



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAUDE

NARA GUALBERTO CAVALCANTI

PERFIL DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS EM PACIENTES COM GOTA:
associação com parâmetros clínicos e laboratoriais

Recife

2014

Nara Gualberto Cavalcanti

**PERFIL DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS EM PACIENTES COM GOTA:
associação com parâmetros clínicos e laboratoriais**

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre.

Área de concentração: Saúde do Adulto

Orientadora:

Profa. Dra. Claudia Diniz Lopes Marques

CV Lattes: <http://lattes.cnpq.br/9182477114421476>

Coorientadora:

Profa. Dra. Angela Luzia Branco Pinto Duarte

CV Lattes: <http://lattes.cnpq.br/9805012149505865>

Recife

2014

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

C376p Cavalcanti, Nara Gualberto.
Perfil de citocinas pró-inflamatórias em pacientes com gota:
associação com parâmetros clínicos e laboratoriais / Nara Gualberto
Cavalcanti. – 2014.
86 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientadora: Cláudia Diniz Lopes Marques.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco,
CCS. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Recife, 2014.

Inclui referências e apêndices.

1. Gota. 2. Citocinas. 3. IL-18. 4. IL-6. I. Marques, Cláudia Diniz
Lopes (Orientadora). II. Título.

610 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2019-248)

Nara Gualberto Cavalcanti

**PERFIL DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS EM PACIENTES COM GOTA:
associação com parâmetros clínicos e laboratoriais**

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre.

Aprovada em: 03/09/2014.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Angela Luzia Branco Pinto Duarte (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Maíra Galdino da Rocha Pitta (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Jaymesson Raphael Cardoso Vieira (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

A Dan e lo

AGRADECIMENTOS

À Daniel, pela ajuda, carinho, cumplicidade e suporte.

À minha família, à Alba e Felinto, por serem tão especiais e por todo o carinho e suporte.

Aos meus pais, minhas irmãs e minha avó por entenderem minha ausência neste período.

Às minhas orientadoras que muito admiro: Prof^a. Claudia Marques por todo o suporte, por não me deixar desanimar diante das intempéries, e Prof^a. Angela Duarte, pelo exemplo, pelo estímulo e amizade e pela acolhida na Reumatologia.

À Prof^a. Maira Pitta Galdino pela oportunidade e apoio para a realização do projeto.

Ao amigo Thiago Lins e Lins, por toda a ajuda e colaboração.

Aos amigos do Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco.

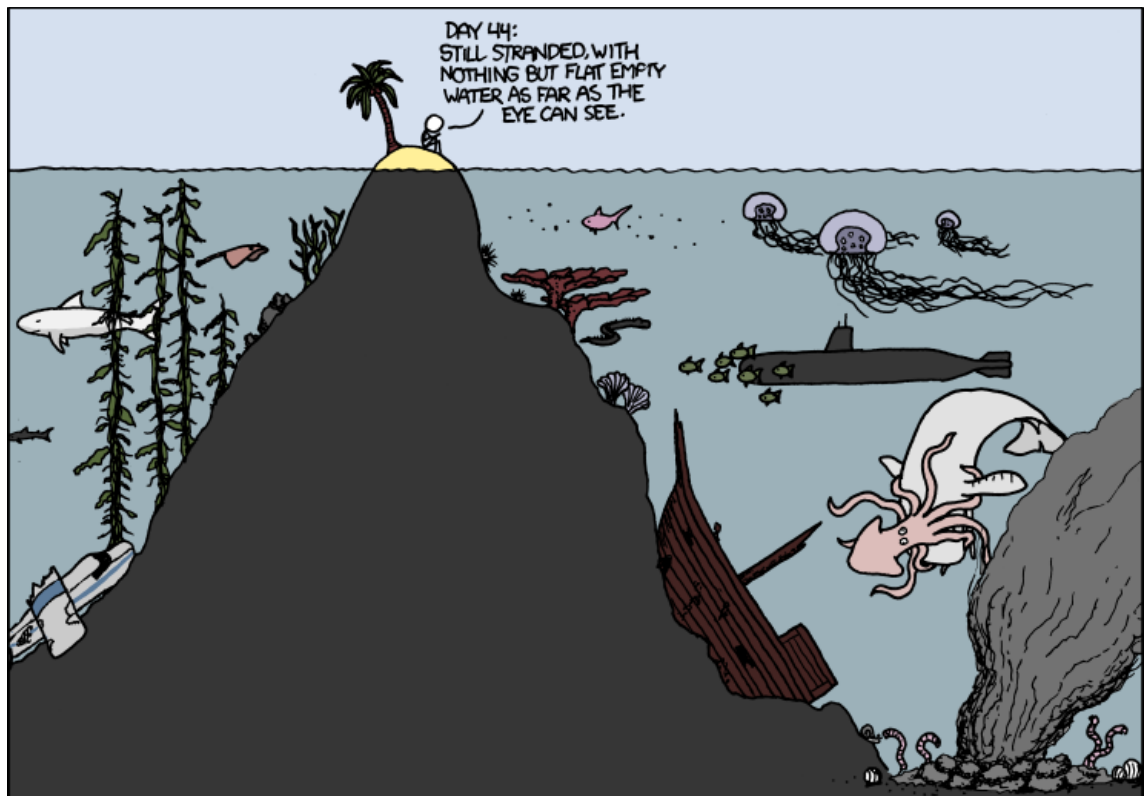
Aos amigos do Linat.

