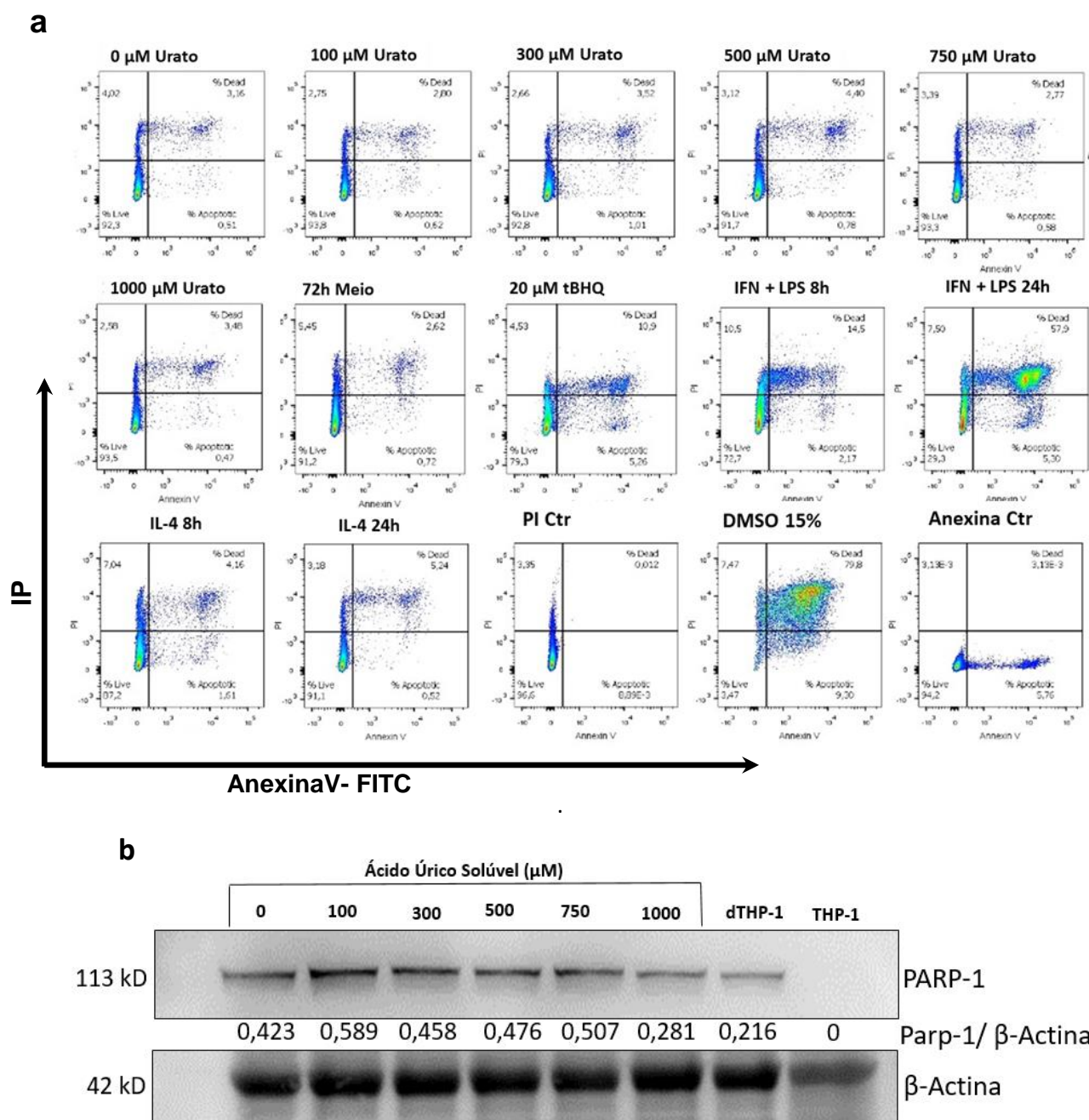


FIGURA 26: Tratamento por 24 h com ácido úrico solúvel em cultura de células THP-1 diferenciadas com PMA (5 ng.mL^{-1} por 48 h) não induz apoptose. Os gráficos (dotplot) acima, em painel a) representam a sequência de grupos tratados com ácido úrico solúvel de 0,100, 300, 500, 750 e 1000 μM e seus controles após ensaio de apoptose por citometria de fluxo utilizando quite Anexina-V e Iodeto de propídio (IP). Células duplamente marcadas são consideradas células em início de apoptose (AnexinaV+IP-) ou morte por apoptose (AnexinaV+IP+); dTHP-1 representa controle com meio completo RPMI 1640 (48 h de diferenciação + 24 h em meio completo) e THP-1 representa células não diferenciadas do tipo pró-monócito. Em b) a expressão da PARP-1 após 24 h de exposição ao urato. Os números representam a normalização do western-blotting através da razão PARP-1/ β -actina. (n=2).

6. Discussão

Neste trabalho, fornecemos algumas evidências que o ácido úrico solúvel em concentrações fisiológicas poderia modular vias envolvidas na polarização fenotípica de células THP-1 diferenciadas em macrófagos. O tratamento com o ácido úrico modificou o fenótipo dessas células para M2 através do aumento da expressão do CD206 e redução da expressão da NOS2, regulando negativamente fatores canônicos de vias de sinalização redox como o Nrf2/HO-1.

Inicialmente, com o intuito de identificar as possíveis contribuições do ácido úrico na sua forma solúvel sobre a polarização de macrófagos, testamos o marcador clássico para o perfil de polarização M1/inflamatório, a iNOS, o marcador de perfil M2/anti-inflamatório, CD206, e o marcador de perfil de polarização ativado por modificação oxidativa (Mox), o Nrf2, juntamente com o produto de ativação da transcrição, a heme oxigenase-1 (Kadl et al, 2010). Houve aumento da expressão do receptor de manose, CD206/MRC-1, com aumento da concentração de ácido úrico. Ainda, verificamos uma redução na expressão da NOS2. Alteração de ambas proteínas sugere uma polarização para M2.

Resultados obtidos por Braga em 2014 demonstraram que macrófagos do subtipo M1 re-injetados em camundongos C57BL/6 após três dias de início da fibrose renal repopulam os rins e adquirem um perfil alternativo/M2 após a exposição ao ácido úrico. Ainda, foi demonstrado que a concentração 180 μM de ácido úrico solúvel aumentou discretamente a expressão do receptor de manose CD206 em macrófagos obtidos da medula óssea de camundongos. Esse aumento foi mais expressivo e significativo quando em combinação do LPS (10 ng.mL^{-1}) (Braga, 2014).

Em nossos resultados, observamos que o ácido úrico parece ter pouca influência na regulação da expressão da NF- κ B p65 em concentrações fisiológicas entre a faixa de 100 a 500 μ M (Figura A.20), ao menos, após o tempo de 24 h de exposição. Talvez, uma análise em curso temporal nos tempos iniciais de tratamento, avaliando-se tempos mais curtos de exposição ao urato possa fornecer respostas mais relevantes e precisas quanto ao envolvimento da via NF- κ B a polarização em células THP-1 e em linhagem distinta de macrófagos para efeito de comparação após exposição ao ácido úrico solúvel (Holden et al, 2008; Hellweg et al, 2006).

Spiga e colaboradores publicaram um trabalho em 2017 em que o ácido úrico em condições de hiperuricemia está associado com biomarcadores inflamatórios, porém é capaz de modular negativamente a expressão do NF- κ B, reduzindo sua expressão e conseqüente a inflamação. Embora a literatura apresente resultados contraditórios e discrepantes quanto ao uso do ácido úrico na sua forma solúvel, sugerimos que essas respostas dúbias se devam ao método de escolha para solubilização do ácido úrico e permita a formação e/ou precipitação de microcristais, e conseqüente contaminação dos experimentos *in vitro*. Ma & Cols. publicaram estudo em que questionam resultados publicados em diversos trabalhos quanto ao uso de ácido úrico solubilizado por aquecimento em experimentação *in vitro*. Esses pesquisadores testaram os efeitos do ácido úrico solubilizado por método de aquecimento e por método de solubilização através do NaOH. Puderam observar nas soluções de estoque, a presença de microcristais nas preparações que se utilizaram de aquecimento para solubilização do ácido úrico. Ainda, testaram a mesma solução estoque em cultura experimental com células THP-1 e observaram efeitos pró-inflamatórios após 24 h de exposição ao ácido úrico através da presença

de IL-1 β . O mesmo experimento foi testado com o ácido úrico solubilizado em NaOH e as células não apresentaram expressão do mesmo marcador pró-inflamatório (Ma et al, 2020). Além disso, outro grupo de pesquisa demonstrou resposta em estudo com células humanas obtidas de sangue periférico, em que a presença de cristais seria a responsável pelo perfil pró-inflamatório dos experimentos *in vitro* com ácido úrico (Brovold et al, 2019).

Cheng et al (2020) demonstraram que um possível mecanismo envolvido na regulação da inflamação pelo ácido úrico seria de regulação epigenética. O urato preveniria a acetilação da HMGB1, uma proteína redox-sensível e não-histona mais abundante associada a cromatina com diversas funções, entre elas a transcrição de genes envolvendo diversos processos celulares como a inflamação e a diferenciação celular. A HMGB1 quando acetilada promove a ativação da inflamação como um DAMP e aumenta a expressão de receptores TLR4/NF- κ B (Wang et al, 2004; Lotze et al, 2007).

Dados da literatura colocam a existência de um sinergismo presente em células mieloides em que o fator Nrf2 atua como imunomodulador. Kobayashi et al (2016) demonstraram que o Nrf2 inibe a transcrição de citocinas inflamatórias e um conjunto de genes relacionados ao perfil M1 através da interferência na regulação NF- κ B. O mecanismo descrito por esse estudo afirma que a ativação do Nrf2 promove uma desregulação no início da transcrição e no recrutamento da RNAPII para os sítios de início de transcrição da IL-6 e IL-1 β , repercutindo na redução da inflamação. Os autores demonstraram que o Nrf2 regula negativamente 561 genes do perfil M1 (Kobayashi et al, 2016).

Em nosso estudo, as células THP-1 diferenciadas apresentam aumento da expressão da via Nrf2/HO-1 (Figura A.18). Entretanto, o tratamento com ácido úrico

solúvel por 24h reduziu tanto a expressão nuclear deste fator quanto o produto de sua ativação, a HO-1. Resultados obtidos dos perfis de citocinas inflamatórias não foram conclusivos. Além disso, nossos resultados não permitem inferir a respeito de um estado menor de inflamação através da interferência do Nrf2, devido aos resultados inconclusivos do perfil de citocinas secretadas e da ausência de testes com inibidores farmacológicos da via Nrf2 e/ou estratégias com uso de RNAi para avaliar sua participação nos resultados.

Embora a transformação maligna apresente muitas modificações em seu genoma o que o torna instável, linhagens usadas para pesquisa experimental apresentam inúmeras vantagens. A linhagem THP-1, comparada às células monocíticas humanas conserva vias de sinalização inflamatórias e a maioria das características de monócitos. Seu genoma é homogêneo, o que minimiza o grau de variabilidade em fenótipo de células, aumenta a consistência e reprodutibilidade experimental (Chanput et al, 2004; Qin, 2012; Baxter et al, 2020). De acordo com os dados do *COSMIC Cell Line Gene Mutation Profiles Dataset*, essa linhagem de células mieloide apresentam 435 genes mutados (Rouilland et al, 2016). Ao mesmo tempo, monócitos primários obtidos de voluntários apresentam níveis de marcadores e características de cada indivíduo, tal como suas próprias características intrínsecas de níveis de transcrição, marcas epigenéticas e diferenças metabólicas que poderiam não ser desejadas e envolvidas na pesquisa de fenótipos, e inflamação (Kurotaki et al, 2017; Chen et al, 2019; Chawla et al, 2011).

Dentre os componentes que podem influenciar a polarização de macrófagos encontram-se os níveis de ATP, CD39 e CD73. O nucleosídeo adenosina pode contribuir para um perfil próximo ao M2 através da ativação de receptores na membrana plasmática (Cekic & Linden, 2016; Cronstein & Sitkovsky, 2017; Murphy

et al, 2017). A adenosina se acumula no espaço extracelular em resposta a distúrbios metabólicos e a outros insultos que incluem inflamação, dano físico e processo de apoptose (Kosksó et al, 2013). Os efeitos na célula da adenosina são mediados por receptores purinérgicos (A1R, A2Ar, A2bR e A3R). A sinalização do receptor A2aR aumenta a síntese de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10, inibe a proliferação de linfócitos T, suprime a capacidade de neutrófilos e macrófagos de eliminar microrganismos, e acentua a polarização ao perfil macrófagos M2 e plasmoblastos (Haskó et al, 2008; Haskó & Cronstein, 2013; Nascimento et al, 2021). Considerando a similaridade estrutural entre a adenosina e o ácido úrico, acredita-se que este possa produzir sinais pelos mesmos receptores (Csóka et al, 2012; Morelli et al, 2011).

Não sabemos o mecanismo exato como o ácido úrico atua na alteração fenotípica das células THP-1, se por ligar em receptores de membranas, se age internamente entrando na célula através de canais de transporte de urato e ânions orgânicos, ou ambos. Spiga et al (2017) formularam a hipótese que o urato atua após sua entrada na célula. Os autores demonstraram indução de resposta e ativação da via do NF- κ B pelo ácido úrico de modo dose-dependente em células HepG2 e HEK293. Este efeito foi prevenido nas células previamente tratadas com Benzbromarona (50 μ M). A Benzbromarona é um inibidor do transportador de urato, URAT1, sugerindo que o urato atuaria regulando a via κ B intracelularmente e não através de um ou mais receptores de superfícies do tipo *Toll* (TLRs). Outros autores também sugerem que os efeitos do ácido úrico ocorram após sua entrada nas células pelo transportador URAT1 (Martínez-Reyes et al., 2020).

O estudo realizado por Jha e colaboradores (2015) descreve que uma rede integrada interfere na resposta de polarização e na expressão fenotípica em

macrófagos murinos e que efeitos de carenciamento de aminoácidos como glutamina (Gln) afeta a polarização para o perfil M2 (Gln é altamente efetiva para a ativação de macrófagos para o perfil M2). Nosso protocolo de tratamento utilizou meio de cultura RPMI 1640 carenciado de antioxidantes (Cistina, precursor da Cys, Met e GSH) e de soro fetal bovino, pois o objetivo no futuro é comparar os efeitos encontrados na incubação das células com ácido úrico em relação à incubação com o produto de sua oxidação, o hidroperóxido de urato. A fim de evitar a neutralização direta do hidroperóxido de urato por antioxidantes ou componentes do soro, decidimos removê-los da cultura. Já que a ausência de aminoácidos poderia afetar a resposta de polarização fenotípica, adicionamos um controle que foi mantido em meio de cultura completo (72 h) (Meio RPMI 1640 suplementado com SFB 20%). O que verificamos é que as respostas obtidas foram diferentes apenas para a STAT3 em relação aos grupos tratados e mantidos com meio sem antioxidantes e sem soro fetal.

Ademais, testamos se o tratamento com o ácido úrico solúvel poderia induzir a morte celular por apoptose. Verificamos que o tratamento com o ácido úrico solúvel não induziu morte celular por apoptose de forma significativa (<5% de morte por apoptose). A apoptose é um mecanismo de morte celular programada que é usada pelo organismo para remover células de forma segura envolvendo mecanismos não-inflamatórios. Células em apoptose podem regular a polarização fenotípica de macrófagos e acentuar a ação anti-inflamatória através da fagocitose, um processo descrito como eferocitose (Piraghaj et al, 2018). Ainda, o ensaio de viabilidade celular realizado através da medida dos níveis de LDH no sobrenadante da cultura celular demonstrou baixos níveis dessa enzima, indicando que o tratamento foi viável

(dados não apresentados). Ademais, macrófagos são células resistentes a apoptose (Linton et al, 2016).

Nossos achados revelam uma nova função do urato no *priming* celular de macrófagos. Usando uma combinação de marcadores de polarização, apresentamos que a alteração do fenótipo é acompanhada da regulação da via Nrf2/HO-1. Inferimos também que, essa modificação de fenótipo possa, por sua vez, afetar o seu microambiente e alterar o comportamento de células vicinais como observado em estudo publicado por Goodman et al (2019) e Graney e cols. (2020). Os autores desse último trabalho demonstraram que macrófagos polarizados para perfis pró-inflamatórios (M1) em co-cultura com células endoteliais apresentam influência na resposta de expressão dessas células e regulam positivamente genes envolvidos na formação de novos vasos (*sprouting angiogenesis*). Enquanto macrófagos polarizados para perfis anti-inflamatórios, pró-cicatrização e pró-remodelamento (M2a, M2c e M2f), sob as mesmas condições experimentais, induzem a expressão gênica na diferenciação de perócitos. A partir disso, hipotetizamos que em condições de hiperuricemia assintomática, macrófagos polarizados possam modificar o fenótipo do endotélio vascular e de outras células vicinais, e conseqüentemente, influenciar no processo de vascularização e/ou propagar uma cascata de sinais modificando fenótipos de células próximas.

Ademais, outras repercussões clínicas da hiperuricemia assintomática podem ser consequência da regulação diferencial de células do sistema imune e pacientes com sepse são um exemplo disso. Após o sucesso do tratamento de uma infecção inicial, esses pacientes ficam mais susceptíveis a outras infecções graves, devido em parte, a uma imunossupressão promovida pelo efeito de tolerância imunológica. Essa tolerância é desencadeada, em parte, pela diferenciação fenotípica de

linfócitos e células mielóide para um perfil alternativo, com consequente prejuízo na eliminação de microrganismos patogênicos e apoptose (Venet & Monneret, 2018; Fonseca et al, 2020; Rocha et al, 2021).

Outras considerações

A proliferação de células que mantenham certo potencial de diferenciação é influenciada pelo estado de oxidação de proteínas e por mecanismos de sinalização disparados por essas mudanças (Tan et al, 2016; Short et al, 2016). Baseado nessa ideia, uma das proteínas de interesse pesquisadas nesse trabalho foram as 2-Cys peroxiredoxinas (2-Cys-Prx). Além disso, um dos objetivos deste estudo seria verificar qual contribuição dessas proteínas e como estariam relacionadas à regulação da via do Nrf2. Encontramos, inicialmente, que a Prx1, Prx2 e Prx4 são reguladas negativamente após a diferenciação por PMA (Figura A.25 e A.26). A partir dos experimentos realizados não encontramos relação entre as alterações fenotípicas causada pelo o ácido úrico e a regulação e a expressão das Prx1 e Prx2 (Figura suplementar A.27 e A.28) e nem a frequência de células foi modificada pelo tratamento (Figura A.6-8). Entretanto, outros achados interessantes foram conferidos e podem ser enumerados: (1) a medida de intensidade de fluorescência (MFI) normalizada por células positivas para o marcador demonstrou que o tratamento com o ácido úrico solúvel reduz a expressão das Prx1 e Prx2 após 24 h; (2) a expressão celular da Prx2 ainda é superior à da Prx1, como também observado nos resultados obtidos pela MFI por citometria de fluxo e também apresentados nos dados suplementares do apêndice por western-blotting, Tabela A.17; (3) a Prx1, em sua maior parte, está oxidada, isto é, sob a forma de dímero como observado em condições não-redutoras de SDS-PAGE, indicando que modificações sutis nessa

proteína possam estar acontecendo e podem ser melhor investigadas nas condições deste estudo no futuro. As expressões basais e temporais dessas proteínas foram conferidas e são apresentadas nas figuras suplementares A.25a-b e A.26 (em resultados preliminares com curvas de calibração para a proteína purificada recombinante rPrx1 e rPrx2 confirmamos que a quantidade de Prx2 é superior em comparação a Prx1 em células THP-1, resultados não apresentados).

Observamos também que o tratamento e diferenciação de células THP-1 responde de forma diferente à densidade de semeadura e expressou mais características de macrófagos pró-inflamatórios (maior espriamento) nas densidades intermediárias testadas (1.000-1.600 células/mm²) do que na densidade próxima de 3.000 células/mm². Sendo sugestivo que o espaçamento entre as células é determinante e possa influir para obtenção de características específicas como fenótipo (McWhorter et al, 2013). Salientamos que o valor de 2×10^6 células em placas de 6 poços (20.000 células/mm²) foi utilizada durante todo o período de realização de experimentos deste estudo para obtenção dos dados de citometria de fluxo e western-blot.

Ademais, este trabalho apresenta algumas limitações para responder como o tratamento com o ácido úrico altera o fenótipo de macrófagos a partir das células THP-1 diferenciadas e qual(is) contribuições as Prxs podem trazer para elucidar mecanismos. Além disso, não houve tempo hábil para quantificar o remanescente de ácido úrico no sobrenadante das culturas tratadas ao final das 24 h; não mensuramos produtos de oxidação advindos do tratamento; e não testamos se a alta concentração de ácido úrico (750 e 1000 μ M) poderia precipitar e formar microcristais que escapasse do nosso controle visual para solubilidade, ou mesmo precipitar na cultura em algum momento. E, por último, não avaliamos a capacidade fagocítica

dessas células durante a exposição ao ácido úrico. Num futuro próximo como perspectiva, nosso laboratório poderá responder a essas e outras questões.

7. Conclusões

Nesta tese exploramos a possibilidade de modular a resposta imune pelo ácido úrico solúvel como estratégia de conferir possível modulação de vias de sinalização inflamatória e redox *in vitro* em células fagocíticas. Em vista dos resultados obtidos, o ácido úrico, em sua forma solúvel, alterou a expressão de algumas proteínas envolvidas na polarização de células THP-1 diferenciadas em macrófagos, incluindo CD206 e a NOS2, além de atuar na regulação negativa da via redox Nrf2/HO-1. Sugerimos que parte dos efeitos do ácido úrico na polarização de macrófagos THP-1 devam-se à diminuição da expressão de via do Nrf2.

Referências

- Abraham & Kappas (2008) Pharmacological and clinical aspects of heme oxygenase. *Pharmacology Reviews*, vol. 60, n. 1, 79-127.
- Alberts, B. et al (2019) Secretion of IL-1 β from monocytes in gout is redox independent. *Frontiers in Immunology*, vol. 10, n. 70, 1-12.
- Ali, N. et al (2019) Relationship between serum uric acid and hypertension: a cross-sectional study in Bangladeshi adults. *Scientific Reports*, vol. 9, 9061, p. 1-7. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45680-4>
- Ames, B. N. et al (1981) Uric acid provides and antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *Proceedings National Academy Sciences of United States of America*, vol. 78, 6858-6862.
- Barros, M. et al (2013) Macrophage polarization: an immunohistochemical approach for identifying M1 and M2 macrophages. *Plos One*, vol. 8, 1-11.
- Baxter, et al (2020) Standardized protocols for differentiation of THP-1 cells to macrophage with distinct M(IFN γ +LPS), M(IL-4) and M(IL-10) phenotypes. *Journal of Immunological Methods*, vol. 478, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2019.112721>
- Bandaru, P. & Shankar, A. (2011) Association between serum uric acid levels and *diabetes mellitus* – Clinical Study. *International Journal of Endocrinology*, vol. 2011, ID 604715, 6 p. <dx.doi.org/10.1155/2011/604715>
- Becker, B. (1993) Towards the physiological function of uric acid. *Free Radical Biology & Medicine*, vol. 14, 615-631.
- Biswas, S. et al (2013) Tumor-associated macrophages: functional diversity, clinical significance, and open questions. *Seminars in Immunopathology*, vol. 35, n. 05, 585-600.
- Borghetti, C. et al (2017) Serum uric acid and cardiometabolic disease: another brick in the wall? *Hypertension*, vol. 69, 1011-1013.
- Boss, G. & Seegmiller, E. (1979) Hyperuricemia and gout — classification, complications and management. *The New England Journal of Medicine*, vol. 300, n. 26, 1459-1468.
- Bosshart, H. & Heinzemann, M. (2016) THP-1 cells as a model for human monocytes. *Annals of Translational Medicine*, vol. 21,1-4.
- Bouhidel, M.A. et al (2007) PPAR γ activation primes human monocytes into alternative M2 Macrophages with anti-inflammatory properties. *Cell Metabolism*, vol. 6 (2), 137-143.
- Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, vol. 72, 248-254.
- Braga, T. Participação de diferentes subtipos de macrófagos e a contribuição do ácido úrico solúvel, dos receptores TLR2 e TLR4 e das moléculas MyD88 e NLRP3 para o desenvolvimento da fibrose renal. [Tese]. São Paulo, Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas; 2014. Disponível em: <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/42/42133/tde-24092014-184133/pt-br.php>

Braga, T. et al, (2017) Soluble uric acid activates the NLRP3 Inflammasome. *Scientific Reports*, vol. 7, 39884 | DOI: 10.1038/srep39884

Bromberg, J. & Darnell Jr, J. (2000) The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene*, vol. 19, n. 21, 2468-2473.