À equipe do laboratório de análises clínicas do HC-UFPE.

Ao Dr. Fernando Gurgel e Claudia Fontan, pela gentileza e apoio e importante colaboração nesta jornada

Aos funcionários da Reumatologia, Sres. Edilson e Sandro pela contribuição na realização deste estudo.

Aos pacientes, origem e finalidade do aprendizado adquirido ao longo deste caminho, e aos voluntários que contribuíram altruisticamente para o desenvolvimento deste estudo.



(Randall Munroe, Desert Island, 2010, <https://xkcd.com/731>)

RESUMO

A gota é considerada atualmente uma doença autoinflamatória, caracterizada pela ativação da imunidade inata. Existem poucos dados que relacionem a presença de citocinas com as manifestações clínicas da doença. Com o objetivo de avaliar o perfil sérico de citocinas pró-inflamatórias na gota (IL-1 α , IL-6, IL-8, IL-17A, IL-18, IL-22 e IL-23) e correlacionar com dados clínicos e laboratoriais em um grupo de pacientes com gota e em grupo de comparação, foram incluídos indivíduos do sexo masculino com diagnóstico de gota (GG) segundo os critérios do American College of Rheumatology (ACR), verificando-se idade, tempo de diagnóstico, fase clínica da gota, índice de massa corpórea (IMC), presença de comorbidades, presença de tofos ou deformidades e medicações utilizadas para o tratamento da gota, além de dados laboratoriais como velocidade de hemossedimentação (VHS), proteína C reativa (PCR) e uricemia. Os níveis de IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-17, IL-18, IL-22 e IL-23 foram mensurados por ELISA. Como grupo de comparação (GC) foram incluídos indivíduos do sexo masculino, sem história prévia de artrite, selecionados aleatoriamente entre os acompanhantes de pacientes do hospital. Foram incluídos 39 indivíduos no GG e 34 no GC. A média de idade no GG foi 58,2 ($\pm$ 1,6) anos e no GC foi 54,3 ($\pm$ 1,8) anos. Dezesete indivíduos (43%) encontravam-se em crise no momento da avaliação. Trinta e cinco pacientes (89,74%) estavam em uso de alopurinol, trinta (76,92%) em uso de colchicina, e sete (17,9%) estavam em uso de prednisona no momento da avaliação. Não houve diferença na distribuição das citocinas de acordo com o uso de alopurinol, colchicina ou prednisona. Encontramos diferença nos níveis séricos de IL-18 entre GG e GC ($p=0,0013$) e correlação positiva da IL-18 com VHS ($r= 0,43$, $p=0,0073$), PCR ($r= 0,47$, $p=0,0025$) e com níveis séricos de IL-6 ($r=0,36$, $p=0,023$). Para as demais citocinas mensuradas não houve diferença entre pacientes e grupo de comparação. Não houve correlação das citocinas avaliadas com uricemia, idade, tempo de doença, uso de medicações, presença de comorbidades ou presença de artrite ativa. Foi encontrada associação entre a elevação dos níveis séricos de IL-6 e a presença de tofos ($p=0,005$) e deformidades ($p=0,0008$), além de correlação desta citocina com VHS ($r=0,41$, $p=0,011$) e com PCR ($r=0,48$, $p=0,02$). Encontramos ainda significativa correlação entre IL-1 α e IL-17A ($r=0,397$, $p=0,012$). Em conclusão, encontramos correlação

estatisticamente significativa entre os níveis séricos da IL-6 e IL-18 e os níveis dos marcadores laboratoriais de atividade inflamatória. A IL-6 mostrou também associação com a presença de tofos e deformidades. Não foram observadas associações estatisticamente significativas entre os níveis séricos das outras citocinas pró-inflamatórias avaliadas e parâmetros clínicos ou laboratoriais em pacientes portadores de gota. À exceção da IL-18, não encontramos diferença estatística nos níveis séricos das citocinas mensuradas entre pacientes e grupo de comparação. Estes achados sugerem que a IL-18 possivelmente está envolvida na imunopatogenia da gota e pode ser um marcador de atividade de doença. A IL-6 pode ser considerada marcador de pior prognóstico na gota ou ainda ser determinante de pior evolução nesta patologia.

Palavras-chave: Gota. Citocinas. IL-18. IL-6.

ABSTRACT

Gout is presently considered an autoinflammatory disease, characterized by activation of the innate immunity. However, there are few data relating the presence of cytokines to the clinical manifestations of the disease. To evaluate the profile of pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-17A, IL-18, IL-22, and IL-23) and correlate it with clinical and laboratorial data on a group of gout patients and in a comparison group, we included male gout patients (Gout group - GG), according to the American College of Rheumatology (ACR) criteria, evaluating the following variables: age, time from diagnostic, clinical phase of gout, body mass index (BMI), presence or not of comorbidities, presence of tophi or deformities, medication used for the gout treatment. Laboratory data as erythrocyte sedimentation rate (ESR), C reactive protein (CRP), and uric acid were also analyzed. The levels of IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-17A, IL-18, IL-22, and IL-23 were measured through ELISA, in accordance with supplier's recommendations. As comparison group (CG), male individuals, selected from patient's companion, with no previous history of arthritis, were included. We included 39 patients in the GG and 34 in the CG. The average age on the GG was 58.2 (+/- 1.6) years and on the CG, 54.3 (+/- 1.8) years. Seventeen (43%) individuals had arthritis at the moment of evaluation. Thirty-five patients (89.74%) were using allopurinol, thirty (76.92%) were using colchicine, and seven (17.9%) in use of prednisone. We found no difference in the cytokine distribution according to the use of allopurinol, colchicine or prednisone. We found statistically significant difference for serum levels of IL-18 between GG e GC ($p=0.0013$). We also found positive correlation of IL-18 with ESR ($r= 0.43$, $p=0.0073$), CRP ($r= 0.47$, $p=0.0025$) and with serum IL-6 ($r=0.36$, $p=0.023$). We did not find statistically significant differences between GG and CG for the measured cytokines. For all the other evaluated cytokines, we did not find statistically significant differences between GG and CG. There was no correlation between the evaluated cytokines and hyperuricemia, age, time from diagnostic, gout treatment, presence of comorbidities, or gouty attack. Association was found between the serum levels of IL-6 and the presence of tophi ($p=0.005$) and deformities ($p=0.0008$). Correlation was found, as well, between the serum levels of IL-6 and CRP ($r=0.48$, $p=0.02$) and ESR ($r=0.41$, $p=0.011$). We also

found a significant correlation between IL-1 β and IL-17A ($r=0.397$, $p=0.012$). In conclusion, statistically significant correlation was found between serum levels of IL-6 and IL-18 and the serum levels of laboratorial markers of inflammatory activity. The expression of IL-6 was also associated with the presence of tophi and deformities. With the exception of the IL-18, we did not find statistically significant association between the other evaluated pro-inflammatory cytokines and clinical or laboratorial parameters in gout patients. These findings suggest the IL-18 is possibly involved in the immunopathogenesis of gout and may be an activity marker for the disease. The IL-6 may be considered a marker for worse prognostic in gout or even a determinant of worse evolution in this pathology.