Brovold, H. et al (2019) Crystallized but not soluble uric acid elicits pro-inflammatory response in short-term whole blood cultures from healthy men. *Scientific Reports*, vol. 9 (1):10513. doi: 10.1038/s41598-019-46935-w.

Brokaker, S.W. et al (2015) Innate immune pattern recognition: a cell biological perspective. *Annual Review of Immunology*, 33(1), 257– 290.doi:10.1146/annurev-immunol-032414-112240

Bryan, H.K. et al (2013) The Nrf2 cell defense pathway: Keap-1-dependent and –independent mechanisms of regulation. *Biochemical Pharmacology*, vol. 85, 705-717.

Buchser, W. et al (2014) Assay development guidelines for Image-based High Content Screening, High Content Analysis and High Content Imaging [Updated 2014 Sep 22]. in: *Markossian S, Sittampalam GS, Grossman A, et al., editors. Assay Guidance Manual [Internet]; Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Science. 1-62 p.*

Bursill, D. et al (2019) Gout, Hyperuricemia, and Crystal-associated disease network consensus statement regarding labels and definitions for diseases elements in gout. *Arthritis Care & Research*, vol. 71, 427-434.

Bystrom, J. et al. (2008) Resolution-phase macrophages possess a unique inflammatory phenotype that is controlled by cAMP. *Blood*, vol. 111, 4117-4127.

Canè, S. et al (2019) The endless saga of monocyte diversity. *Frontiers in Immunology*, vol. 10, n. 1786, 1-18. doi: 10.3389/fimmu.2019.01786

Canning, P. et al (2015) Structural basis of Keap1 interactions with Nrf2. *Free Radical Biology & Medicine*, vol. 88, 101-107.

Cantor, J. (2017) Physiologic medium rewires cellular metabolism and reveals uric acid as an endogenous inhibitor of UMP synthase. *Cell*, vol. 169, 258-272.

Carvalho, L. et al (2017) Urate hydroperoxide oxidizes human peroxiredoxin 1 and peroxiredoxin 2. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 292, n. 21, 8705-8715.

Carvalho, L. et al (2018) Uric acid disrupts hypochlorous acid production and the bactericidal activity of HL-60 cells. *Redox Biology*, Vol. 16, 179-188.

Cekic, C. & Linden, J. (2016) Purinergic regulation of the immune system. *Nature Reviews Immunology*, vol. 16, 177-192.

Chan, K. et al (1996) NRF2, a member of the NFE2 family of transcription factors, is not essential for murine erythropoiesis, growth, and development. *Proceedings of National Academy of Sciences of United States of America (USA)*, vol. 93, 13943-13948.

Chang, B.S.W. (2014) Ancient insights into uric acid metabolism in primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (USA)*, vol.111, n. 10, 3657-3658.

- Chanput, W. et al (2014) THP-1 cell line: an in vitro cell model for immune modulation approach. *International Immunopharmacology*, vol. 23(1), 37-45.
- Chawla, A. et al. (2011) Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. *Nature Reviews Immunology*, vol. 11, 738–749.
- Chen, F. et al. (1998) Crystal structure of p50/p65 heterodimer of transcription factor NF- κ B bound to DNA. *Nature*, 391, 410-413.
- Chen, P. et al (2014) Autophagy-mediated regulation of macrophages and its applications for cancer, *Autophagy*, vol. 10, n. 2, 192-200.
- Chen, S. et al (2019) Epigenetic regulation of macrophages: from homeostasis maintenance to host defense. *Cellular and Molecular Immunology*. <https://doi.org/10.1038/s41423-019-0315-0>
- Cheng, G. et al (2020) The protective effect of uric acid in reducing TLR4/NF- κ B activation through the inhibition of HMGB1 acetylation in a model of ischemia–reperfusion injury in vitro. *Molecular Biology Reports*, vol. 47, 3233–3240. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05324-7>
- Chhana, A. & Dalbeth, N. (2015) Factors influencing the crystallization of monosodium urate: a systematic literature review. *BMC Musculoskeletal Disorders*, vol. 16, 296. <https://doi.org/10.1186/s12891-015-0762-4>.
- Chinetti-Gbaguidi, G. et al (2015) Macrophage subsets in atherosclerosis. *Nature Reviews Cardiology*, vol. 12, n.1, 10-17.
- Cho, S. K et al (2018) U-Shaped association between serum uric acid level and risk of mortality - a Cohort study. *Arthritis & Rheumatology*, vol. 70, 1122-1132.
- Choe, J-Y. et al (2014) Enhanced p62 expression through impaired proteasomal degradation is involved in caspase-1 activation in monosodium urate crystal-induced interleukin-1 β expression. *Rheumatology*, vol. 53, 1043-1053.
- Collet, J. & Messens, J. (2010) Structure, function, and mechanism of thioredoxin proteins. *Antioxidants & Redox Signaling*, vol. 13, n. 08, 1205-1229.
- Crisan, T.O. et al, (2017). Uric acid priming in human monocytes is driven by the AKT-PRAS40 autophagy pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (USA)*, vol. 23, 114 (21): 5485-5490. doi: 10.1073/pnas.1620910114. Epub 2017 May 8.
- Cronstein, B.N. & Sitkovsky, M. (2017) Adenosine and adenosine receptors in the pathogenesis and treatment of rheumatic diseases. *Nature Reviews Rheumatology*, vol. 13, 41-51.
- Csoka, B. et al (2012) Adenosine promotes alternative macrophage activation via A2A and A2B receptors. *FASEB Journal*, vol. 26, 376-386.
- Cui, H. & Liu, G. (2014) How noncoding RNAs contribute to macrophage polarization. In: Greene C. (eds) *MicroRNAs and Other Non-Coding RNAs in Inflammation*. *Progress in Inflammation Research*. Editora Springer. doi.org/10.1007/978-3-319-13689-9_4

- Dalbeth, N. et al (2016) Gout. *The Lancet*, vol. 388, n. 10055, 2039-2052.
- Dalberth, N. (2019) Gout. *Nature Reviews Diseases Primer*, vol. 5, 69.
- Darnel Jr, J. (1997), STATs and genes regulation. *Science*, vol. 277, n. 5332, 1630-1635.
- Dehlin, M. et al (2020) Global epidemiology of gout: prevalence, incidence, treatment patterns and risk factors. *Nature Reviews Rheumatology*, vol. 16, 380–390.
- Deng, H. et al (2013) Molecular mechanism responsible for the priming of macrophage activation. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 288, n. 06, 3897-3906.
- Döring, A. et al (2008) SLC2A9 influences uric acid concentrations with pronounced sex-specific effects. *Nature Genetics*, vol. 40, n.4, 430-436.
- Dorrington, M. & Fraser, L. (2019) NF- κ B signaling in macrophages: dynamics, crosstalk, and signal integration. *Frontiers in Immunology*, vol. 10, n. 705, 1-12.
- Duluc, D. et al (2007) Tumor-associated leukemia inhibitory factor and IL-6 skew monocyte differentiation into tumor associated macrophage-like cells. *Blood*, vol. 110, 4310-4330.
- Espinosa-Diez, C. et al (2015) Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. *Redox Biology*, vol. 06, 183-197.
- Fang, J. & Alderman, M.H. (2000) Serum uric acid and cardiovascular mortality- The NHANES I epidemiologic follow-up study (1971-1992). *JAMA*, vol. 283, n. 18, 2404-2410. doi:10.1001/jama.283.18.2404
- Fang, et al (2013) A double-edged sword: uric acid and neurological disorders. *Brain Disorders & Therapy*, vol. 2, n. 2, 109. doi: 10.4172/2168-975X.1000109
- Feig, D. et al (2008) Uric acid and cardiovascular risk. *The New England Journal of Medicine*, 359(17): p. 1811-21.
- Fini, M.A. et al (2012) Contribution of uric acid to cancer risk, recurrence, and mortality. *Clinical and Translational Medicine*, vol. 1, n. 16. <https://doi.org/10.1186/2001-1326-1-16>
- Foster, C. et al (2020) Excess serum uric acid is associated with metabolic syndrome in obese adolescent patients. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*, vol. 19, n.1, 535-543.
- Fraternale, A. et al (2015) Polarization and repolarization of macrophages. *The Journal of Clinical & Cellular Immunology*, vol.6, n. 2, 1000319. doi: 10.4172/2155-9899.1000319
- Frei, B. et al (1989) Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. *Proceedings National Academy of Sciences of United States of America*, vol. 86, n. 16, 6377-6381.
- Gilmore, T.D. (2006) Introduction to NF- κ B: players, pathways, perspectives. *Oncogene*, vol. 25, 6680-6684.
- Glass, C. & Natoli, G. (2016) Molecular control of activation and priming in macrophages. *Nature Immunology*, vol. 17, 26-33.
- González-Crespo, S. & Levine, M. (1994) Related target enhancers for dorsal and NF-kappa B signaling pathway. *Science*, vol. 264, n. 5156, 255-258.

Goodman, S. et al (2019) Macrophage polarization impacts tunneling nanotube formation and intercellular organelle trafficking. *Scientific Report*, vol. 9, 14529 <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50971-x>

Gordon, S. & Martinez, F. (2010) Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity*, vol. 32, 593-604.

Grainger, R. et al (2013) Hyperuricaemia elevates circulating CCL2 levels and primes monocyte trafficking in subjects with inter-critical gout. *Rheumatology (Oxford)*, vol. 52, n. 6, 1018-1021.

Graney, P.L. et al (2020) Macrophages of diverse phenotypes drive vascularization of engineered tissues. *Science Advances*, vol. 06, n.18, eaay6391 DOI: 10.1126/sciadv.aay6391

Haskó, G. et al (2008). Adenosine receptors: therapeutic aspects of inflammation and immune diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 7, 759-770.

Haskó, G. & Pacher, P. (2013) Regulation of inflammation by adenosine. *Frontiers in Immunology*, vol. 4, 1-8.

Hayden, M. & Ghosh, S. (2008) Shared principles in NF- κ B signaling. *Cell*, vol.132, 344-362.

Hayes, J. & Dinkova-Kostova, A. (2014) The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism. *Cell Press*, vol. 39, n.4, 199-218.

He, F. et al (2020) NRF2 activates growth factor genes and downstream AKT signaling to induce mouse and human hepatomegaly. *Journal of Hepatology*, vol. 72, n. 06, 1182-1195.

Hellweg, C. et al (2006) Activation of nuclear factor kappa B by different agents: influence of culture conditions in a cell-based assay. *Annals of New York Academy of Sciences*, vol. 1091, 191-204.

Hiebert, P. & Werner, S. (2019) Regulation of wound healing by the NRF2 transcription factor—more than cytoprotection. *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 20, n.16, 3856. doi.org/10.3390/ijms20163856

Hirano, T. et al (2000) Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors. *Oncogene*, vol.19, 2548-2556.

Hoffmann, A. et al (2006) Transcriptional regulation via NF-kappaB signaling module. *Oncogene*, vol. 25, 6706-6716.

Holden, N. et al (2008). Phorbol ester-stimulated NF-kappaB-dependent transcription: roles for isoforms of novel protein kinase C. *Cellular Signalling*, vol. 20, 1338-1348.

Huang, D. et al (1997) The role of DNA in the mechanism of NF- κ B dimer formation: crystal structures of the dimerization domains of p50 and p65 subunits. *Structure*, vol. 5, 1427-1436.

Huxford, T. & Gosh, G. (2009) A structural guide to proteins of NF- κ B signaling module. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, vol.1, a000075, 1-16.

Imhoff, B. & Hensen, J. (2010) Tert-butylhydroquinone induces mitochondrial oxidative stress causing Nrf2 activation. *Cell Biology and Toxicology*, vol. 26, n. 06, p. 541-551.

Jayakumar, S. et al (2015) Nrf2 facilitates repair of radiation induced DNA damage through homologous recombination repair pathway in a ROS independent manner in cancer cells. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, vol. 779, 33-45.

Johnson, R. et al (2003) Is there a pathogenetic role for uric acid in hypertension and cardiovascular and renal disease? *Hypertension*, vol. 41(6),1183-1190.

Johnson, R. & Rideout, B. (2004) Uric acid and diet - insights into the epidemic of cardiovascular disease. *The New England Journal of Medicine*, vol. 350, n.11, 1071-1073.

Johnson, R. et al (2008) The planetary biology of ascorbate and uric acid and their relationship with the epidemic of obesity and cardiovascular disease. *Medical Hypotheses*, vol. 71(1), 22-31.

Johnson, R. et al (2018) Hyperuricemia, acute and chronic kidney disease, hypertension, and cardiovascular disease: report of a scientific workshop organized by the National Kidney Foundation. *American Journal of Kidney Diseases*, vol. 71(6), 851-865.

Joosten, L. et al (2020) Asymptomatic hyperuricaemia: a silent activator of the innate immune system. *Nature Reviews Rheumatology*, vol.16, n. 2, 75-86. doi: 10.1038/s41584-019-0334-3.

Jung, S. et al (2020) Autophagy as a decisive process for cell death. *Experimental & Molecular Medicine*, vol. 52, 921-930.

Kadl, A. et al (2010) Identification of a novel macrophage phenotype that develops in response to atherogenic phospholipids via Nrf2. *Circulation Research*, vol. 107, n. 6, 737-46.

Kang, D.H. & Nakagawa, T. (2005) Uric acid and chronic renal disease: Possible implication of hyperuricemia on progression of renal disease. *Seminars in Nephrology*, vol. 25, 43-49.

Kang, D.H. & Johnson, R.J. (2020) Uric acid metabolism and the kidney. *Chronic Renal Disease*, 689–701. doi:10.1016/b978-0-12-815876-0.00043-7

Khanna, D. et al (2012) 2012 American College of Rheumatology Guidelines for Management of Gout. Part 1: Systematic Nonpharmacological and Pharmacologic Therapeutic Approaches to Hyperuricemia. *Arthritis Care & Research*, vol. 64, 1431-1446.

Kisseleva, T. et al (2002) Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene*, vol. 285, 1-24.

Klionsky, D. et al (2008) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy*, vol. 16, n. 4 (2), 151-175.

Kobayashi, E. et al (2016) Nrf2 suppresses macrophage inflammatory response by blocking proinflammatory cytokine transcription. *Nature Communications*, vol. 7, 1-14. DOI: 10.1038/ncomms11624

Komatsu, M. et al (2010) The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap-1. *Nature Cell Biology*, vol. 12, 213-223.

Kono, H. et al (2010) Uric acid promotes an acute inflammatory response to sterile cell death in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 120, 1939-1949.

Kono, H. & Rock, K.L. (2008) How dying cells alert the immune system to danger. *Nature Reviews Immunology*, vol. 08, 279-289.

Kocsó, B. et al. (2013) Adenosine augments IL-10-induced STAT3 signaling in M2c macrophages. *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 94, 1309-1315.

Kuo, C.-F. et al (2015) Global epidemiology of gout: prevalence, incidence and risk factors. *Nature Reviews Rheumatology*, vol. 11, 649-662.

Kurotaki, D. et al (2017) Transcriptional control of monocyte and macrophage development. *International Immunology*, vol. 29(3), 97-107.

Levy, D. & Darnell, J. (2002) STATs: transcriptional control and biological impact. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 03, 651-662.

Li, Q. et al (2019) Diagnosis and treatment for Hyperuricemia and gout: a systematic review of clinical practice guidelines and consensus statements. *BMJ Open*, vol. 9, 1-13: e026677. doi: 10.1136/bmjopen-2018-026677

Lim, C. & Cao, X. (2006) Structure, function, and regulation of STAT proteins. *Molecular Biosystems*, vol. 2, 536-550.

Linton, M.F. et al (2016). Macrophage apoptosis and efferocytosis in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circulation Journal*, v. 80, 2259-2268.

Lozse, M. et al (2007) The grateful dead: damage-associated molecular pattern molecules and reduction/oxidation regulate immunity. *Immunological Review*, vol. 220, p. 60–81.

Lufe, C. et al (2007) Pin1 is required for the Ser727 phosphorylation-dependent STAT3 activity. *Oncogene*, vol. 26, 7656-7664.

Lum, J. et al (2005) Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell*, vol. 120, 237-248.

Ma, Q. (2013) Role of Nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annual Reviews Pharmacology & Toxicology*, vol. 53, 401-426.

Ma, Q. (2020) Soluble uric acid is an intrinsic negative regulator of monocyte activation in monosodium urate crystal-induced tissue inflammation. *The Journal of Immunology*, vol. 205, 1-12. DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2000319>

Mandal, A. & Mount, D.B. (2015) The molecular physiology of uric acid homeostasis. *The Annual Review of Physiology*, vol. 77, 22.1-22.3.

Martillo, M.A. et al (2014) The crystallization of monosodium urate. *Current Rheumatology Reports*, vol. 16, 400. doi:10.1007/s11926-013-0400-9

Martin, W. et al (2011) Monosodium urate monohydrate crystal-recruited noninflammatory monocytes differentiate into M1-like proinflammatory macrophages in a peritoneal murine model of gout. *Arthritis & Rheumatism*, vol.63, n. 05, 1322-1332.

- Martinez, F. et al (2009) Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annual Review of Immunology*, vol. 27, n. 01, 451-483.
- Martinez, F. & Gordon, S. (2014) The M1 and M2 paradigm of macrophage activation time for reassessment. *F100Prime Reports*, vol. 06, 1-13.
- Martínez-Reyes, C. et al (2020) Uric acid has direct proinflammatory effects on human macrophages by increasing proinflammatory mediators and bacterial phagocytosis probably via URAT1. *Biomolecules*, vol. 10, 576; 1-16.
- Martinon, F. (2020) Mechanisms of uric acid crystal – mediated autoinflammation. *Immunological Reviews*, vol. 233, n.01, 218-232.
- Matsuo, H. et al (2009) Common defects of ABCG2, a high capacity urate exporter, cause gout: a function – a based genetic analysis in a Japanese population. *Science Translational Medicine*, vol. 01, n.05, 5ra77.
- Mazzali, M. et al (2001) Elevated uric acid increases blood pressure in the rat by a novel crystal-independent mechanism. *Hypertension*, vol. 38, 1101-1106.
- Mazzali, M. et al (2002). Hyperuricemia induces a primary arteriopathy in rat by a blood pressure-independent mechanism. *American Journal Renal Physiology* vol. 6, F991-F997.
- McLaughlin, R. Monocyte regulation by soluble uric acid [Thesis]. Wellington, Victoria University of Wellington, School of Biological Sciences, 2014. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10063/3328>
- McWhorter, F. et al (2013) Modulation of macrophage phenotype by cell shape. *Proceedings of National Academia of Sciencies of United States of America (USA)*, vol.43, 17253-17258.
- Mehta, M. et al (2017) Mitochondrial control of immunity: beyond ATP. *Nature Reviews Immunology*, vol. 17, 608-620.
- Meisinger, C. et al (2008) Uric Acid levels are associated with all-cause and cardiovascular disease mortality independent of systemic inflammation in men from the general population - The MONICA/KORA Cohort Study. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 28, n. 6, 1186–1192.
- Meotti, F.C. et al (2011) Urate as physiological substrate for myeloperoxidase. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 286, n. 15, 12901-12911.
- Mizushima, N. & Yoshimori, T. (2007) How to interpret LC3 Immunoblotting. *Autophagy*, vol. 3, n. 6, 542-545.
- Morelli, M. et al (2011) Pathophysiological roles for purines: adenosine, caffeine and urate. *Progress in Brain Research*, vol. 183, 183–208.
- Morgan, M. & Liu, Z. (2011) Crosstalk of reactive oxygen species and NF-κB signaling. *Cell Research*, vol. 21, 103-105.
- Mosser, D. & Edwards, J. (2008) Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature*, vol. 8, 958-969.
- Moussa, Z. et al (2019) Nonenzymatic exogenous and endogenous antioxidants. In: *Free Radical Medicine and Biology*, Kusal Das. London, UK: IntechOpen, 2020, p.1-22.

Munoz-Gámez, J.A. et al (2009) PARP-1 is involved in autophagy induced by DNA damage. *Autophagy*, vol.5, n.1, 61-74.

Murphy, P.S. et al. (2017) CD73 regulates anti-inflammatory signalling between apoptotic cells and endotoxin-conditioned tissue macrophages. *Cell Death and Differentiation*, vol. 24, 559-570.

Murray, P. J. (2014) Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*, vol. 41, 14-20. doi: 10.1016/j.immuni.2014.06.008.

Murray, P. (2017) Macrophage Polarization. *Annual Reviews of Physiology*, vol.79, 541-566.

Murray, P. (2018) Immune regulation by monocytes. *Seminars in Immunology*, Vol. 35, 12-18.

Nabel, G. & Verma, I. (1993). Proposal NF- κ B/I κ B family nomenclature. *Genes & Development*, vol. 07, 2063.

Naito, Y. et al (2014) Heme oxygenase-1 and anti-inflammatory M2 macrophages. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 564, 83-88.

Nakamura, T. et al (2005) Redox regulation of lung inflammation by thioredoxin. *Antioxidants & Redox Signaling*, vol. 07, 60-71.

Nakahira, K. et al (2011) Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. *Nature Immunology*, vol. 12, 222-230.

Nascimento, D. et al (2021) Sepsis expands a CD39⁺ plasmablast population that promotes immunosuppression via adenosine-mediated inhibition of macrophage antimicrobial activity. *Immunity*, vol. 54, 2024-2041.

Nishio, Y. et al (2015) Cancer cell-derived IL-8 induces monocytic THP1 cells to secrete IL-8 via the mitogen-activated protein kinase pathway. *Tumor Biology*, vol. 36, 9171-9177.

Noursadeghi, M. et al (2008) Quantitative imaging assay for NF- κ B nuclear translocation in primary human macrophages. *Journal of Immunological Methods*, vol. 329(1-2), 194-200.

Oda, M. et al (2002) Loss of urate oxidase activity in Hominoids and its evolutionary implications. *Molecular Biology and Evolution*, vol. 19, n. 5, 640-653.

Oeckinghaus, A & Ghosh, S. (2009) The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, (4):a000034. doi: 10.1101/cshperspect.a000034.

Oh, T.R. et al (2019) Hyperuricemia has increased the risk of progression of chronic kidney disease: propensity score matching analysis from the KNOW-CKD study. *Scientific Reports*, vol. 9, 6681. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43241-3>

O'Shea, J. et al (2015) The JAK-STAT pathway: impact on human disease and therapeutic intervention. *Annual Review of Medicine*, vol. 66, 311-328.

Ozleyen, A. et al (2021) Dataset of the differentiation of THP-1 monocytes to LPS inducible adherent macrophages and capacity for NO/iNOS signaling. *Data in Brief*, vol. 35, 06786.

doi: 10.1016/j.dib.2021.106786.

Pahl, H. L. (1999) Activators and target genes of Rel/NF- κ B transcription factor. *Oncogene*, vol. 18, 6853-6866.

Pajares, M. et al (2018). Transcription factor NFE2L2/NRF2 modulates chaperone-mediated autophagy through the regulation of LAMP2A. *Autophagy*, vol. 14, 1310-1322.

Pakpoor, et al (2015) Clinical associations between gout and multiple sclerosis, Parkinson's disease and motor neuron disease: record-linkage studies. *BMC Neurology*, vol. 15, 16. doi: 10.1186/s12883-015-0273-9

Papežíková, I. et al (2013) Uric acid modulates vascular endothelial function through the down regulation of nitric oxide production. *Free Radical Research*, vol. 47, n. 02, 82-88.

Park, E.K. et al. (2007) Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli. *Inflammation Research*, vol. 56, 45-50.

Pascual, E. et al. (2015) Mechanisms of crystal formation in gout – a structural approach. *Nature Reviews Rheumatology*, vol. 11, 725-730.

Patrício, E. et al (2015) Chemical characterization of urate hydroperoxide, a pro-oxidant intermediate generated by urate oxidation in inflammatory and photoinduced processes. *Chemical Research in Toxicology*, vol. 28, n. 8, 1556-1566.

Perkins, N. (2007) Integrating cell-signalling pathways with NF- κ B and IKK function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 8, 49-62.

Perlstein, T.S. et al. (2006) Uric Acid and the development of hypertension - The Normative Aging Study. *Hypertension*, vol. 48, p. 1031–1036.

Piantadosi, C. et al (2011) Heme oxygenase-1 couples activation of mitochondrial biogenesis to anti-inflammatory cytokine expression. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 286, 16374-16385.

Piraghaj, G. et al (2018) Effect of efferocytosis of apoptotic mesenchymal stem cells (MSCs) on C57BL/6 peritoneal macrophages function. *Life Sciences*, vol. 212, 203-212.

Pradère, J.P. et al (2016) Negative regulation of NF- κ B p65 activity by serine 536 phosphorylation. *Science Signaling*, vol. 9, n.442, p, ra85. DOI: 10.1126/scisignal.aab2820

Proctor, P. (1970) Similar functions of uric acid and ascorbate in man? *Nature*, vol. 228, 868. <https://doi.org/10.1038/228868a0>

Proctor, P. (2008) Uric Acid: neuroprotective or neurotoxic? *Stroke*, vol. 39, n.5. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.107.513242>

Qin, Z. (2012) The use of THP-1 cells as a model for mimicking the function and regulation of monocytes and macrophages in the vasculature. *Atherosclerosis*, vol. 221, 2–11.

Rahimi-Sakak, F. et al (2019) Serum uric acid and risk of cardiovascular mortality: a systematic review and dose-response meta-analysis of cohort studies of over a million participants. *BMC Cardiovascular Disorders*, vol.19, n.218, 1-8.

- Réb , C. et al (2013) STAT3 activation – a key factor in tumor immunoescape. *LandesBioscience*, vol. 2, n. 01, e23010-1-10. doi: 10.4161/jkst.23010.
- Richette, P. & Bardin, T. (2010) Gout. *The Lancet*, vol. 375, n. 9711, 318-328.
- Ridi, R.E. & Tallima, H. (2017) Physiological functions and pathogenic potential of uric acid: a review. *Journal of Advanced Research*, vol. 8, 487-493.
- Rocha, L. et al (2021) Peroxiredoxin AhpC1 protects *Pseudomonas aeruginosa* against the Inflammatory Oxidative burst and confers virulence. *Redox Biology*, vol. 46, 102075.
- Rouillard AD, Gunderson GW, Fernandez NF, Wang Z, Monteiro CD, McDermott MG, Ma'ayan A. The harmonizome: a collection of processed datasets gathered to serve and mine knowledge about genes and proteins. Database (Oxford). 2016 Jul 3; 2016. pii: baw100.
- R szer, T. (2015) Understanding the mysterious M2 macrophage through activation markers and effector mechanisms. *Mediators of Inflammation*, 816460, 1-16.
- Schuringa, J et al (2001) Ser727-dependent transcriptional activation by association of p300 with STAT3 upon IL-6 stimulation. *FEBS Letters*, vol. 495, 71-76.
- Sen, R. & Baltimore, D. (1986) Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein NF-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell*, vol.47, 921-928.
- Shi, Y. et al (2003) Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature*, vol. 425, 516-521.
- Short, J. et al (2016) Protein thiol redox signaling in monocytes and macrophages. *Antioxidants & Redox Signaling*, vol. 25, n. 15, 816-836.
- Shuai, K. & Liu, B. (2003) Regulation of JAK-STAT signaling in the immune system. *Nature Reviews Immunology*, vol. 03, 900-911.
- Sica, A. & Mantovani, A. (2012) Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 122(3): 787–795.
- Silva, R. et al (2018) Identification of urate hydroperoxide in neutrophils: A novel pro-oxidant generated in inflammatory conditions. *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 126, 177-186.
- So, A. & Martinon, F. (2017) Inflammation in gout: mechanisms and therapeutic targets. *Nature Reviews Rheumatology*, vol. 13, 639-647.
- So, A. & Thorens, B. (2010) Uric acid transport and disease. *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 120, 1791-1799.
- Sobotta, M. et al (2015) Peroxiredoxin-2 and STAT3 form a redox relay for H₂O₂ signaling. *Nature Chemical Biology*, vol. 11, 64-71.
- Soltani, Z. et al (2013) Potential role of uric Acid in metabolic syndrome, hypertension, kidney Injury, and cardiovascular Diseases: Is It Time for Reappraisal? *Current Hypertension Reports*, vol. 15, 175–181. <https://doi.org/10.1007/s11906-013-0344-5>

Spiga, R. et al (2017) Uric Acid is associated with inflammatory biomarkers and induces inflammation via activating the NF- κ B signaling pathway in HepG2 cells. *Atherosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 37, 1241-1249.

Stocker, R. & Perrella, M. (2006) Heme oxygenase-1 - a novel drug target for atherosclerotic diseases? *Circulation*, vol. 114, n.20, 2178-2189.

Storhaug, H.M. et al (2013) Uric acid is a risk factor for ischemic stroke and all-cause mortality in the general population: a gender specific analysis from The Tromsø Study. *BMC Cardiovascular Disorders*, vol. 13, n.115. <https://doi.org/10.1186/1471-2261-13-115>

Sutin, A.R. et al (2014) Impulsivity is associated with uric acid: evidence from humans and mice. *Biological Psychiatry*, vol. 75, n.01, 31–37.

Suzuki, T. & Yamamoto, M. (2015) Molecular basis of the Keap1-Nrf2 system. *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 88, 93-100.

Sykoti, G. & Bohmann, D. (2010) Stress-activated Cap'n'collar transcription factors in aging and human disease. *Science Signaling*, vol. 03, n. 112 re3, 1-22.

Tan, Hor-Yue et al. (2016) The reactive oxygen species in macrophage polarization: reflecting its dual role in progression and treatment of human diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2016, article ID 2795090,1-16.

Tanaka, Y. et al (2017) Close linkage between serum uric acid and cardiac dysfunction in patients with ischemic heart disease according to covariance structure analysis. *Scientific Reports*, vol. 7, n. 2519, 1-9. DOI:10.1038/s41598-017-02707-y

Taniguchi, & Karin, (2018) NF- κ B, inflammation, immunity and cancer: coming of age. *Nature Reviews Immunology*, vol. 18, 309–324.

Tebay, L. et al (2015) Mechanisms of activation of the transcription factor Nrf2 by redox stressors, nutrient cues, and energy status and the pathway through which attenuates degenerative disease. *Free Radical Biology & Medicine*, vol. 88, 108-146.

Tonelli, et al (2018) Transcriptional regulation of Nrf2. *Antioxidants & Redox Signaling*, vol. 29, n.17, 1727-1745.

Trask Jr, O. et al. (2012) Nuclear Factor Kappa B (NF- κ B) translocation assay development and validation for High Content Screening [Updated 2014 Oct 1]. in: *Markossian S, Sittampalam GS, Grossman A, et al., editors. Assay Guidance Manual [Internet]; Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Science. 551-589 p.*

Turner, R. et al (2018) Conjugation of urate-derived electrophiles to proteins during normal metabolism and inflammation. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 293, n. 51, 19886-19898.

Valero, Y. et al (2015) Fish peroxiredoxins and their role in immunity. *Biology (Basel)*, vol. 4, n. 04, 860–880.

Venet, F. & Monneret, G. (2018) Advances in the understanding and treatment of sepsis-induced immunosuppression. *Nature Reviews Nephrology*, vol. 14, 121-137.

- Wakabayashi, N. et al (2010) When Nrf2 talks, who's listening? *Antioxidants & Redox Signaling*, vol. 13, n. 11, 1649-1663.
- Wang, H. et al (2004) Extracellular role of HMGB1 in inflammation and sepsis. *Journal of Internal Medicine*, vol. 255, n. 3, p. 320–331.
- Watanabe, S. et al (2002) Uric Acid, hominoid evolution, and the pathogenesis of salt-sensitivity. *Hypertension*, vol. 40, 355-360.
- Waterhouse, R. et al (2007) Evolutionary dynamics of immune-related genes and pathways in disease-vector mosquitoes. *Science*, vol. 316, n. 5832, 1738–1743.
- Wen, Z. & Darnell Jr, J. (1997) Mapping of STAT3 serine phosphorylation to a single residue (727) and evidence that serine phosphorylation has no influence on DNA binding of Stat1 and Stat3. *Nucleic Acids Research*, vol. 25, 2062-2067.
- White, J. et al (2016) Plasma urate concentration and risk of coronary heart disease: a Mendelian randomisation analysis. *The Lancet*, vol. 4, 327-336.
- Winterbourn, C. C. Reconciling the chemistry and biology reactive oxygen species. *Nature Chemical Biology*. vol. 4, n° 05, p. 278-286, 2008.
- Wu, X. et al (1989) Urate oxidase: primary structure and evolutionary implications. *Proceedings of National Academia of Sciencies of United States of America*, vol. 86, 9412-9416.
- Wu, X. et al (1992) Two independent mutational events in the loss of urate oxidase during hominoid evolution. *Journal of Molecular Evolution*, vol. 34, 78-84.
- Xiong, Q. (2019) Effects of uric acid on diabetes mellitus and its chronic complications. *International Journal of Endocrinology*, vol. 2019, 1-8. <https://doi.org/10.1155/2019/9691345>
- Xu, W. & Huang, A. (2020) Nrf2 regulates interferon receptor expression and alters macrophage polarization in lupus (letter to the editor). *Arthritis & Rheumatology*, vol. doi:10.1002/art.41482
- Yu, H. et al (2014) Revisiting STAT3 signalling in cancer: new and unexpected biological functions. *Nature Reviews Cancer*, vol. 04, 736–746.
- Yueshuang, K. et al. (2019) The role of PARPs in inflammation – and metabolic – related diseases: molecular mechanisms and beyond. *Cells*, vol. 8, n. 1047, 1-22.
- Yunna, C. et al. (2020) Macrophage M1/M2 polarization. *European Journal of Pharmacology*, vol. 877, 173090.

Apêndice – Parte I

Figuras Suplementares

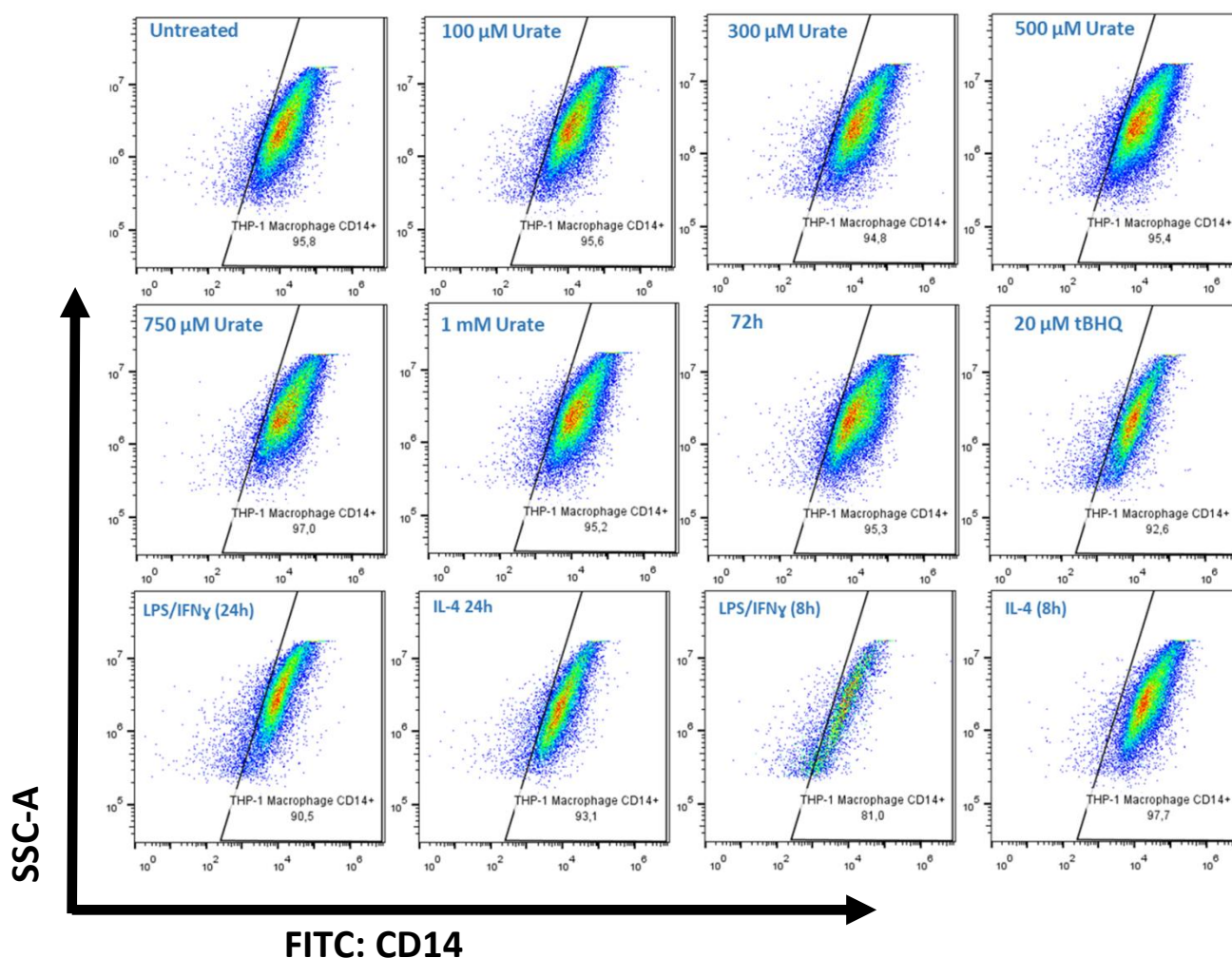
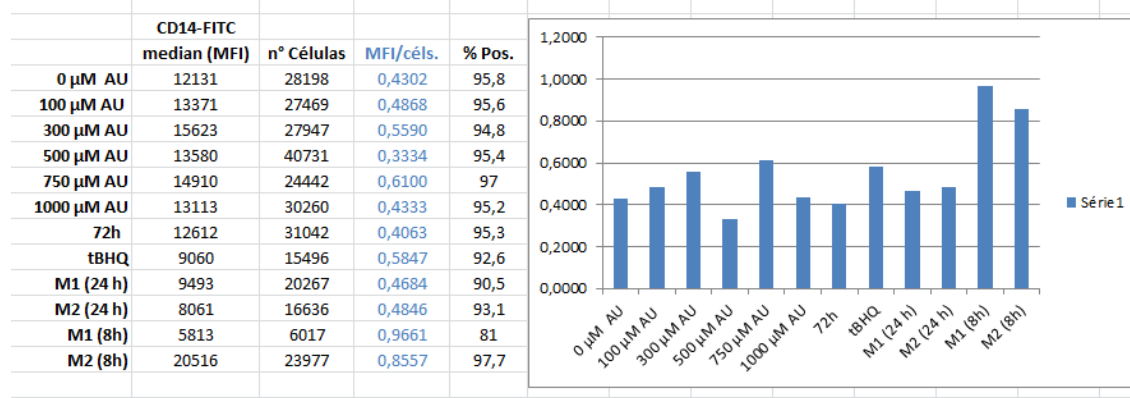


Figura A.1: Caracterização fenotípica de macrófagos tratados com ácido úrico solúvel após 24 h. Macrófagos foram avaliados por citometria de fluxo quanto à porcentagem de marcação de CD14, n=1.

Tabela I Medida da intensidade de fluorescência para CD14. Gráfico à direita representa a mediana normalizada pelo número de eventos da intensidade de fluorescência, n=1.



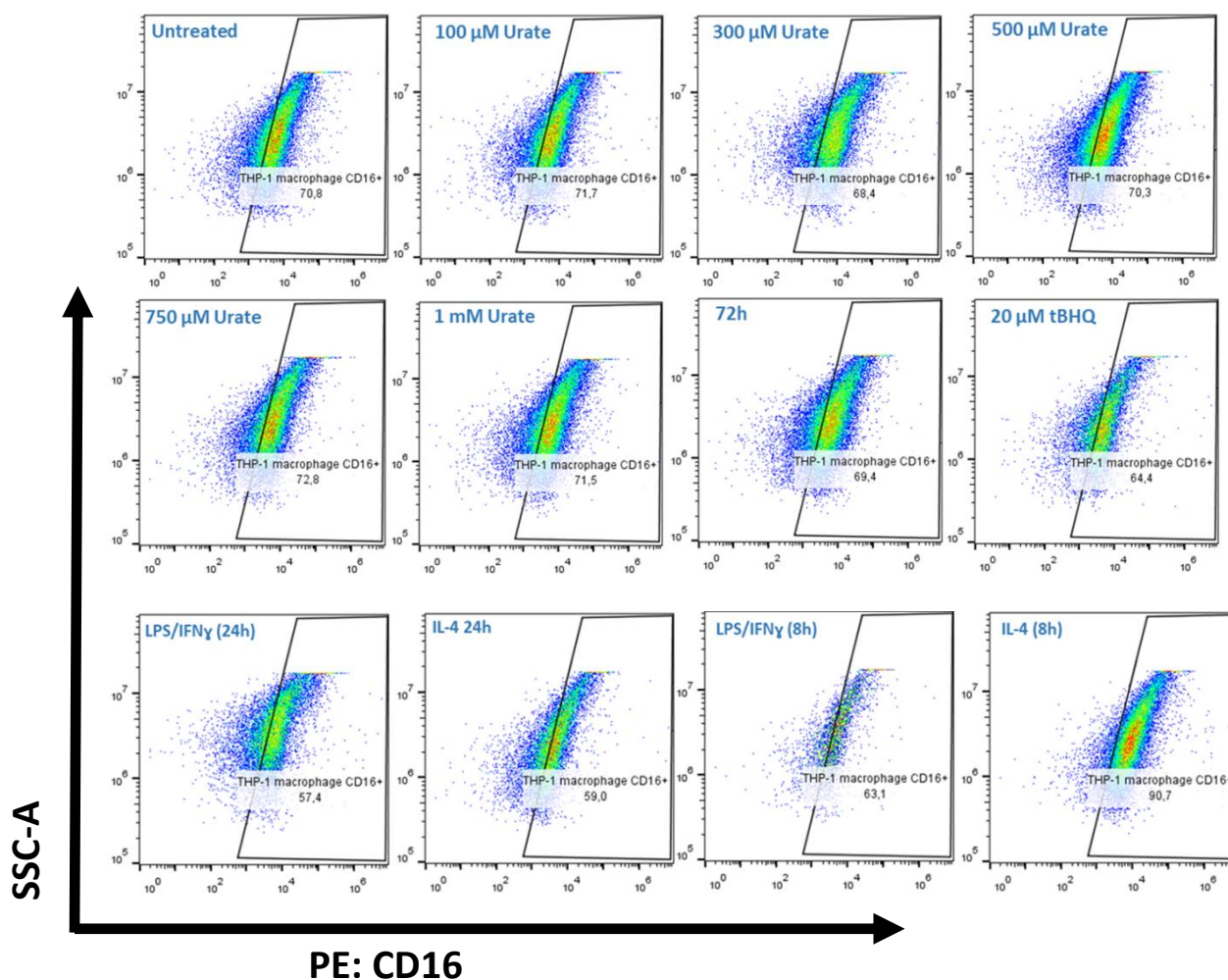


Figura A.2: Caracterização fenotípica de macrófagos tratados com ácido úrico solúvel após 24 h. Macrófagos foram avaliados por citometria de fluxo quanto a porcentagem de marcação de CD16, n=1.

Tabela II: Medida da intensidade de fluorescência para CD16. Gráfico à direita representa a mediana normalizada pelo número de eventos da intensidade de fluorescência, n=1.