Keywords: Gout. Citokynes. IL-18. IL-6.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – <i>The Comforts of Bath: Gouty Gourmand at Dinner</i> por Thomas Rowlandson.....	17
Figura 2 – Critérios de classificação de gota.....	19
Figura 3 – Esquema simplificado da atuação das citocinas pró-inflamatórias na gota.....	24
Figura 4 - Delineamento do estudo.....	37
Figura 5 – Comparação dos níveis de citocinas no soro dos pacientes com gota e controles.....	44
Figura 6 – Correlações da IL-6 com PCR, VHS e ácido úrico.....	45
Figura 7 – Níveis de IL-6 estratificados por grupos com e sem tofos, com e sem deformidade, e com e sem artrite.	46
Figura 8 – Comparação entre pacientes com e sem artrite no momento da avaliação em relação à PCR, VHS, e ácido úrico.....	47
Tabela 1 – Dados Clínicos e laboratoriais.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AR	artrite reumatoide
DAMP	padrões moleculares associados a dano
DLP	dislipidemia
DM	diabetes Mellitus
GC	grupo controle
GG	grupo gota
GM-CSF	do inglês <i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
HAS	hipertensão arterial sistêmica
IFN γ	Interferon gama
NLR	do inglês <i>NOD-like receptors</i>
NOD	do inglês <i>nucleotide oligomerization domain</i>
IL	interleucina
MUS	monourato de sódio
NK	do inglês natural killer
OPG	osteoprotegerina
PAMP	padrões moleculares associados a dano PCR - proteína C reativa
PMN	polimorfonucleares
PPAR γ	receptor do proliferador do peroxissomo gama
RANK	receptor ativador nuclear do fator kappa B
RANKL	ligante de receptor ativador nuclear do fator kappa B
ROS	do inglês <i>reactive oxygen species</i>
TGF	fator de crescimento transformador
Th	linfócito T helper
TLR	do inglês <i>toll-like receptors</i>
TNF	fator de necrose tumoral
VHS	velocidade de hemossedimentação
VEGF	fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1	REFERENCIAL TEÓRICO	15
1.1	INTRODUÇÃO.....	15
1.2	REVISÃO HISTÓRICA.....	16
1.3	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS.....	17
1.4	DIAGNÓSTICO.....	18
1.5	GOTA E IMUNIDADE	20
1.5.1	Imunidade inata.....	20
1.5.2	Imunidade adaptativa.....	22
1.5.3	IL-1 β E inflamassomo.....	24
1.5.4	IL-18.....	26
1.5.5	IL-6.....	28
1.5.6	IL-8.....	29
1.5.7	IL-17A.....	31
1.5.8	IL-22.....	33
1.5.9	IL-23.....	34
1.6	JUSTIFICATIVA.....	34
1.7	OBJETIVOS.....	35
1.7.1	Geral.....	35
1.7.2	Específicos.....	35
1.8	HIPÓTESES.....	36
1.9	MÉTODOS.....	36
1.9.1	Delineamento do estudo	36
1.9.2	Local de realização do estudo.....	36
1.9.3	População do estudo	37
1.9.4	CrITÉRIOS de inclusão e exclusão.....	38
1.9.4.1	CrITÉRIOS de inclusão	38
1.9.4.2	CrITÉRIOS de exclusão.....	38
1.9.5	Tamanho da amostra e técnica de amostragem.....	38
1.9.6	Definição e categorização das variáveis.....	38
1.9.6.1	Avaliação clínica.....	38
1.9.6.2	Avaliação laboratorial.....	39
1.9.6.3	Dosagem de citocinas.....	39

1.9.7	Análise estatística	40
1.9.8	Aspectos éticos.....	40
2	RESULTADOS.....	42
2.1	AVALIAÇÃO CLÍNICA DOS PACIENTES PORTADORES DE GOTA E DOS PARTICIPANTES DO GRUPO DE COMPARAÇÃO.....	42
2.2	DOSAGEM SÉRICA DAS CITOCINAS INFLAMATÓRIAS.....	43
2.3	AVALIAÇÃO DAS RELAÇÕES CLÍNICO-LABORATORIAIS.....	44
3	DISCUSSÃO	48
4	CONCLUSÕES	51
4.1	CONSIDERAÇÕES FINAIS	51
	REFERÊNCIAS	52
	APÊNDICE A – ARTIGO ORIGINAL.....	62
	APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	83
	APÊNDICE C – FICHA CLÍNICA.....	86

1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 INTRODUÇÃO

A gota é uma das principais causas de artrite inflamatória, sendo a causa mais frequente de artrite de causa metabólica e inflamatória em homens acima de 40 anos, com uma incidência que varia de 0,1 a 1%, atingindo a maior frequência em homens em idade adulta nos países ocidentais (1), numa proporção de 3 a 4 homens para 1 mulher (2).