	CD16-PE			
	median (MFI)	n° Células	MFI/céls.	% Pos.
0 μ M AU	4860	26688	0,1821	70,8
100 μ M AU	5132	25836	0,1986	71,7
300 μ M AU	6068	25844	0,2348	68,4
500 μ M AU	5014	38904	0,1289	70,3
750 μ M AU	5441	23757	0,2290	72,8
1000 μ M AU	5132	28740	0,1786	71,5
72h	5132	29257	0,1754	69,4
tBHQ	4001	13757	0,2908	64,4
M1 (24 h)	4410	18223	0,2420	57,4
M2 (24 h)	3371	15538	0,2170	59
M1 (8h)	4001	4316	0,9270	63,1
M2 (8h)	8579	22619	0,3793	90,7

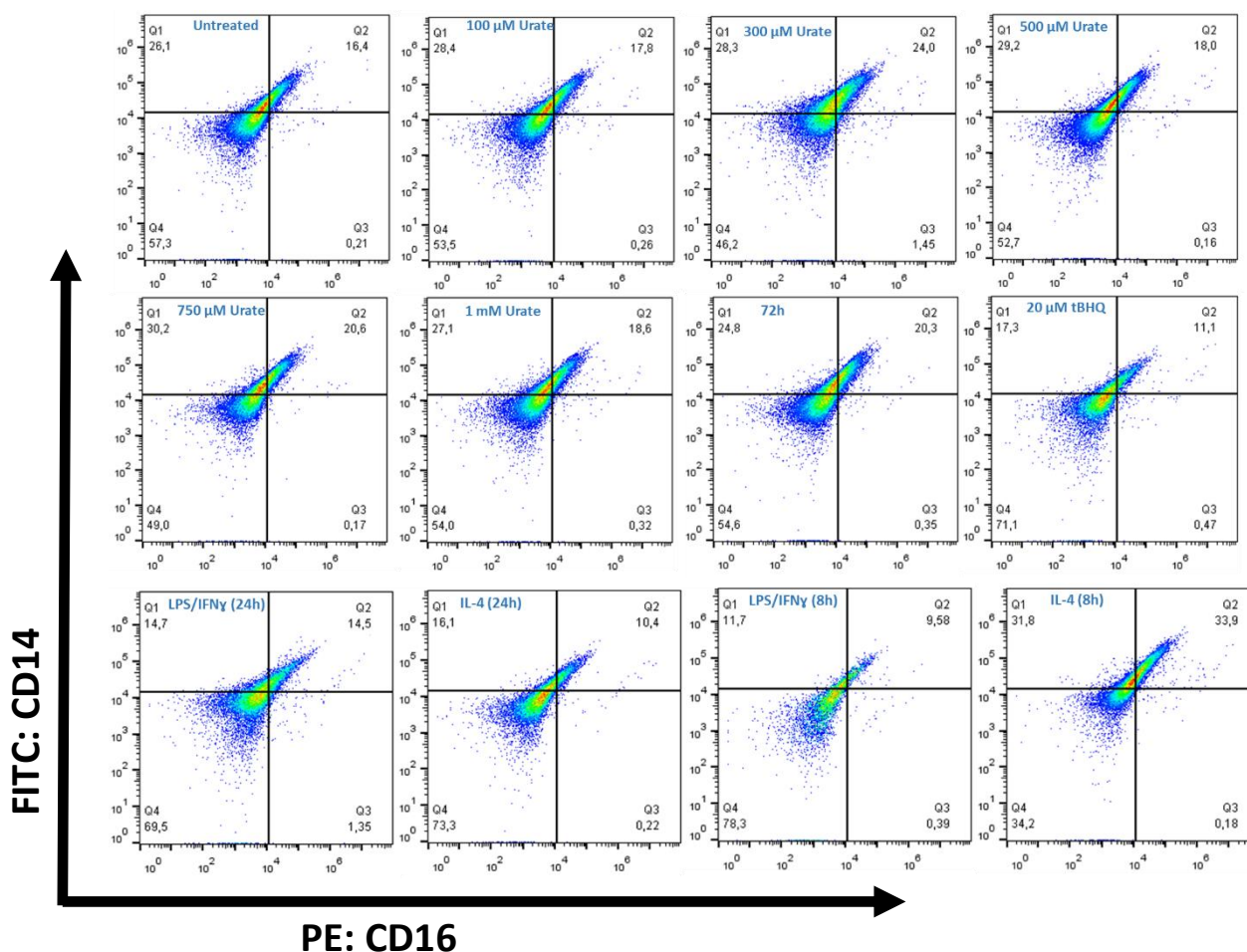
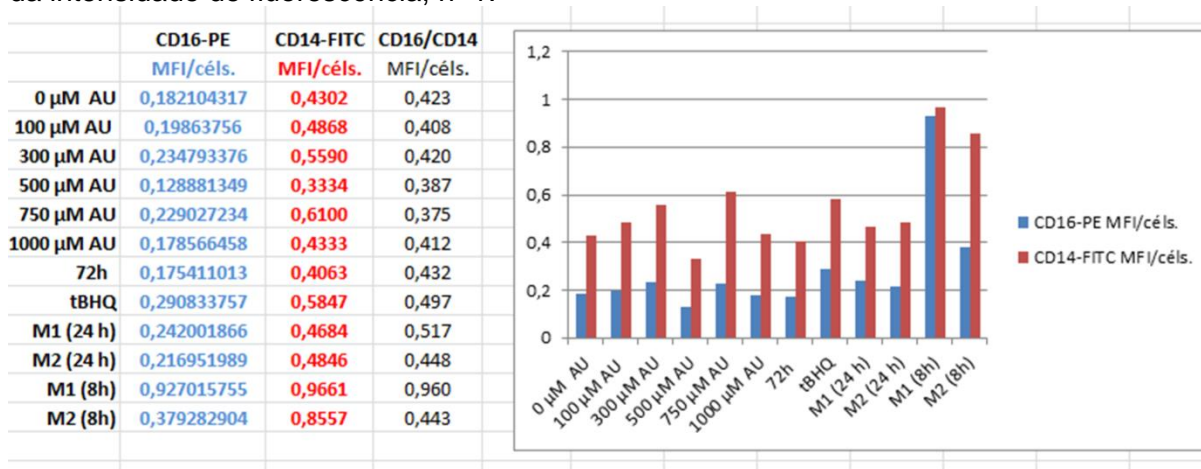


Figura A.3: Caracterização fenotípica de macrófagos tratados com ácido úrico solúvel após 24 h. Macrófagos foram avaliados por citometria de fluxo quanto à porcentagem de marcação de CD14 e CD16, n=1.

Tabela III: Medida da intensidade de fluorescência para CD14 e CD16, e relação CD16/CD14. Gráfico à direita representa a mediana normalizada pelo número de eventos da intensidade de fluorescência, n=1.



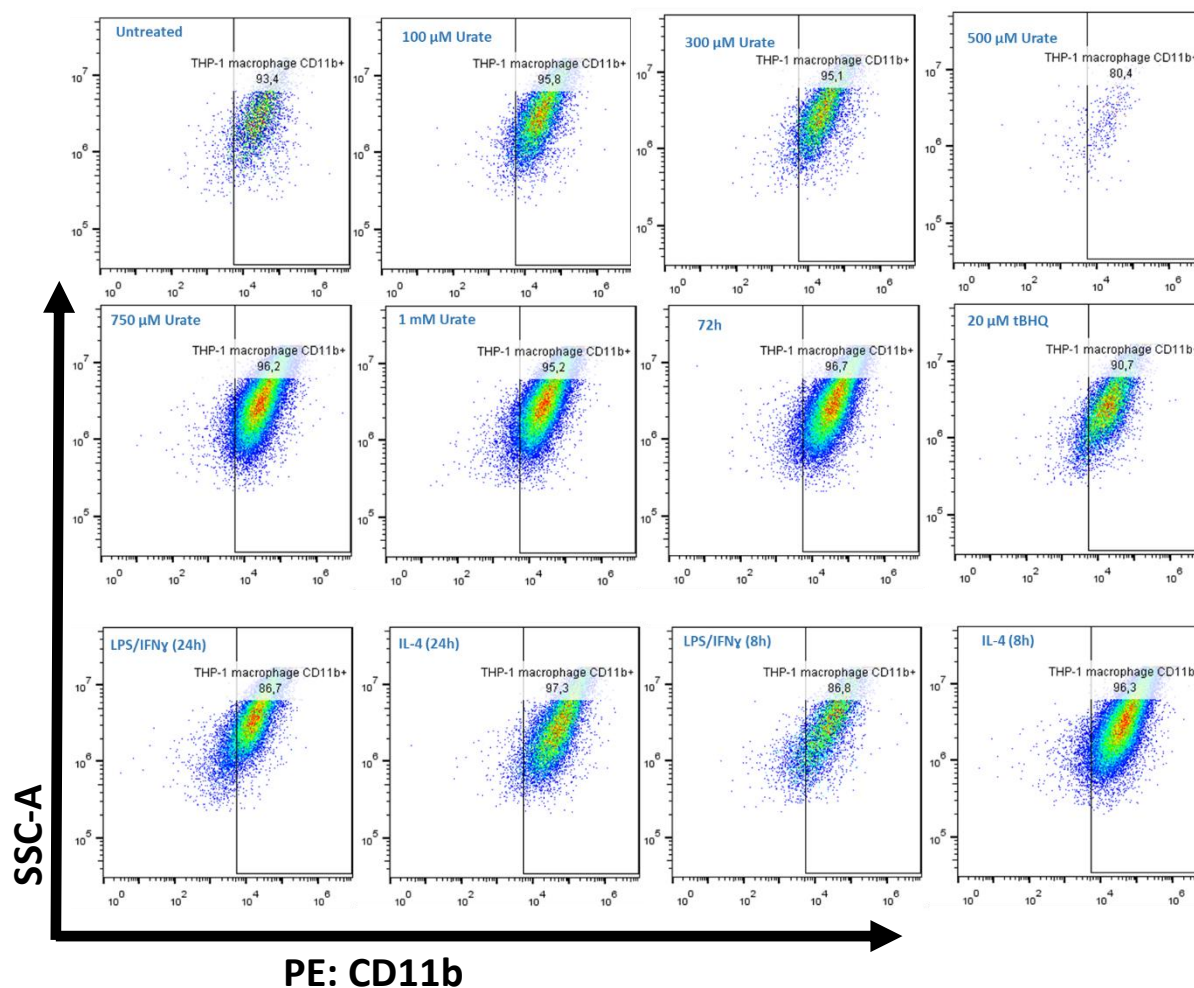
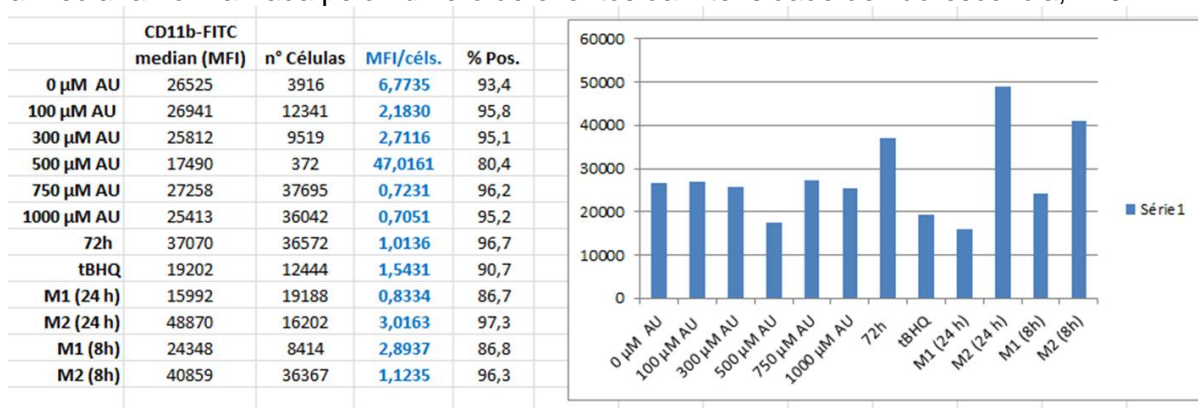


Figura A.4: Caracterização fenotípica de macrófagos tratados com ácido úrico solúvel após 24 h. Macrófagos foram avaliados por citometria de fluxo quanto a porcentagem de marcação de CD11b, n=3.

Tabela IV: Medida da intensidade de fluorescência para CD11b. Gráfico à direita representa a mediana normalizada pelo número de eventos da intensidade de fluorescência, n=3.



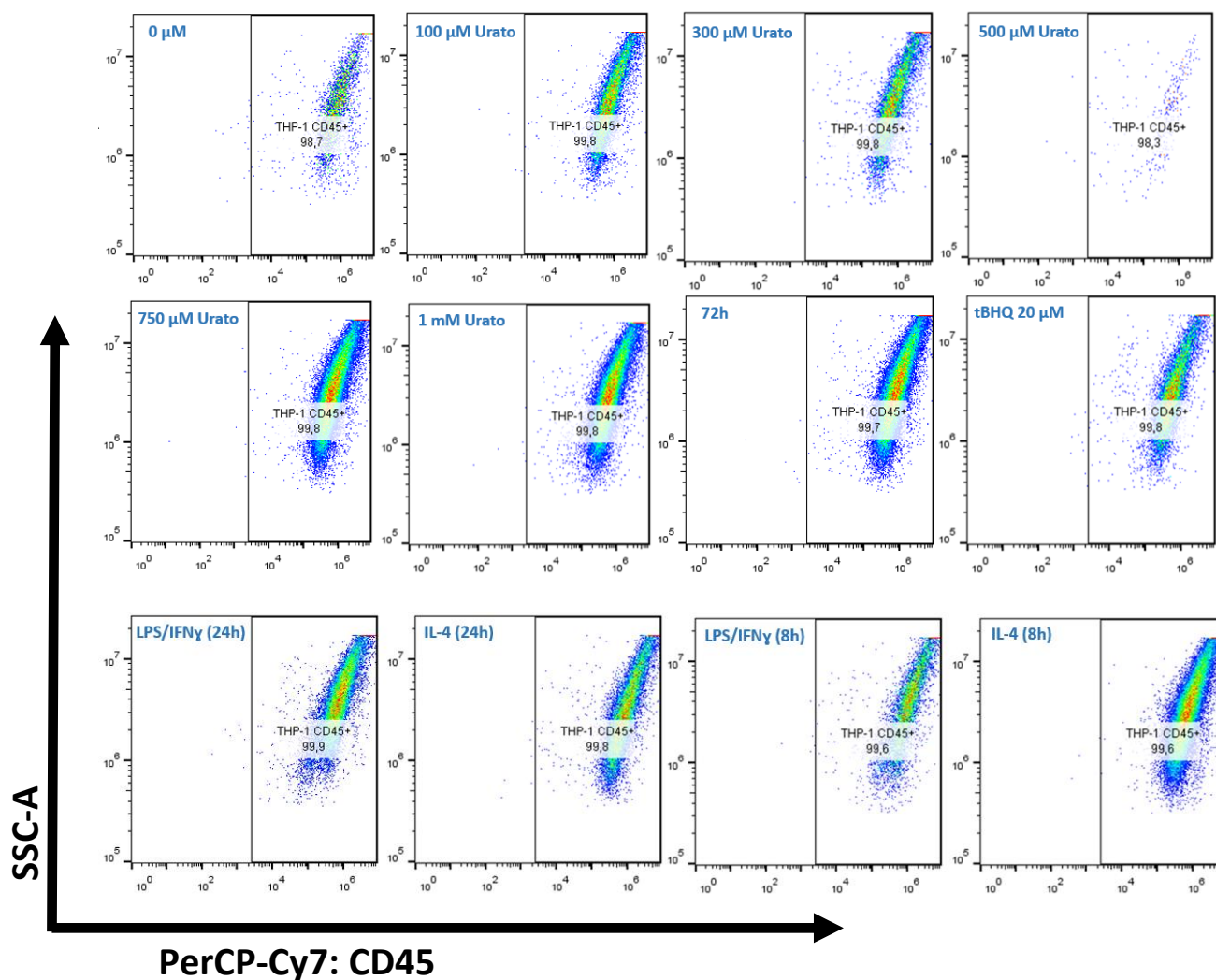


Figura A.5: Caracterização fenotípica de macrófagos tratados com ácido úrico solúvel após 24 h. Macrófagos foram avaliados por citometria de fluxo quanto a porcentagem de marcação de CD45, n=2.

Tabela V: Medida da intensidade de fluorescência para CD45. Gráfico à direita representa a mediana normalizada pelo número de eventos da intensidade de fluorescência, n=2.

	CD45-PerCP-Cy7					
	median (MFI)	céls. Pos.	MFI/céls.	% Pos.	Eventos gravados	
0 μM AU	5,79E+05	8098	7,15E+01	98,7	8205	
100 μM AU	6,25E+05	14217	4,40E+01	99,8	14245	
300 μM AU	5,95E+05	10983	5,42E+01	99,9	10994	
500 μM AU	3,95E+04	668	5,90E+01	98,3	680	
750 μM AU	5,88E+05	42210	1,39E+01	99,8	42295	
1000 μM AU	5,48E+05	39829	1,38E+01	99,8	39909	
72h	6,61E+05	42181	1,57E+01	99,7	42308	
tBHQ	4,21E+05	15299	2,75E+01	99,8	15330	
M1 (24 h)	6,33E+05	24097	2,63E+01	99,9	24121	
M2 (24 h)	6,84E+05	18276	3,74E+01	99,8	18313	
M1 (8h)	5,74E+05	13358	4,30E+01	99,6	13412	
M2 (8h)	5,85E+05	41805	1,40E+01	99,6	41973	

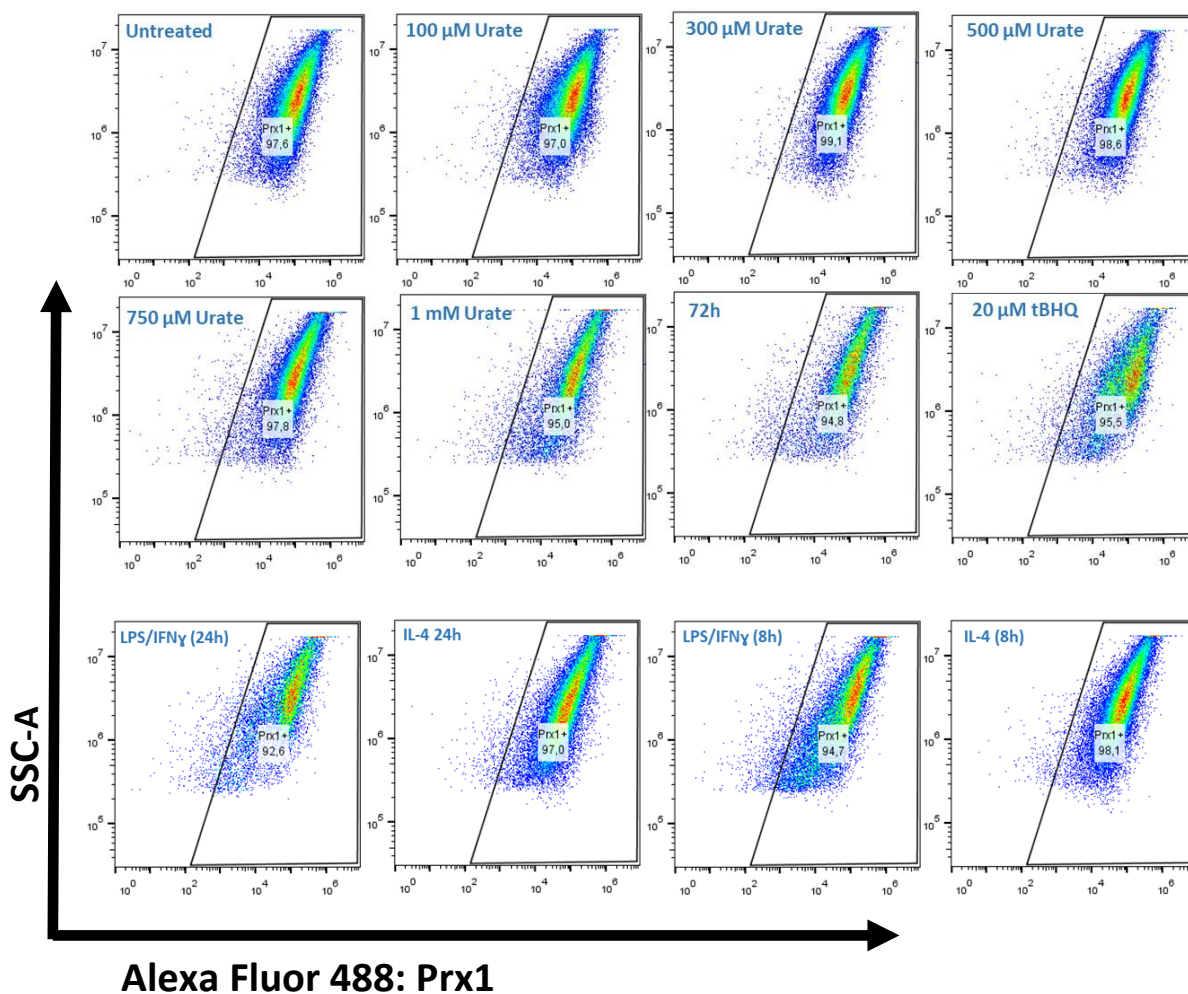


Figura A.6: Caracterização fenotípica de macrófagos tratados com ácido úrico solúvel após 24 h. Macrófagos foram avaliados por citometria de fluxo quanto a porcentagem de marcação de Prx1.

Tabela VI: Medida da intensidade de fluorescência para Prx1. Gráfico à direita representa a mediana normalizada pelo número de eventos da intensidade de fluorescência, $n=1$.

	Prx1			
	median (MFI)	n° Células	MFI/céls.	% Pos.
0 μ M AU	94343	42545	2,2175	97,7
100 μ M AU	86601	40426	2,1422	97
300 μ M AU	69912	47338	1,4769	99,1
500 μ M AU	82328	47120	1,7472	98,6
750 μ M AU	89340	39168	2,2809	97,8
1000 μ M AU	74986	20591	3,6417	95
72h	80742	16142	5,0020	94,8
tBHQ	85263	16323	5,2235	95,5
M1 (24 h)	84932	14150	6,0023	92,6
M2 (24 h)	67506	39692	1,7007	97
M1 (8h)	71009	25138	2,8248	94,7
M2 (8h)	69101	44951	1,5373	98,1

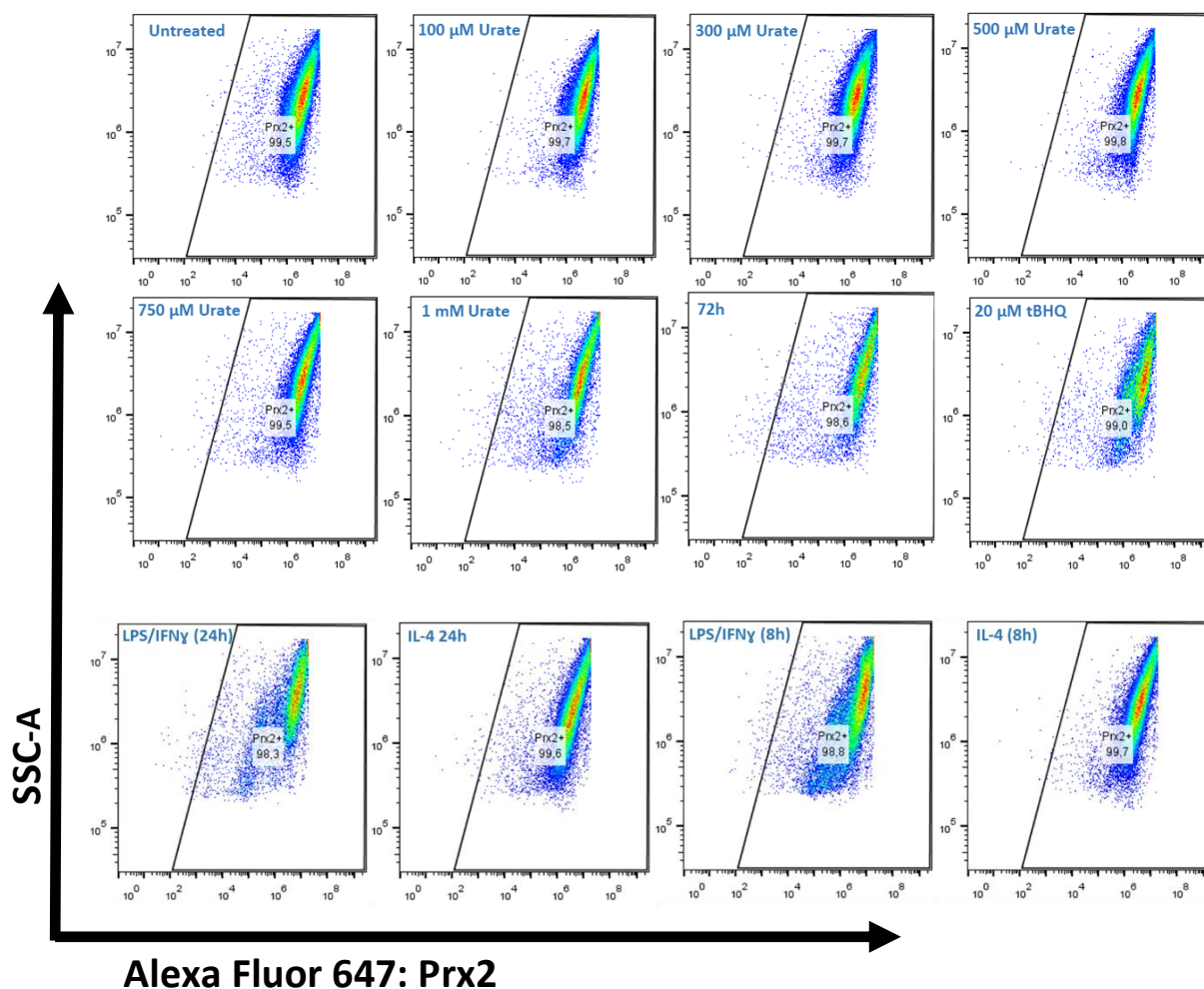
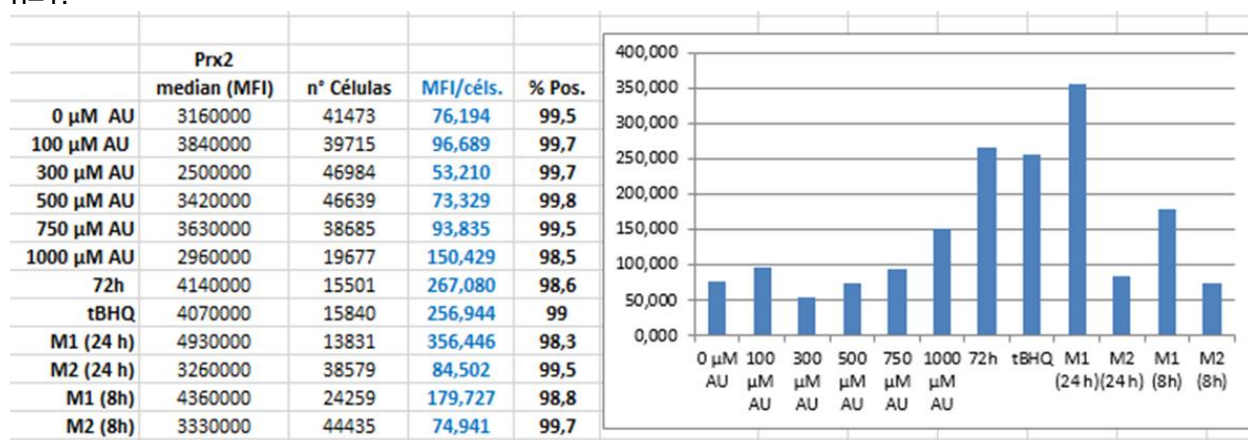


Figura A.7: Caracterização fenotípica de macrófagos tratados com ácido úrico solúvel após 24 h. Macrófagos foram avaliados por citometria de fluxo quanto a porcentagem de marcação de Prx2.

Tabela VII: Medida da intensidade de fluorescência para Prx2. Gráfico à direita esquerda representa a mediana normalizada pelo número de eventos da intensidade de fluorescência, $n=1$.



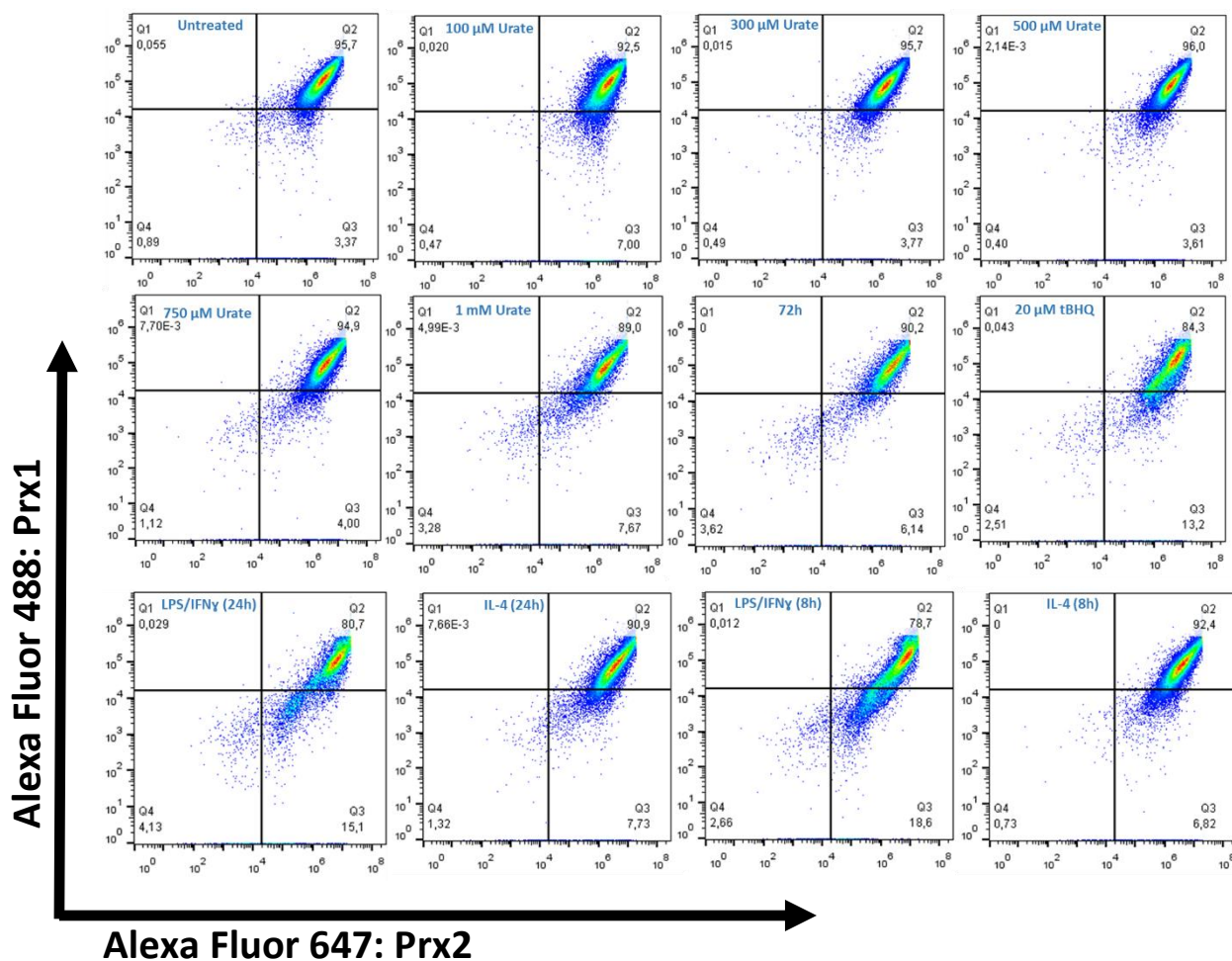
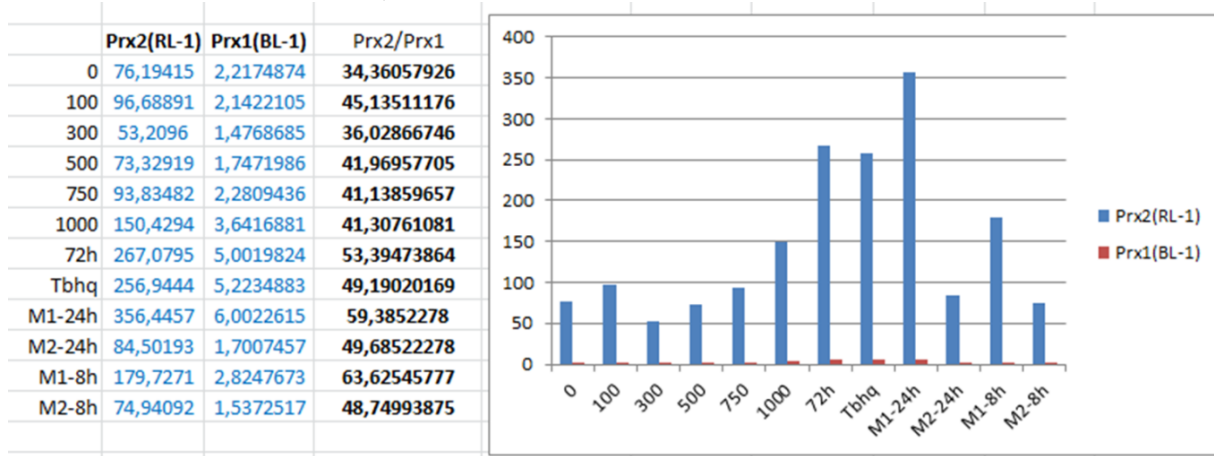


Figura A.8: Caracterização fenotípica de macrófagos tratados com ácido úrico solúvel após 24 h. Macrófagos foram avaliados por citometria de fluxo quanto à relação de expressão da Prx1 e Prx2, n=1.

Tabela VIII: Medida da intensidade de fluorescência para Prx2 e Prx1, e relação Prx2/Prx1. Gráfico à esquerda representa as medianas normalizadas pelo número de eventos da intensidade de fluorescência, n=1.



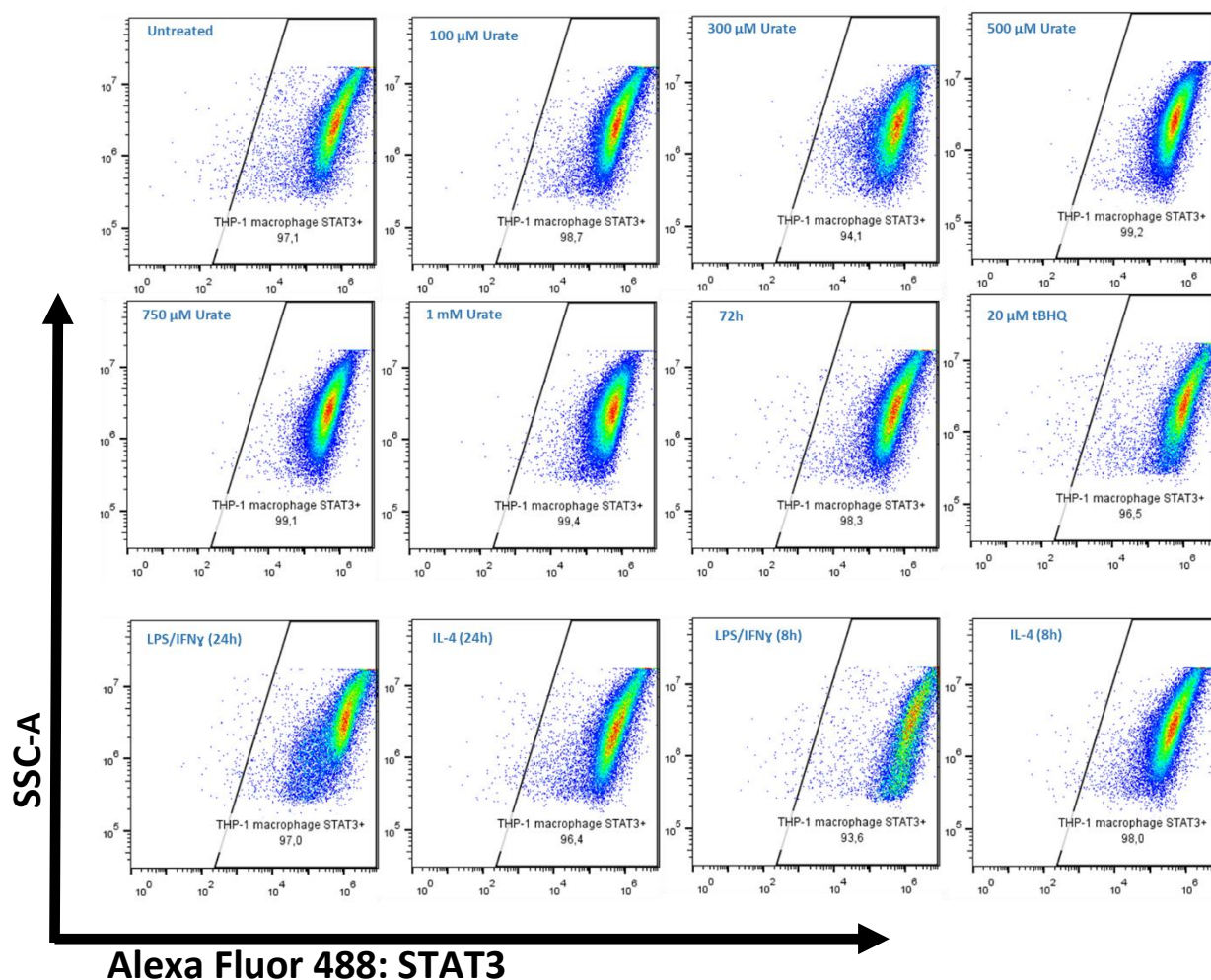
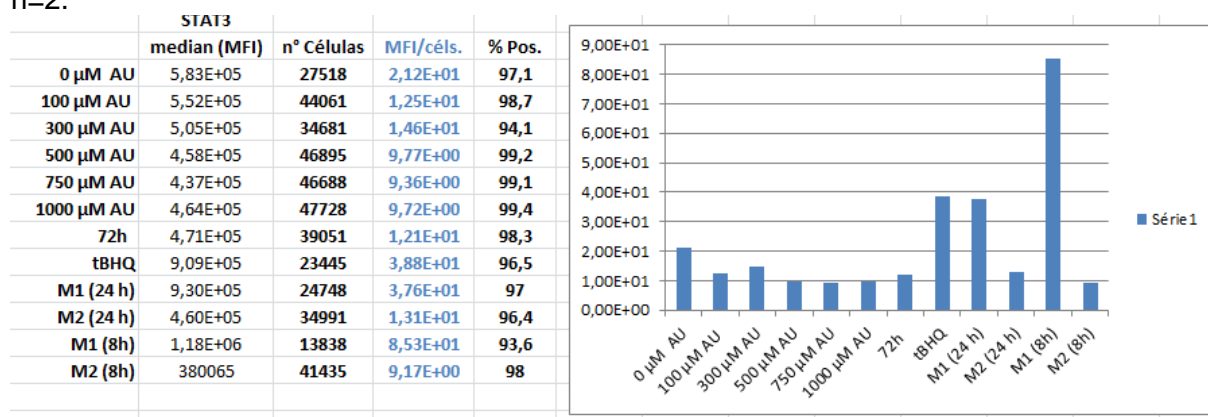


Figura A.9: Caracterização fenotípica de macrófagos tratados com ácido úrico solúvel após 24 h. Macrófagos foram avaliados por citometria de fluxo quanto a porcentagem de marcação de STAT3, n=2.

Tabela IX: Medida da intensidade de fluorescência para a STAT3. Gráfico à direita representa a mediana normalizada pelo número de eventos da intensidade de fluorescência, n=2.



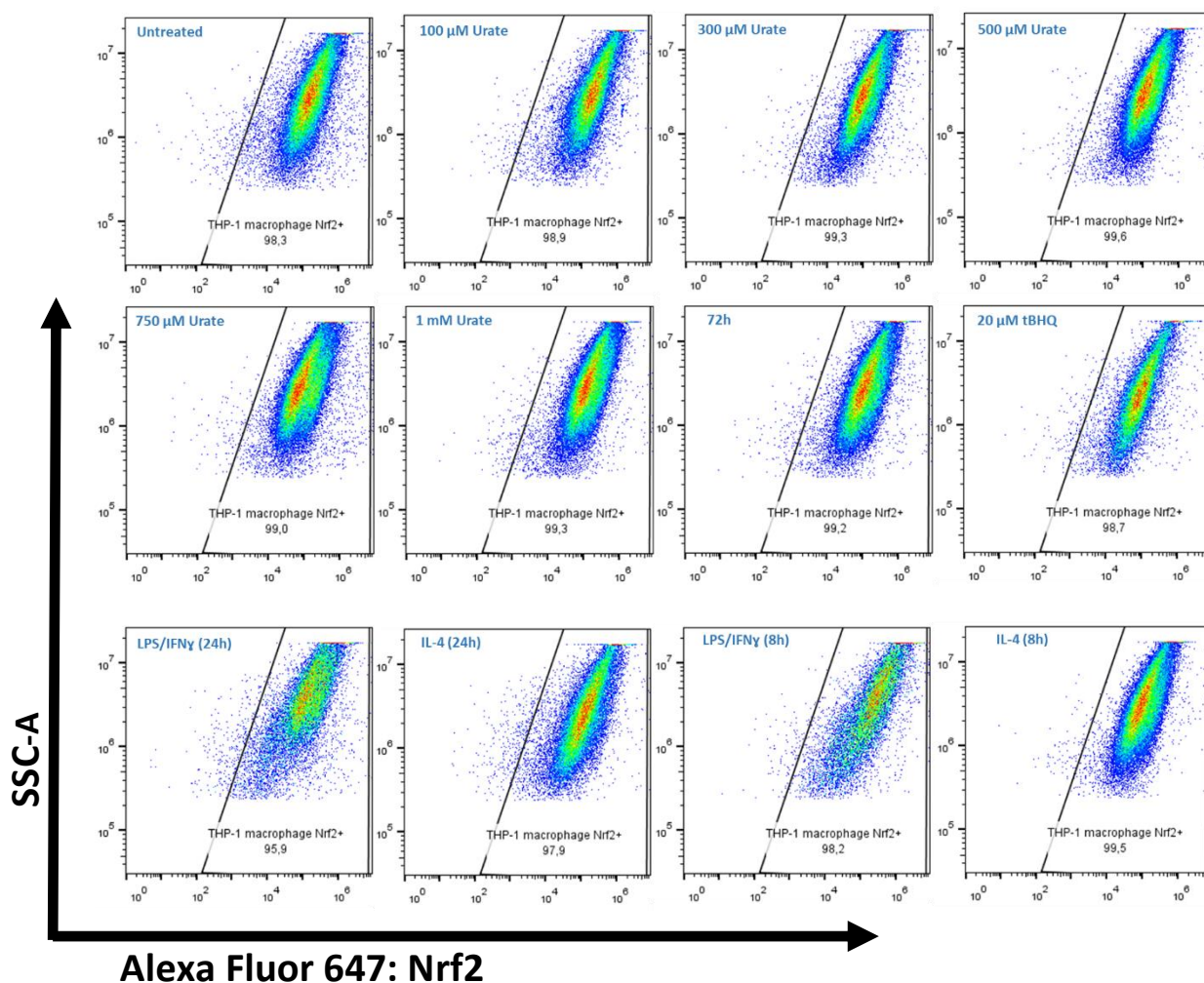
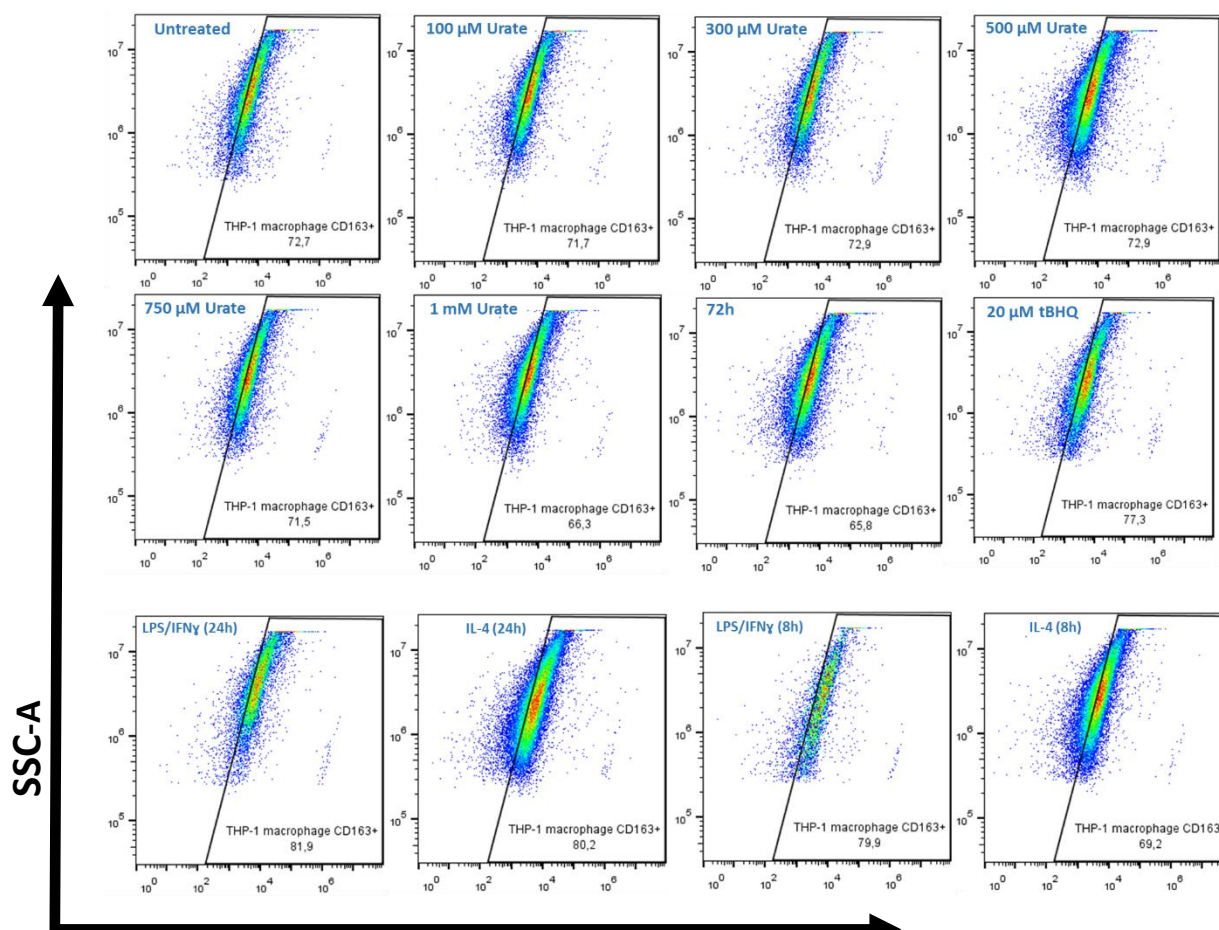


Figura A.10: Caracterização fenotípica de macrófagos tratados com ácido úrico solúvel após 24 h. Macrófagos foram avaliados por citometria de fluxo quanto a porcentagem de marcação da expressão do Nrf2, n=2.

Tabela X: Medida da intensidade de fluorescência para o Nrf2. Gráfico à direita representa a mediana normalizada pelo número de eventos da intensidade de fluorescência, n=2.

Nrf2				
Nrf2	median (MFI)	n° Células	MFI/céls.	% Pos.
0 μ M AU	152808	39211	3,897	98,3
100 μ M AU	186433	30966	6,021	98,9
300 μ M AU	101981	33725	3,024	99,3
500 μ M AU	125345	44429	2,821	99,6
750 μ M AU	99627	43141	2,309	99
1000 μ M AU	131851	45714	2,884	99,3
72h	115059	42473	2,709	99,2
tBHQ	81690	20584	3,969	98,7
M1 (24 h)	126325	17224	7,334	95,9
M2 (24 h)	115958	38807	2,988	97,9
M1 (8h)	199186	13128	15,173	98,2
M2 (8h)	101981	42967	2,373	99,5

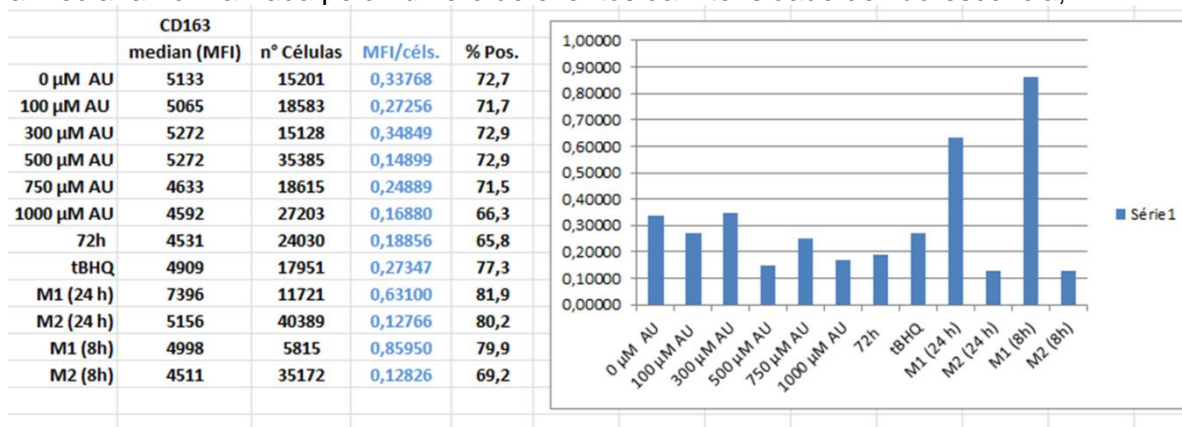
MFI/céls.	
0 μ M AU	3,897
100 μ M AU	6,021
300 μ M AU	3,024
500 μ M AU	2,821
750 μ M AU	2,309
1000 μ M AU	2,884
72h	2,709
tBHQ	3,969
M1 (24 h)	7,334
M2 (24 h)	2,988
M1 (8h)	15,173
M2 (8h)	2,373

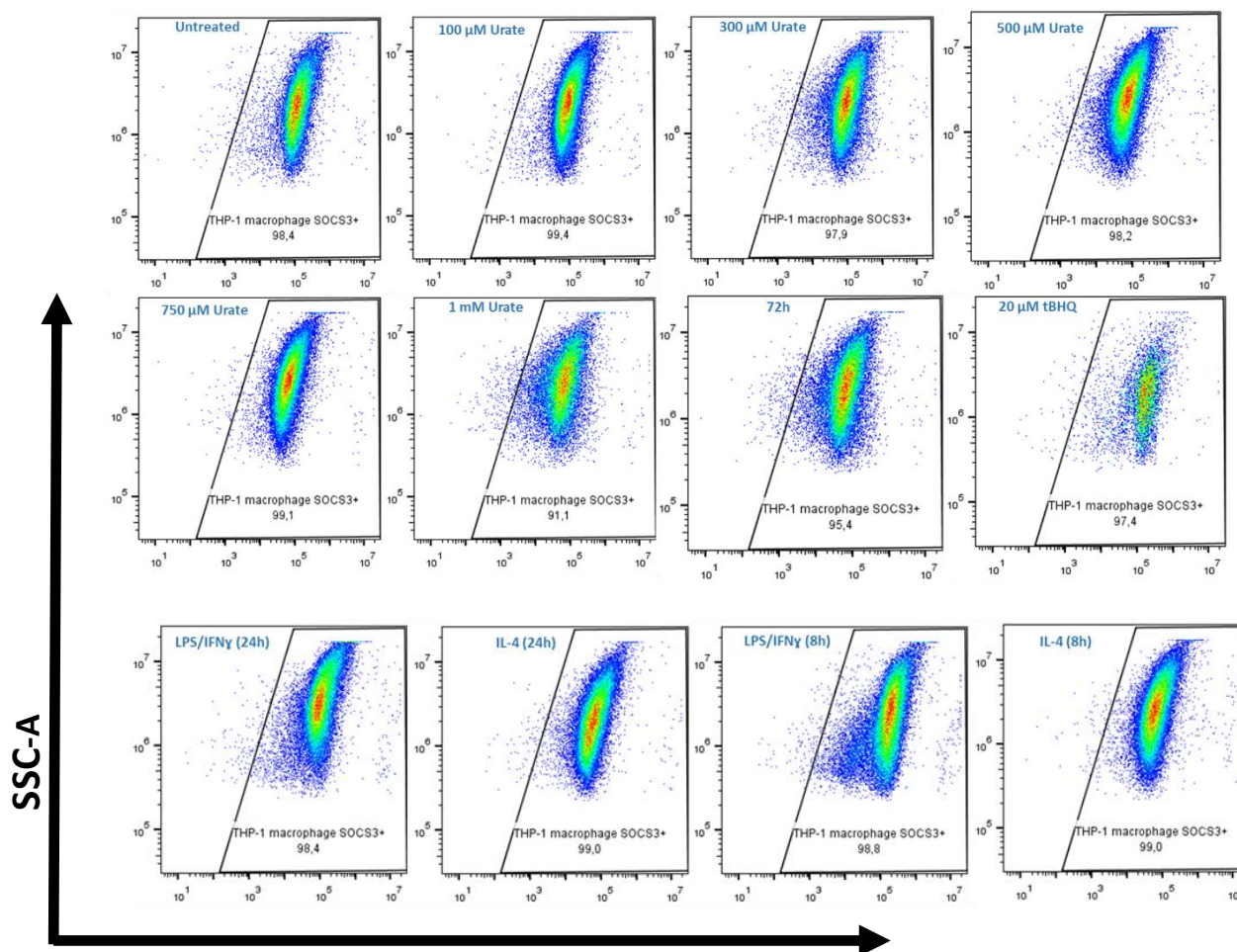


Alexa Fluor 488: CD163

Figura A.11: Caracterização fenotípica de macrófagos tratados com ácido úrico solúvel após 24 h. Macrófagos foram avaliados por citometria de fluxo quanto a porcentagem de marcação de CD163, n=2.

Tabela XI: Medida da intensidade de fluorescência para CD163. Gráfico à direita representa a mediana normalizada pelo número de eventos da intensidade de fluorescência, n=2.

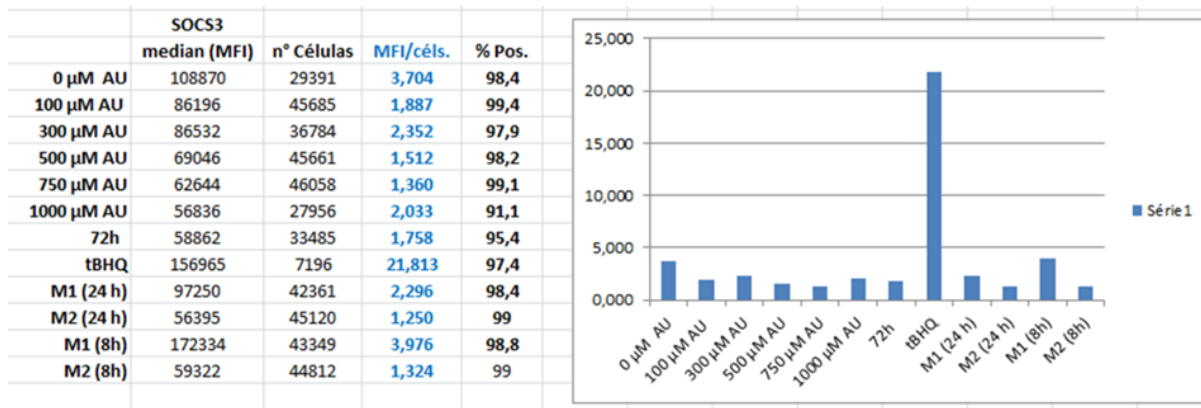




Alexa Fluor 488: SOCS3

Figura A.12: Caracterização fenotípica de macrófagos tratados com ácido úrico solúvel após 24 h. Macrófagos foram avaliados por citometria de fluxo quanto a porcentagem de marcação de SOCS3, n=2.

Tabela XII: Medida da intensidade de fluorescência para SOCS3. Gráfico à direita representa a mediana normalizada pelo número de eventos da intensidade de fluorescência, n=2.



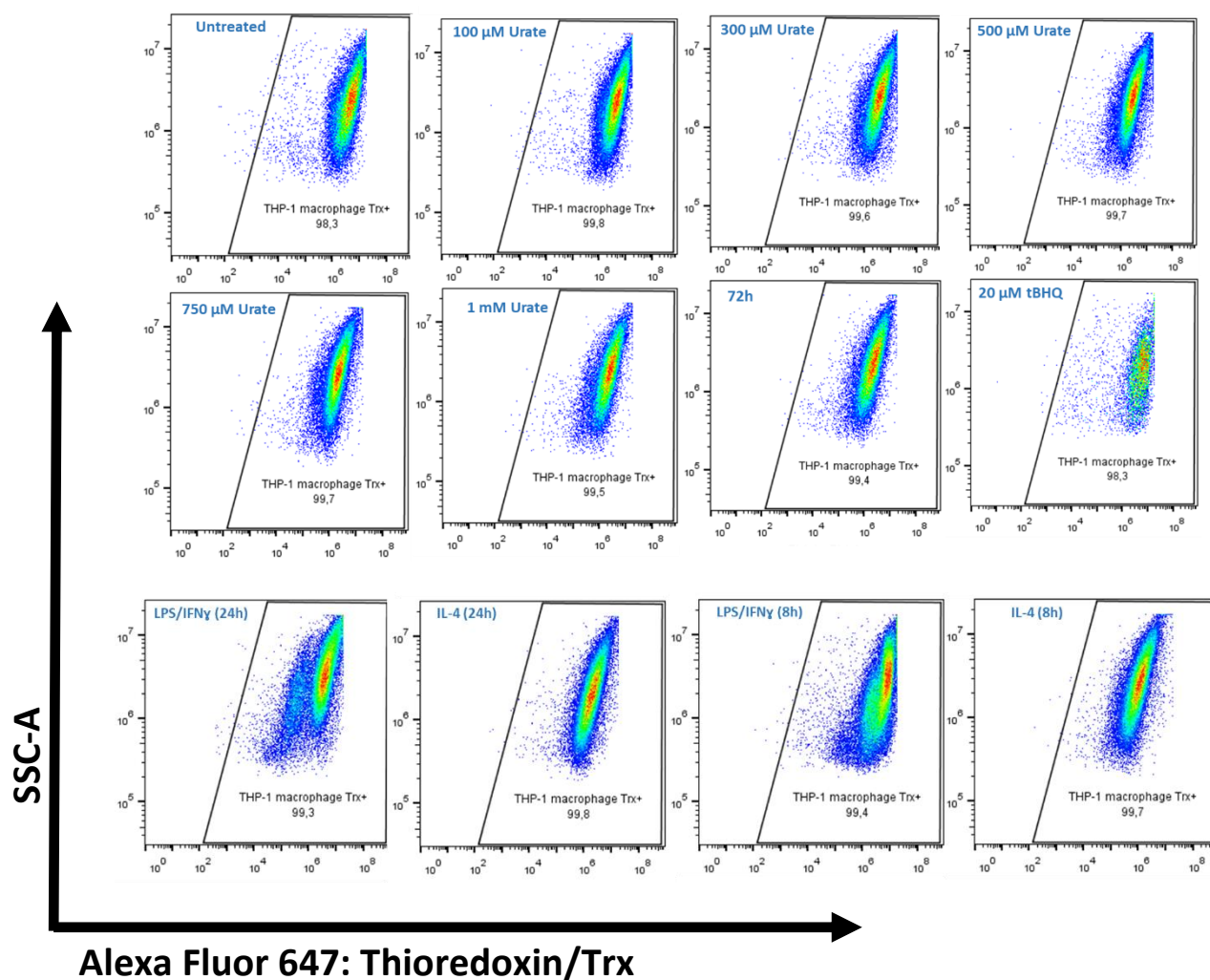


Figura A.13: Caracterização fenotípica de macrófagos tratados com ácido úrico solúvel após 24 h. Macrófagos foram avaliados por citometria de fluxo quanto à porcentagem de marcação de Trx, n=1.

Tabela XIII: Medida da intensidade de fluorescência para Trx. Gráfico à direita representa a mediana normalizada pelo número de eventos da intensidade de fluorescência, n=1.

	Trx			
	median (MFI)	n° Células	MFI/céls.	% Pos.
0 μ M AU	3,89E+06	29850	1,30E+02	98,3
100 μ M AU	3,83E+06	46057	8,32E+01	99,8
300 μ M AU	3,28E+06	37541	8,74E+01	99,6
500 μ M AU	2,57E+06	46079	5,58E+01	99,7
750 μ M AU	1,90E+06	46397	4,10E+01	99,7
1000 μ M AU	2,09E+06	29181	7,16E+01	99,5
72h	1,90E+06	34513	5,51E+01	99,4
tBHQ	4,90E+06	7463	6,57E+02	98,3
M1 (24 h)	3,32E+06	42835	7,75E+01	99,3
M2 (24 h)	1,71E+06	45748	3,74E+01	99,8
M1 (8h)	5,48E+06	44833	1,22E+02	99,4
M2 (8h)	9,51E+06	45254	2,10E+02	99,7

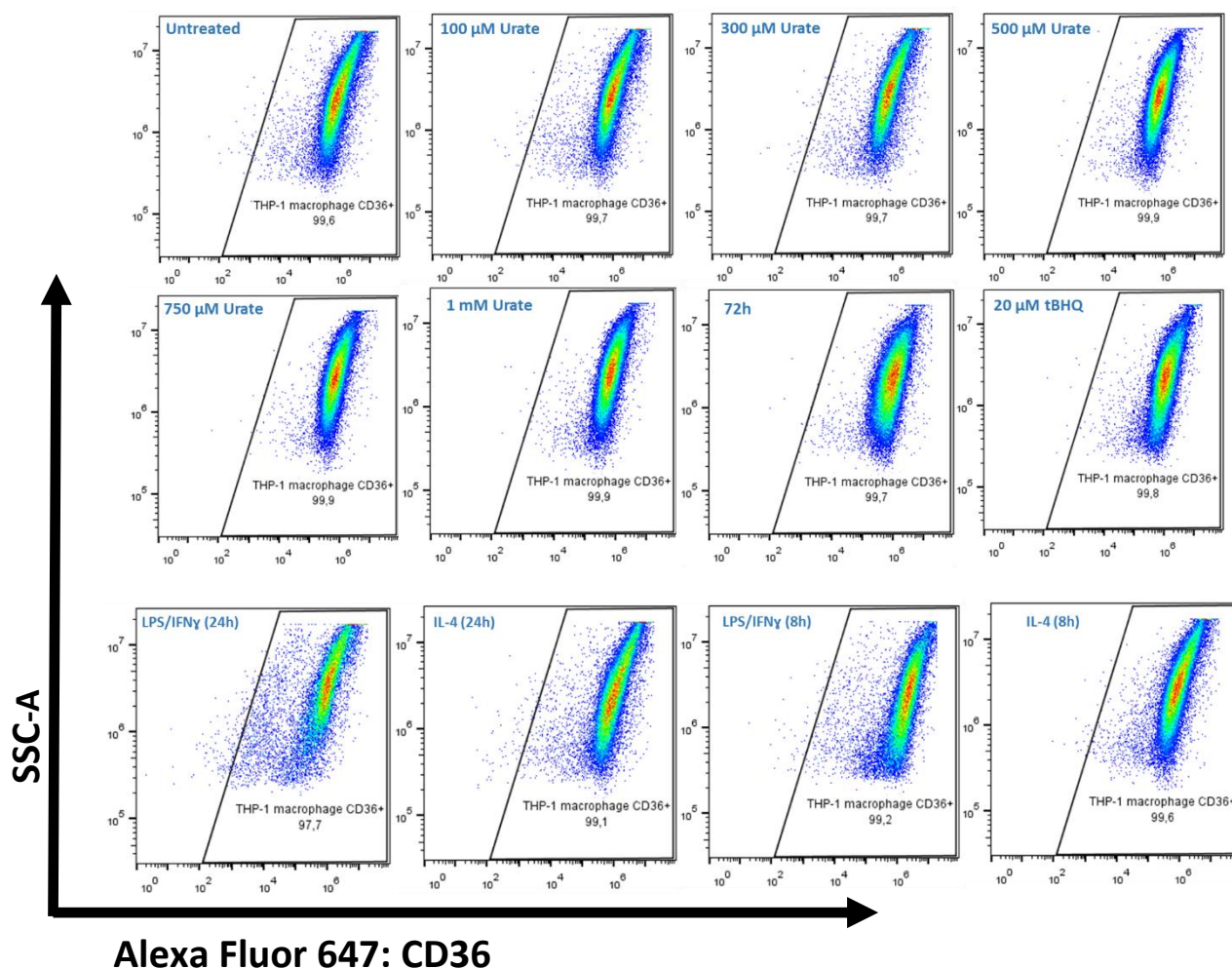
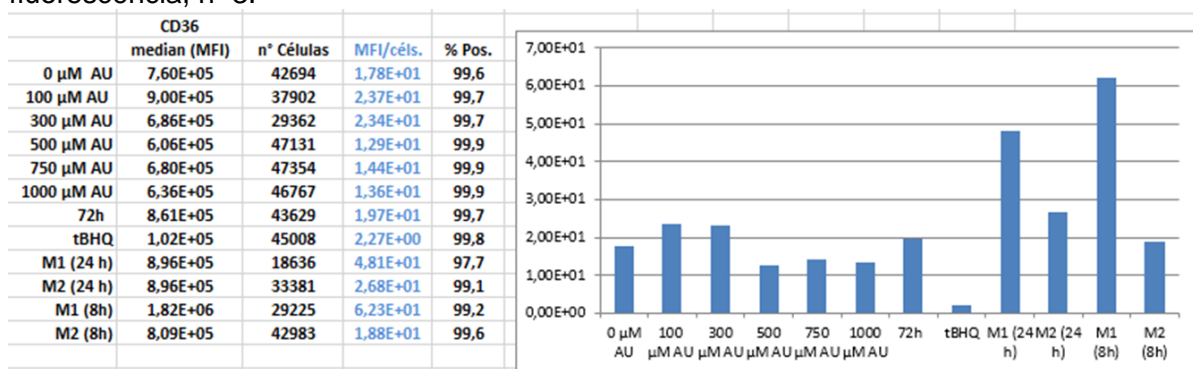


Figura A.14: Caracterização fenotípica de macrófagos tratados com ácido úrico solúvel após 24 h. Macrófagos foram avaliados por citometria de fluxo quanto à porcentagem de marcação de CD36, n=3.

Tabela XIV: Medida da intensidade de fluorescência para CD36. Gráfico à direita representa a mediana normalizada pelo número de eventos da intensidade de fluorescência, n=3.



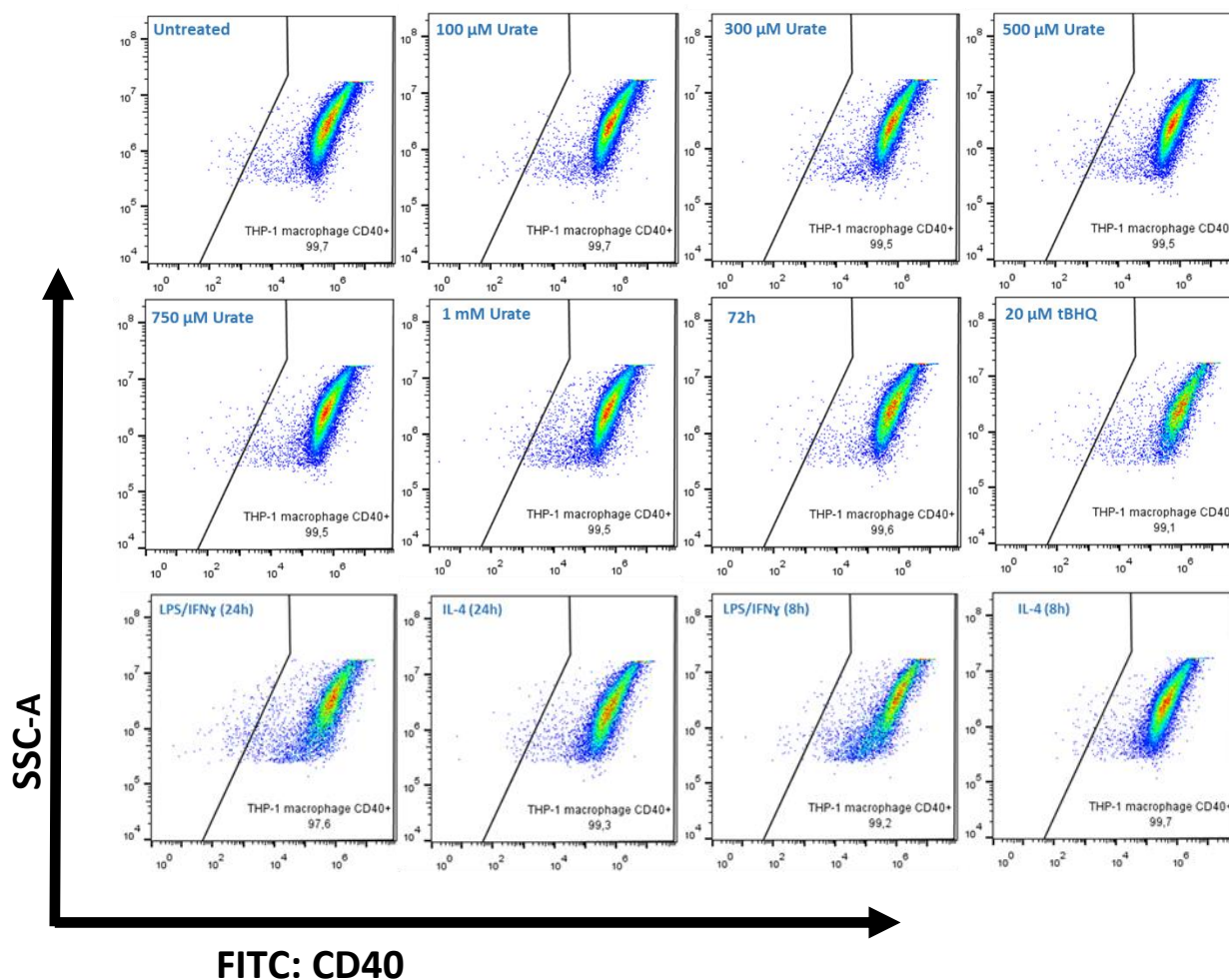
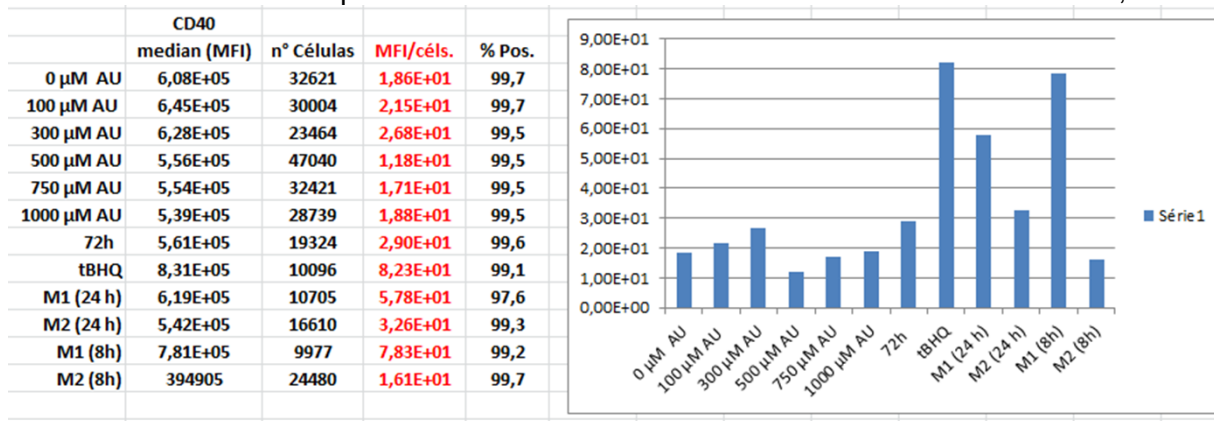


Figura A.15: Caracterização fenotípica de macrófagos tratados com ácido úrico solúvel após 24 h. Macrófagos foram avaliados por citometria de fluxo quanto à porcentagem de marcação de CD40, n=3.

Tabela XV: Medida da intensidade de fluorescência para CD40. Gráfico à direita representa a mediana normalizada pelo número de eventos da intensidade de fluorescência, n=3.



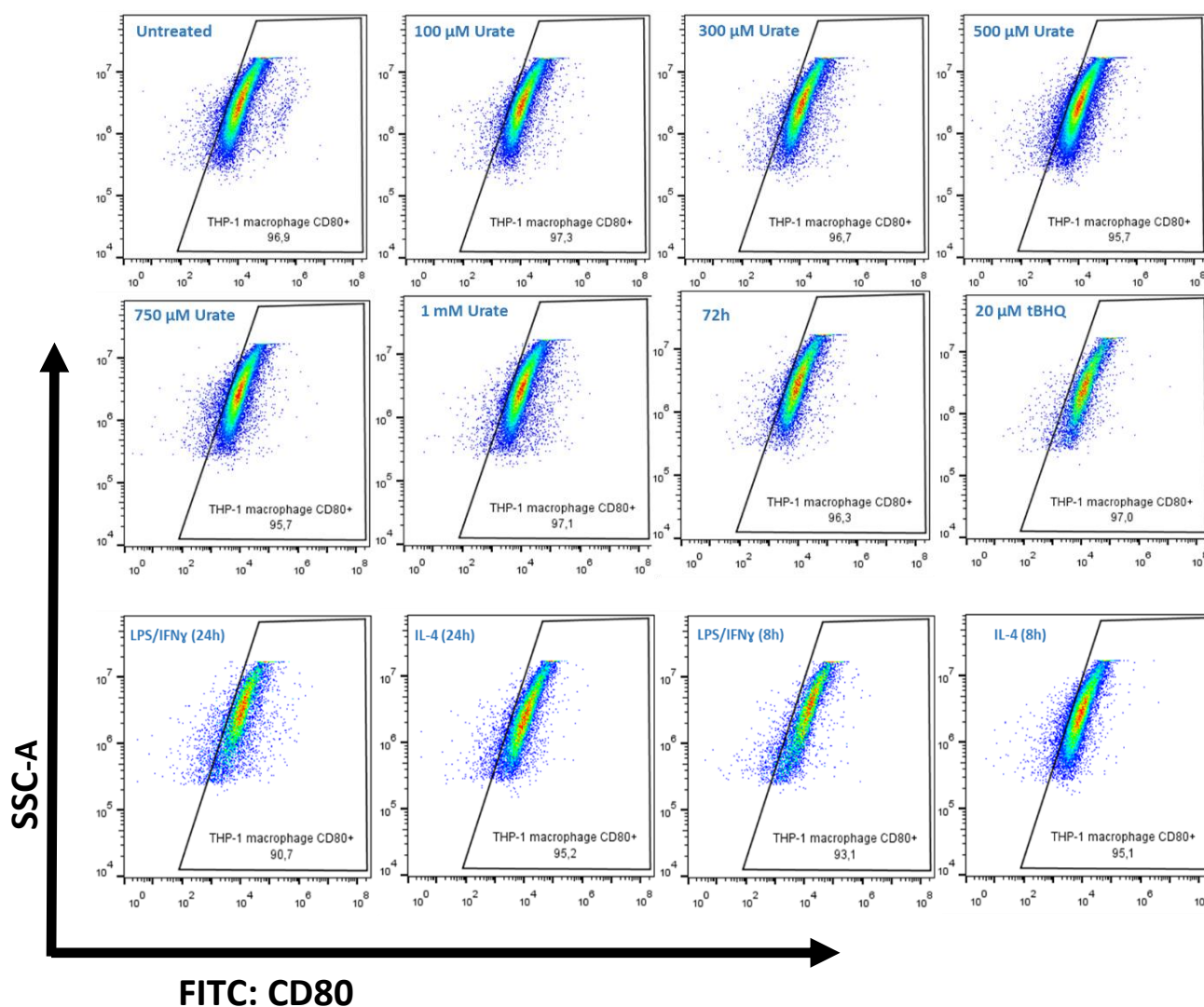
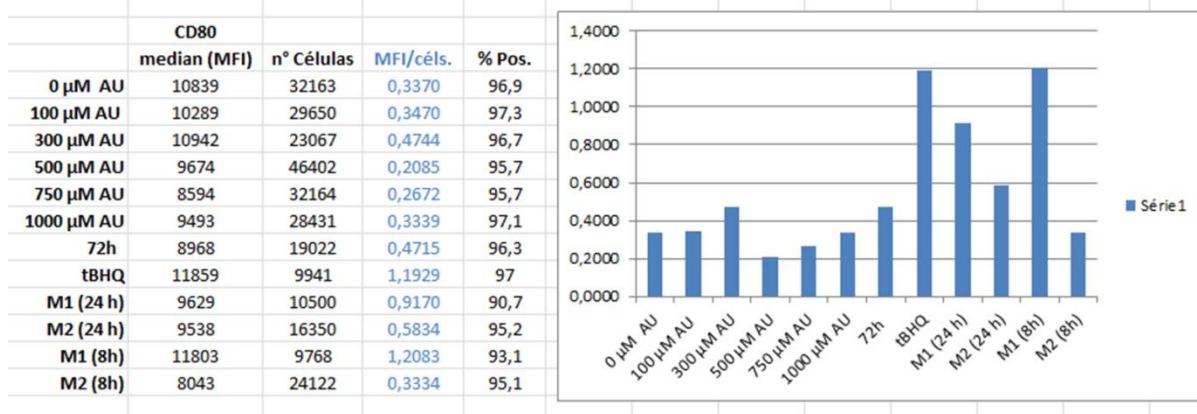


Figura A.16: Caracterização fenotípica de macrófagos tratados com ácido úrico solúvel após 24 h. Macrófagos foram avaliados por citometria de fluxo quanto à porcentagem de marcação de CD80, n=2.

Tabela XVI: Medida da intensidade de fluorescência para CD80. Gráfico à direita representa a mediana normalizada pelo número de eventos da intensidade de fluorescência, n=2.



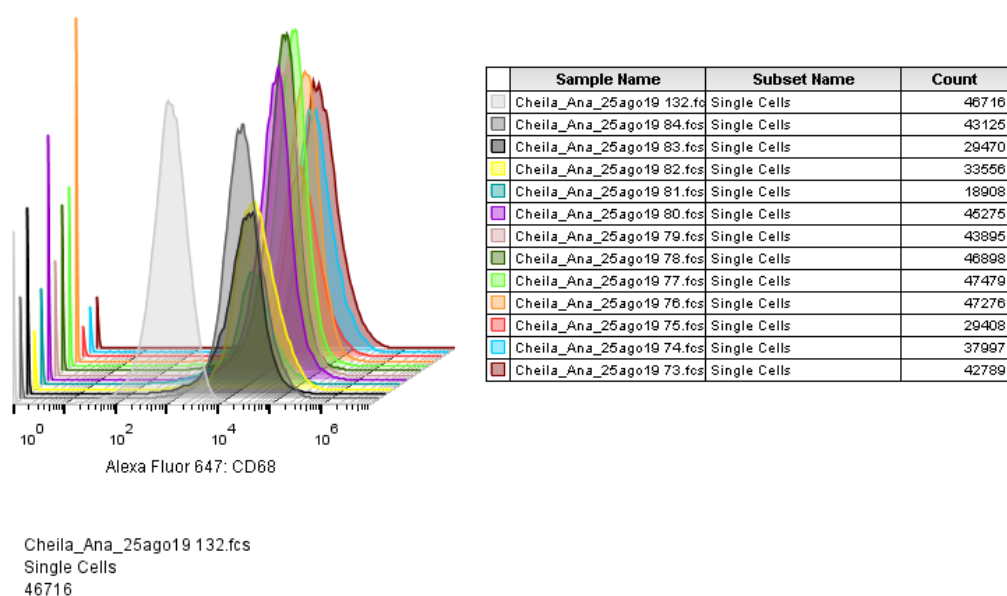
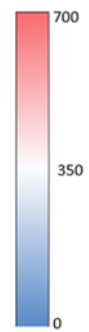


Figura A.17: Caracterização fenotípica de macrófagos tratados com ácido úrico solúvel após 24 h. Macrófagos foram avaliados por citometria de fluxo quanto à porcentagem de marcação de CD68. Histograma representativo de três experimentos independentes (n=3).

Tabela A.17: Resumo da medida de intensidade média de fluorescência (MFI) dos marcadores de fenótipo normalizados por eventos obtido por FACS após 24 h de tratamento com ácido úrico (AUs) e mapa de calor (gráficos dos marcadores são apresentados nas figuras suplementares anteriores). A tabela abaixo representa uma escala de intensidade de cor, em que azul representa menor MFI, enquanto vermelho representa maior MFI. Medidas representativas dos *plots* são apresentados anteriormente.

[AUs] μ M	CD14	CD16	CD11b	CD45	Prx1	Prx2	STAT3	Nrf2	CD163	SOCS3	TrxR	CD36	CD40	CD80	CD68
0 μ M	0,430	0,182	6,773	70,566	2,217	76,2	21,186	3,897	0,337	3,704	130,318	17,801	18,638	0,337	0,477
100 μ M	0,486	0,198	2,183	43,875	2,142	96,7	12,528	6,020	0,272	1,887	83,158	23,745	21,497	0,347	0,586
300 μ M	0,559	0,234	2,711	54,204	1,476	53,2	14,561	3,024	0,348	2,352	87,371	23,363	26,764	0,474	0,586
500 μ M	0,333	0,128	47,016	58,017	1,747	73,3	9,766	2,821	0,148	1,512	55,774	12,86	11,82	0,208	0,471
750 μ M	0,610	0,229	0,723	13,902	2,280	93,8	9,360	2,309	0,248	1,360	40,951	14,36	17,087	0,267	0,412
1000 μ M	0,433	0,178	0,705	13,531	3,641	150	9,721	2,884	0,168	2,033	71,622	13,6	18,755	0,334	0,396
dTHP-1	0,406	0,175	1,013	15,623	5,002	267	12,061	2,709	0,188	1,758	55,052	19,734	29,031	0,471	0,633
tBHQ	0,584	0,290	1,543	27,462	5,223	257	38,772	3,968	0,273	21,813	656,57	2,266	82,31	1,193	0,534
LPS/IFN γ (24 h)	0,468	0,242	0,833	26,242	6,002	356	37,579	7,334	0,631	2,296	77,51	48,079	57,823	0,917	0,642
IL-4 (24 h)	0,484	0,216	3,016	37,35	1,701	84,5	13,146	2,988	0,127	1,250	37,38	26,842	32,631	0,583	0,559
LPS/IFN γ (8 h)	0,966	0,927	2,893	42,797	2,824	180	85,272	15,17 3	0,859	3,975	122,231	62,275	78,280	1,208	0,541
IL-4 (8 h)	0,855	0,379	1,123	13,937	1,537	74,9	9,172	2,373	0,128	1,324	210,15	18,821	16,131	0,333	0,465



Legenda

Apêndice – Parte II

Figuras Suplementares

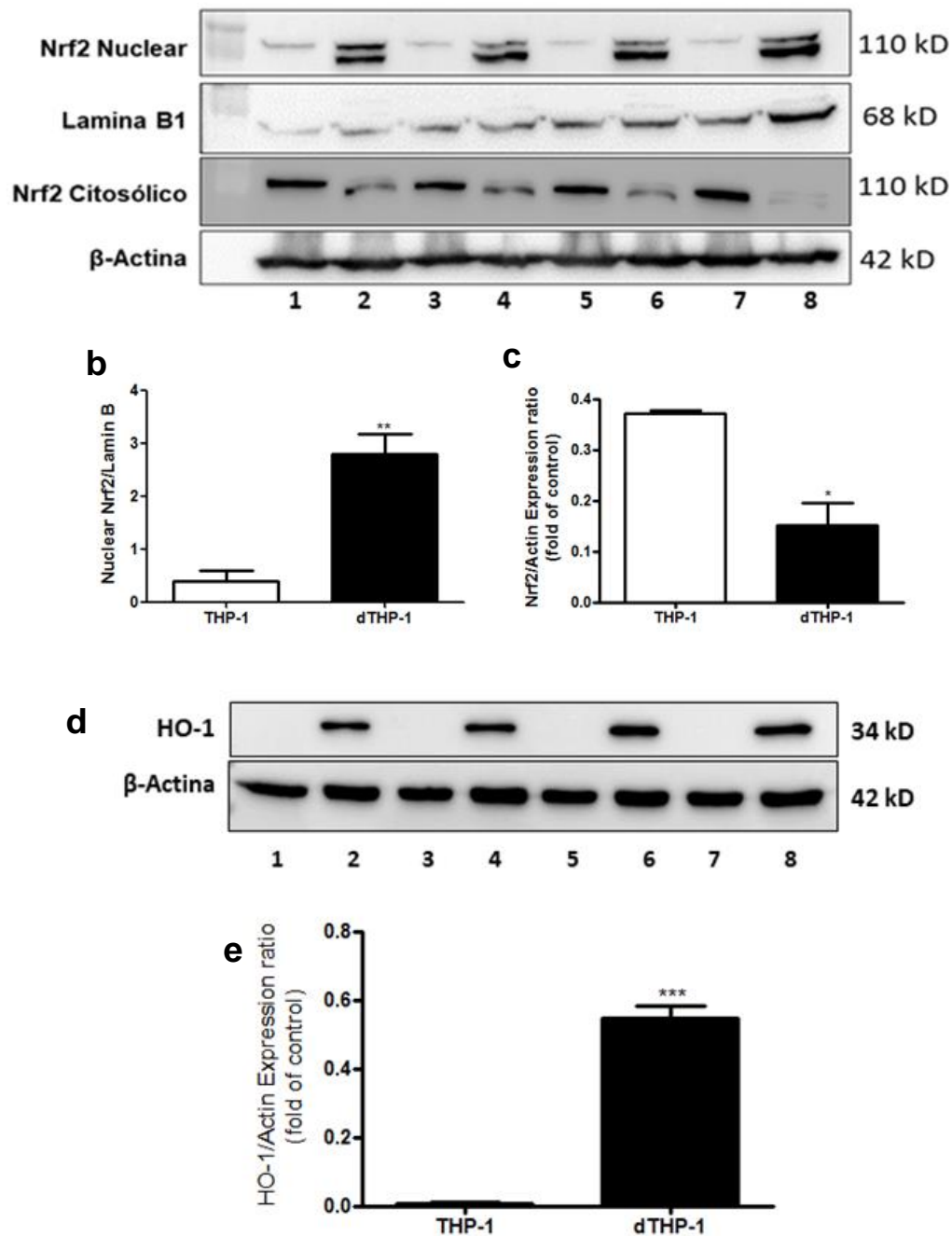


Figura A.18: (a) Expressão basal do fator de transcrição Nrf2 nuclear e citosólico obtidos de extratos fracionado de células THP-1 (linhas 1,3,5,7) e de macrófagos-símile THP-1 obtidos através da diferenciação por PMA (Linhas 2,4,6,8) por western-blot. A normalização das amostras foi obtida através do controle do carregamento de 25 μ g de extrato fracionado nuclear ou citosólico; (b) Nrf2/Lamina B representa a expressão nuclear do Nrf2 normalização pela proteína nuclear Lamina B1; (c) Nrf2/ β -actina representa a expressão citosólica do Nrf2 normalização pela proteína citosólica β -actina. (d) expressão da HO-1 obtida de extrato total de células THP-1 (linhas 1,3,5,7) e de macrófagos-símile obtidos através da diferenciação por PMA (Linhas 2,4,6,8) por

western-blot e normalizadas por β -Actina (e). Carregamento de 25 μ g de proteína obtida de extrato total. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

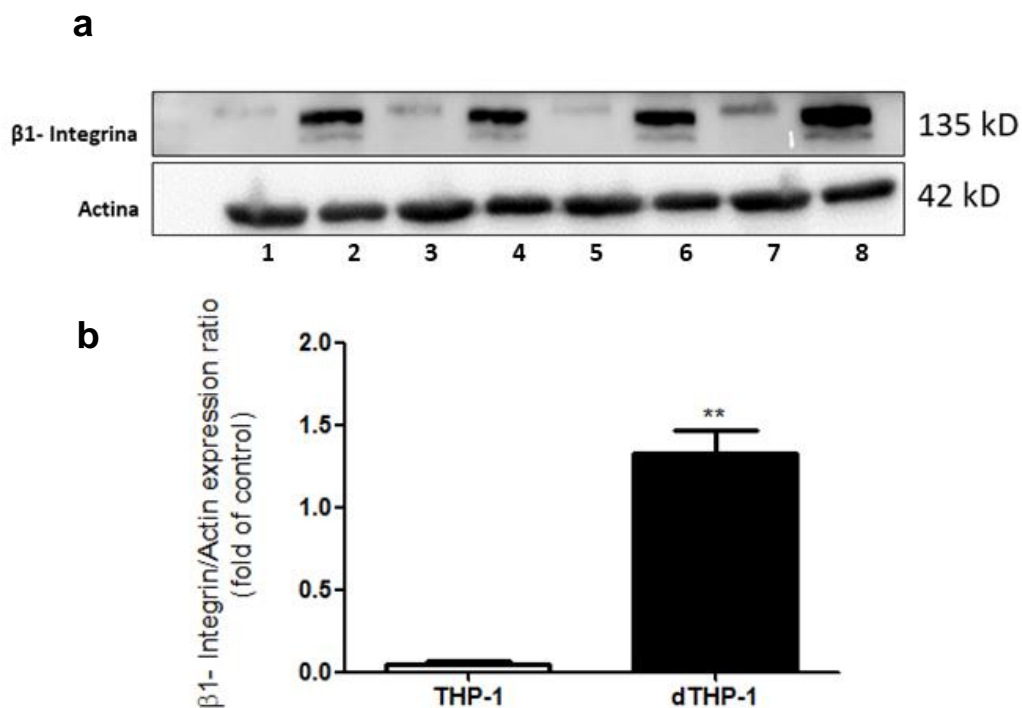


Figura A.19: Expressão basal de Integrina $\beta 1$ /CD29 (a) obtidos de extratos total de células THP-1 (linhas 1,3,5,7) e de macrófagos-símile obtidos através da diferenciação por PMA (Linhas 2,4,6,8) por western-blot. A normalização das amostras foi obtida através do controle do carregamento de 25 μ g de extrato; b) Integrina $\beta 1$ /actina representa a normalização pelo controle de carregamento das amostras. ** $p < 0,01$.

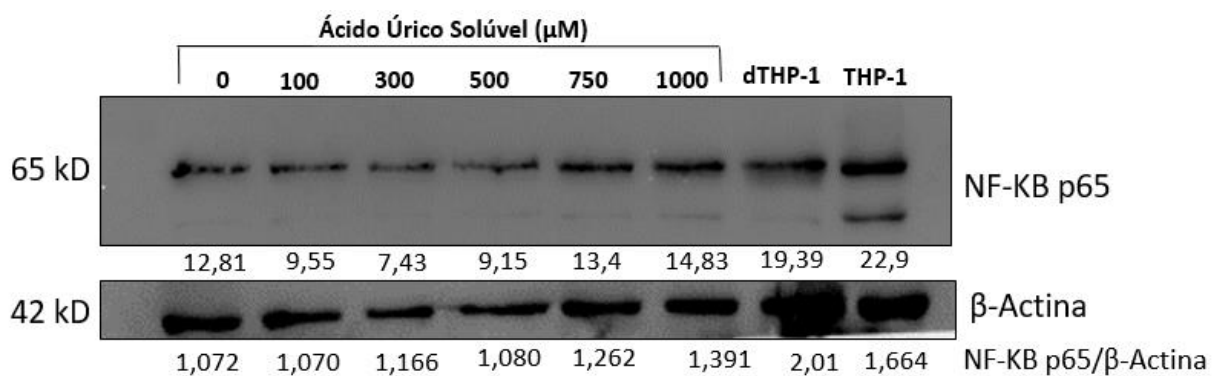


Figura A.20: Expressão do fator de transcrição NF-κB p65 total após 24 h de tratamento com ácido úrico solúvel. A normalização das amostras foi obtida através do controle do carregamento de 25 μg de extrato total de células; números abaixo das imagens representam a densidade óptica. NF-κB p65 Total/β-actina representa a normalização pelo controle de carregamento das amostras em SDS-PAGE em condições redutoras

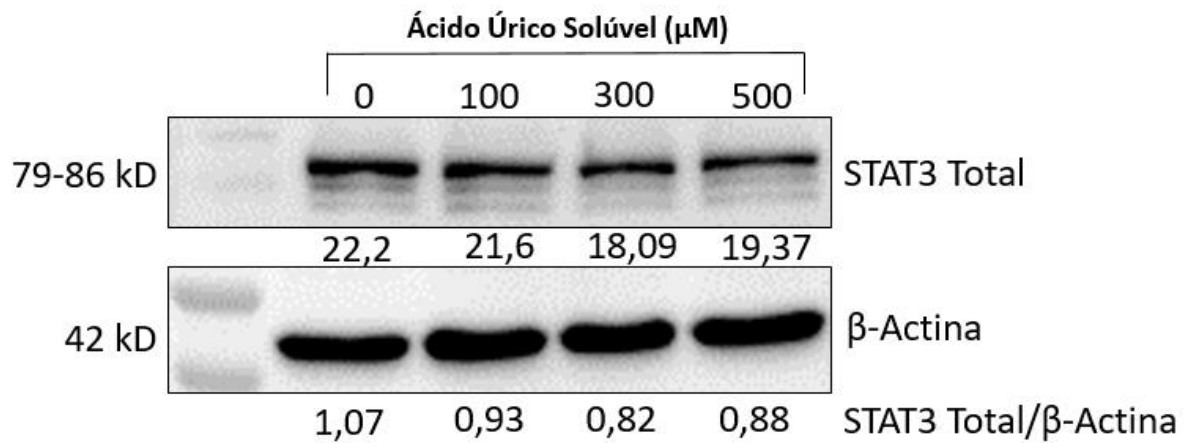


Figura A.21: Expressão da STAT3 total é reduzida após 24 h de tratamento com ácido úrico solúvel. A normalização das amostras foi obtida através do controle do carregamento de 25 μ g de extrato total de células; números abaixo das imagens representam a densidade óptica. STAT3 Total/ β -actina representa a normalização pelo controle de carregamento das amostras em SDS-PAGE em condições redutoras.

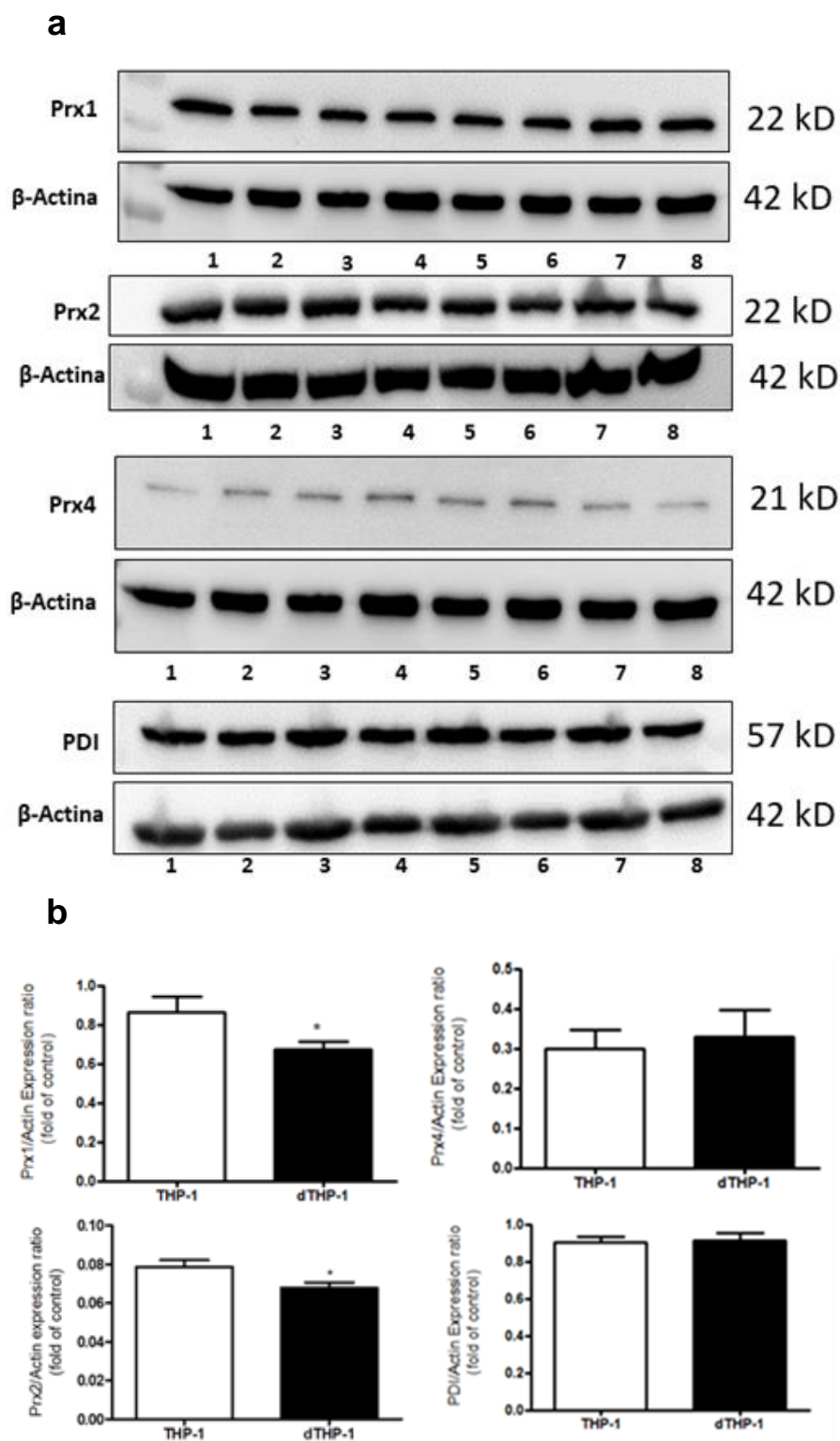


Figura A.22: Expressão basal das proteínas Prx1, Prx2 e Prx4 e PDI obtidas de células THP-1 não diferenciadas (linhas 1,3,5,7) e THP-1 diferenciada (linhas 2,4,6,8) THP-1 (a) por western-blot; (b) a densidade óptica D.O. Prx1, Prx2, Prx4 e PDI obtidas dos blots da figura anterior. A normalização das amostras foi obtida através do controle do carregamento de 25 μ g de proteína * $p < 0,01$.

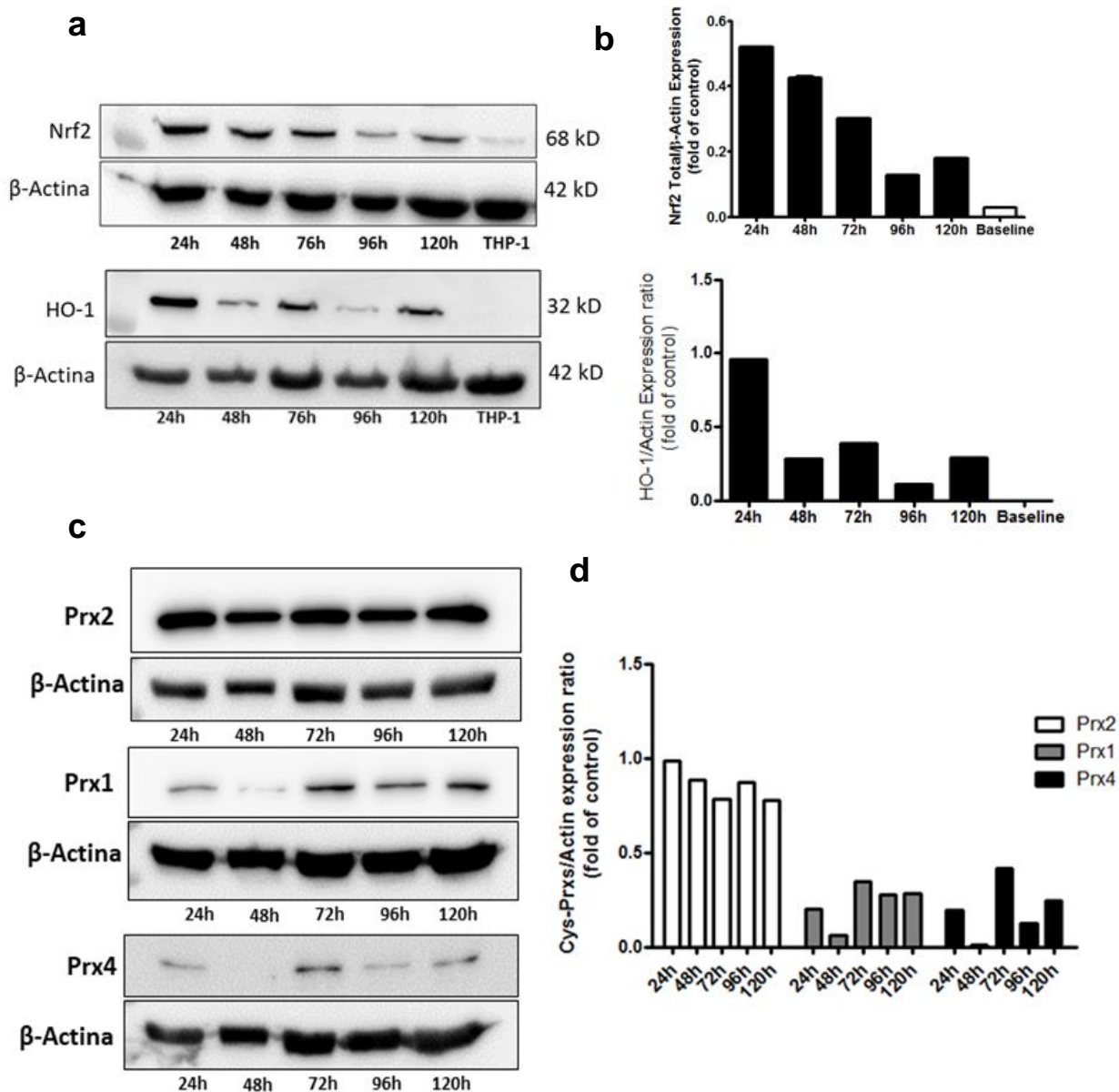


Figura A.23: (a) Expressão temporal do Nrf2 e HO-1 após 24, 48, 72, 96 e 120 h de diferenciação de células THP-1 em macrófagos por PMA e da célula THP-1; em b) gráficos de densidade óptica dos blots da figura anterior (Baseline representa célula THP-1 não diferenciada). Nrf2/actina (gráfico superior) e HO-1/actina (gráfico superior) representam a normalização pelo controle de carregamento das amostras; (c) Expressão da Prx2, Prx1 e Prx4 após 24, 48, 72, 96 e 120 h de diferenciação por PMA e seu pró-monócito THP-1 (Basal); em (d) o gráfico representa a expressão das proteínas Prx2, Prx1 e Prx4 obtidas dos blots das figuras anteriores normalizadas pela expressão de actina (carregamento de 25 µg de proteína).

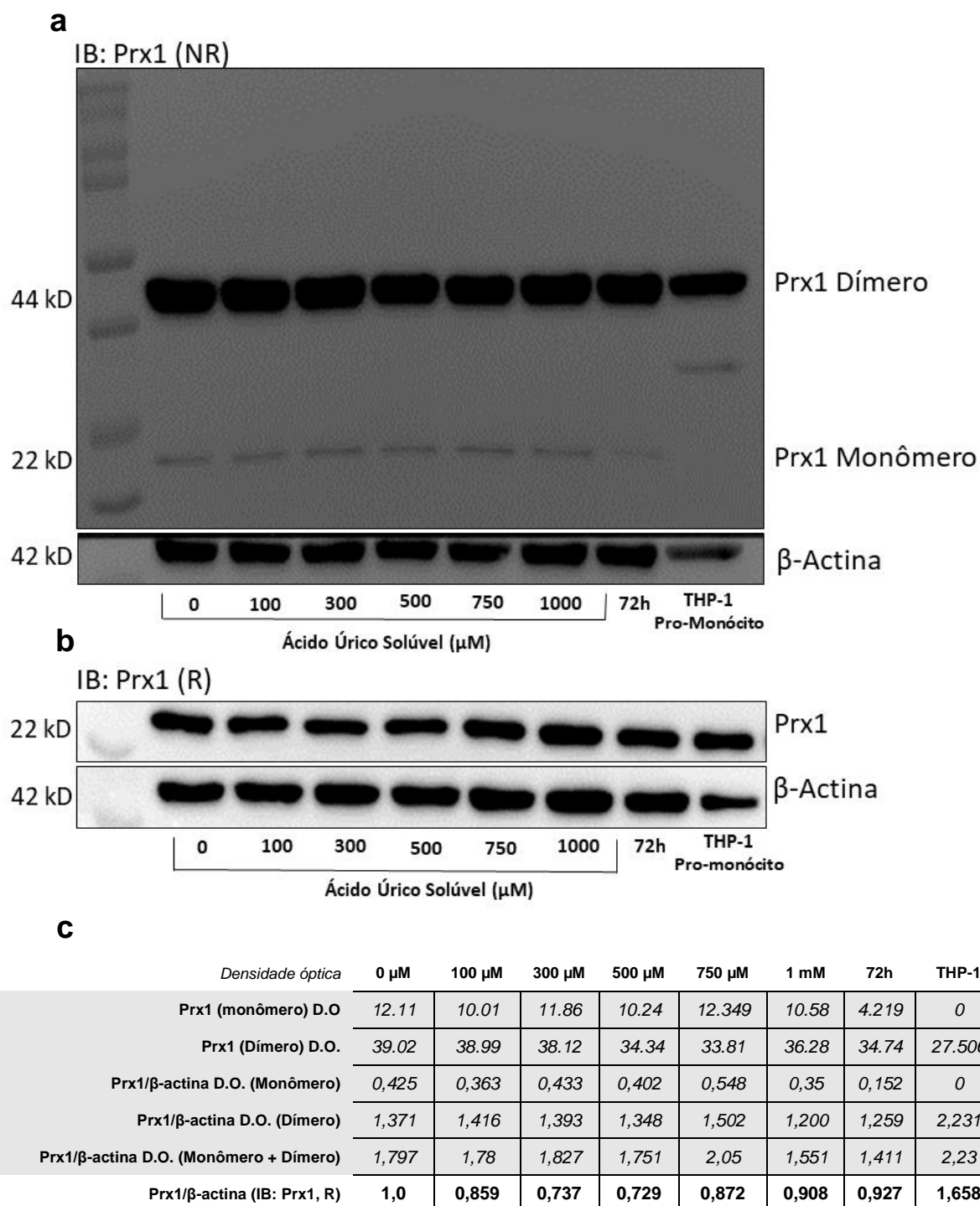


Figura A.24: Expressão da Prx1 em condições não-redutoras (NR) (a) e redutoras (R) (b) após diferenciação por 48 h seguido por 24 h de tratamento com 0, 100, 300, 500, 750 e 1000 μM de ácido úrico solúvel e seus respectivos controles de meio completo (72 h) e a célula THP-1. Em (c) a tabela representa as normalizações das amostras obtidas através do controle do carregamento de 25 μg de extrato celular e proteína β-actina foi utilizada como controle. As amostras NR foram previamente tratadas com 100 mM N-etil-maleimida por 10 minutos antes da lise total para evitar artefato de oxidação posterior ao tratamento com ácido úrico. Carregamento de 25 μg de extrato proteico.

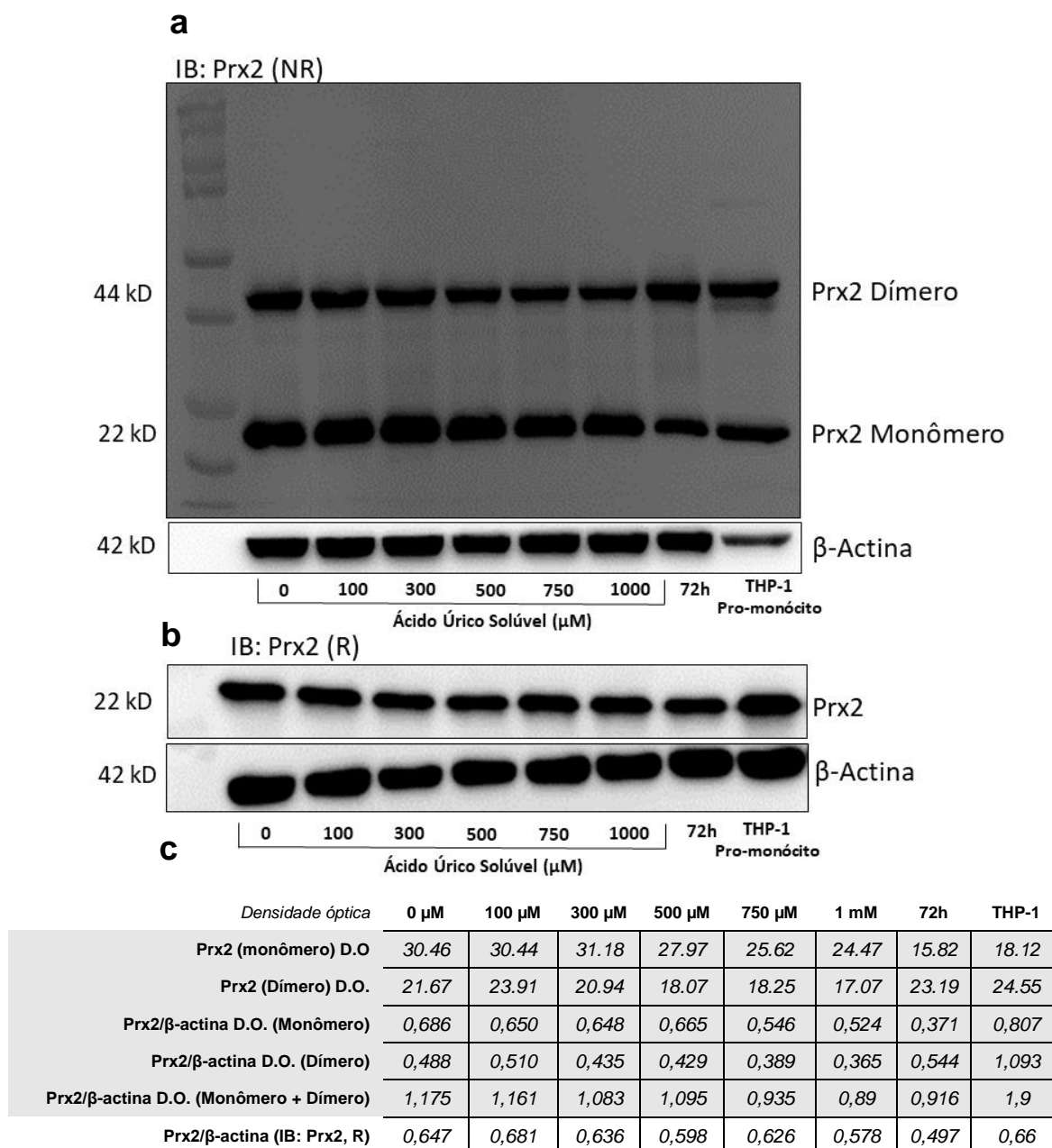
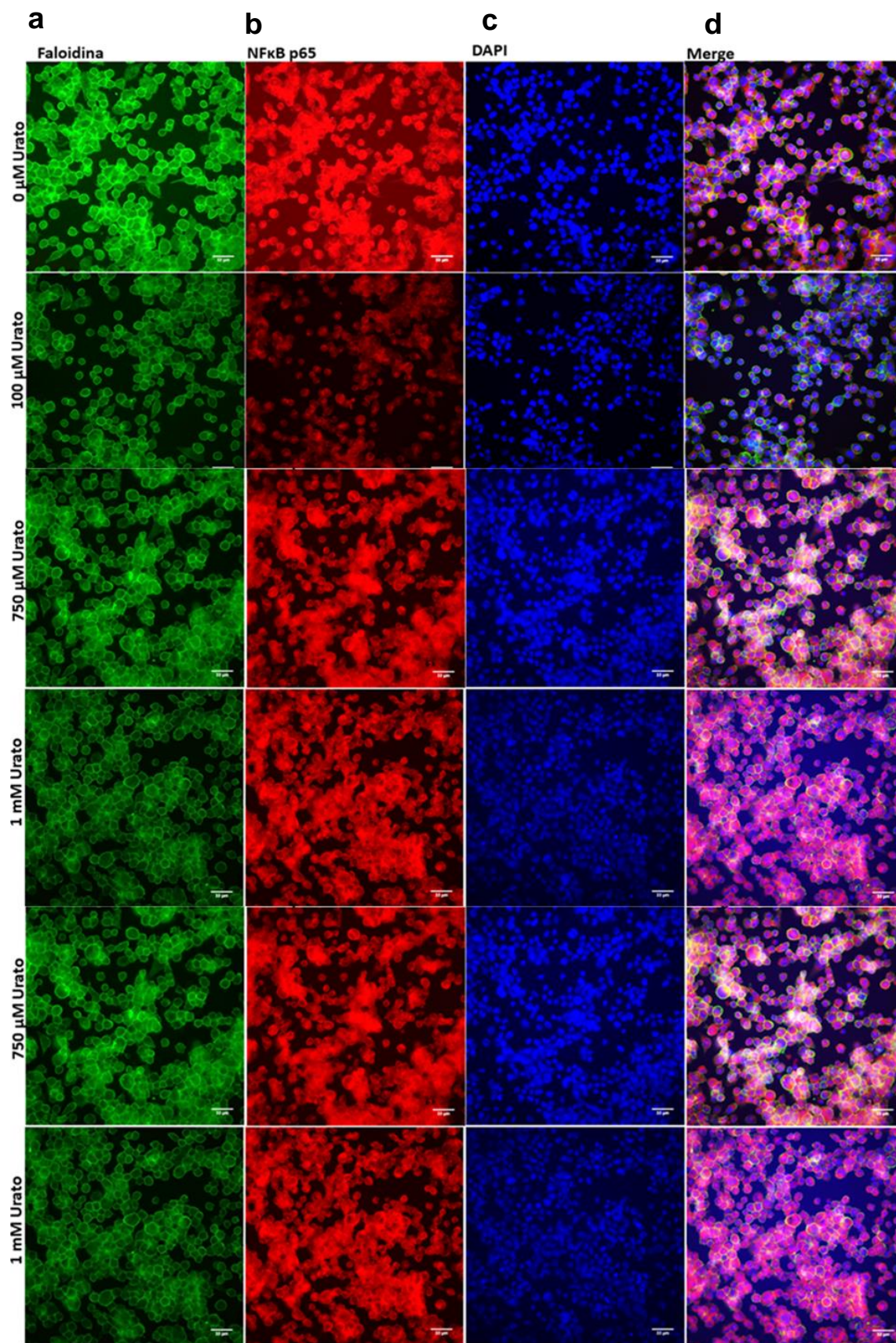


Figura A.25: Expressão da Prx2 em condições não-redutoras (NR) (a) e redutoras (R) (b) após diferenciação por 48 h seguido por 24 h de tratamento com 0, 100, 300, 500, 750 e 1000 μ M de ácido úrico solúvel e seus respectivos controles de meio completo (72 h) e célula THP-1. Em (c) a tabela representa as normalizações das amostras obtidas através do controle do carregamento de 25 μ g de extrato celular para amostras NR e R; β -actina foi utilizada como controle. As amostras NR foram previamente tratadas com 100 mM N-etil-maleimida por 10 minutos antes da lise total para evitar artefato de oxidação posterior ao tratamento com ácido úrico. Carregamento de 25 μ g de extrato proteico.

Apêndice – Parte IV
Figuras Suplementares



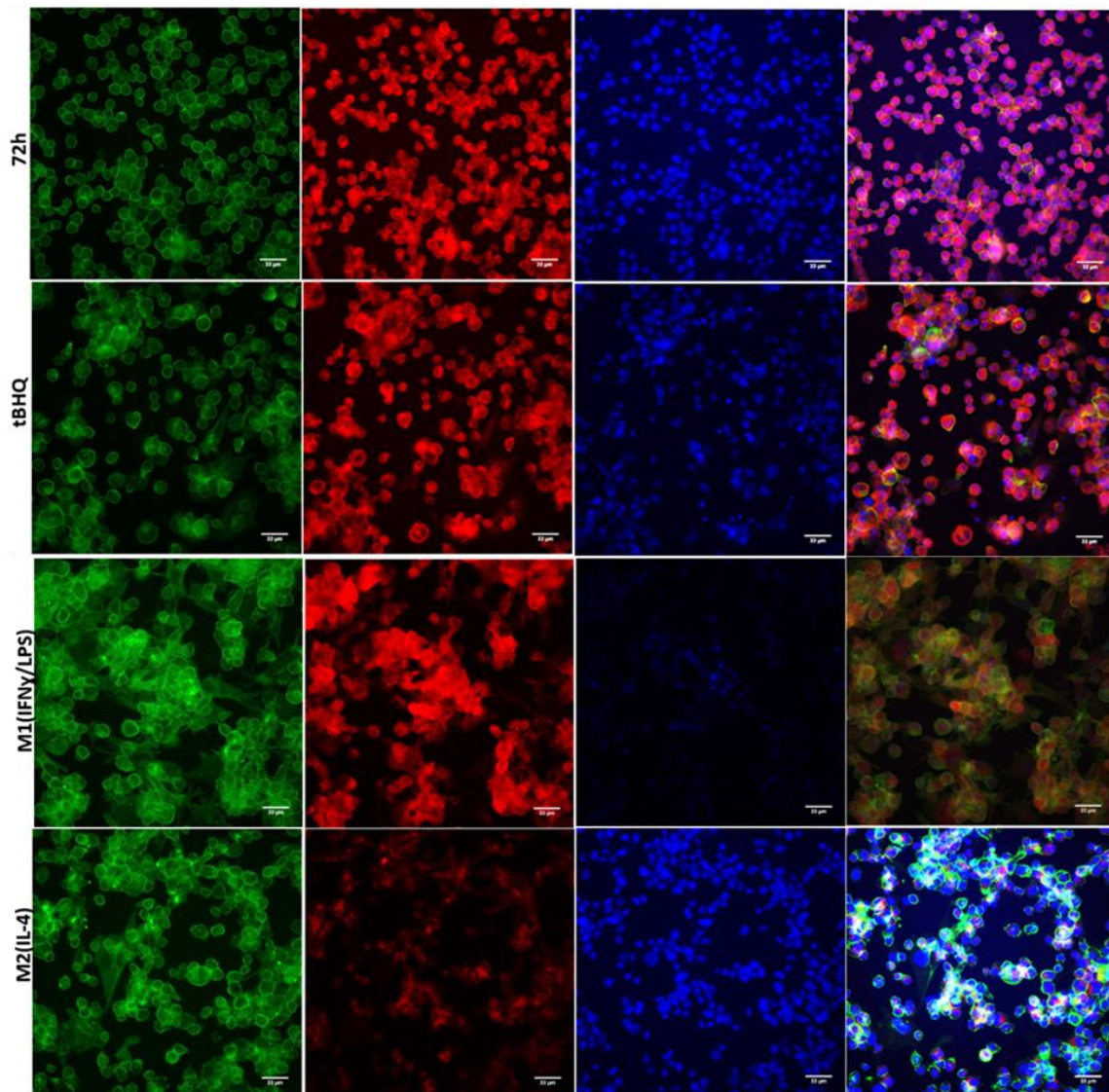


Figura A.26: Expressão da f-actina e p65 por imageamento HTS após tratamento por ácido úrico solúvel. Imagens pseudocoloridas representativas Faloidina (F-Actina) em verde (a, 1º painel da esquerda, canal FITC), NF-κB p65 em vermelho (b, 2º painel da esquerda para a direita, canal Cy5), DAPI em azul (c, 3º painel da esquerda para a direita, canal DAPI) e Merge representa a sobreposição dos canais para a obtenção da imagem pseudocolorida (d, 4º painel da esquerda para a direita). Média de Intensidade de fluorescência (por pixel) foi analisada pelo programa IN Carta (GE HealthCare) de cada imagem obtida. Objetiva 40x, modo não-confocal. Legenda: 0-1000 μ M Urato (ácido úrico solúvel); 72 h representa controle positivo para meio completo RPMI 1640 (48 h de diferenciação + 24 h em meio completo); tBHQ (*tert*-Butil-hidroquinona 20 μ M, controle positivo Nrf2); M1(IFN γ /LPS, 20 ng/mL + 1 μ g/mL) controle positivo para perfil de ativação clássica M2(IL-4), controle positivo para o perfil de ativação não-clássica. N=Densidade celular= 2,5 $\times 10^5$. Dados são representativos de dois experimentos diferentes com oito réplicas.