É causada pela deposição articular de ácido úrico, especialmente quando da formação de novos cristais (síntese “*de novo*” de ácido úrico) (3). O ácido úrico, produto do metabolismo das purinas (ATP, GTP e ácidos nucleicos), geralmente precipita-se em concentrações maiores que 6,8mg/dl. Em situações em que haja aumento de produção ou redução na excreção (renal ou extrarenal) deste metabólito, tais níveis são atingidos facilmente (4). Contudo, grande parcela dos indivíduos hiperuricêmicos não desenvolve a doença; a prevalência de hiperuricemia na população geral é em torno de 20%, ao passo que a prevalência de gota é de, em média, 1 a 2% da população geral, chegando a 5,9% na população masculina (5). Para indivíduos provenientes da mesma população, o risco para o desenvolvimento da gota parece ser maior em indivíduos de origem africana quando comparado àqueles de ascendência caucasiana (5). Porém em um estudo retrospectivo avaliando fatores de risco para o desenvolvimento de gota, Krishnan encontrou menor risco para a presença de hiperuricemia e gota entre negros americanos, quando comparado a caucasianos (6).

Enquanto répteis e pássaros excretam nitrogênio na forma de ácido úrico, mamíferos eliminam o nitrogênio na forma de uréia. Nos mamíferos, a persistência de níveis baixos do ácido úrico sérico (abaixo de 2mg/dL) deve-se à presença da uricase, enzima de degradação do ácido úrico. Porém, vários primatas, incluindo os humanos, perderam a capacidade de produzir uricase, elevando os níveis de ácido úrico sérico para cerca de 6-7mg/dL (7). Uma possível explicação para a maior uricemia em primatas bípedes seria uma maior necessidade de manutenção dos níveis de pressão estáveis pela permanência na posição ortostática - como há relação entre níveis cronicamente elevados de ácido úrico com maiores níveis

tensionais, acredita-se que tal perda ocorreu evolutivamente (8).

1.2 REVISÃO HISTÓRICA

Como nos répteis e aves, sujeitos à gota por serem grandes produtores de ácido úrico, o aumento da uricemia não ocorreu sem consequências para os humanos. As primeiras evidências da doença datam de mais de 4000 anos, em corpos mumificados do antigo Egito, e há em papiros (papiro de Eber) com mais de 3000 anos, a descrição de tratamento para uma afecção que causava dor e inflamação no primeiro dedo do pé, possivelmente gota (7). Em 400 a.C., Hipócrates fez a primeira descrição do quadro clínico da gota tofácea. Desde então, até a primeira metade do século passado, a gota era considerada doença de abastados, uma condição “auto inflingida”, punição merecida pelos excessos cometidos, como bem ilustrado na obra de Thomas Rowlandson (**Figura 1**), um verdadeiro cronista visual de sua época. Há descrição histórica de “epidemias” de gota entre a aristocracia do Império Romano, várias descrições de casos entre nobres europeus da Idade Média e entre inúmeros membros do Clero e da burguesia na sociedade industrial (9). O termo “gota” surgiu derivada do latim “*gutta*”(gota) por volta de 1200 D.C. em descrição feita pelo monge dominicano Randolphus Bocking, em referência aos humores em desequilíbrio que invadiam as articulações, como se acreditava desde a Grécia antiga (10).

Em 1683, Thomas Sydenham descreveu em detalhes os aspectos clínicos e características epidemiológicas da doença, já sendo percebida, na época, a forte associação com hábitos dietéticos. A presença de cristais em tofos foi descrita em 1679 por Antonie van Leeuwenhoek, um dos pioneiros da microscopia, porém a composição dos cristais era desconhecida na ocasião, e foi apenas em 1797 que Woolaston demonstrou a presença de ácido úrico em seus próprios tofos (9, 10). Em 1848, foi estabelecida a relação causal entre a hiperuricemia e os depósitos de urato e a gota por Sir Alfred Barring Garrod (11). Mas foi apenas em 1961 que foi descrita, por McCarthy e Hollander, a presença de cristais de monourato de sódio no líquido sinovial de pacientes gotosos (12). Assim, há mais de um século o ácido úrico, na forma de monourato de sódio (MSU), é reconhecido como causa da doença (11), e sua patogenia foi descrita há pelo menos meio século (13, 14), com os mecanismos

“macroinflamatórios” bem reconhecidos: a descrição anatomopatológica da artrite gotosa demonstrando a presença de macrófagos englobando (*fagocitando*) cristais de ácido úrico e o característico infiltrado neutrofílico.

Figura 1 – *The Comforts of Bath: Gouty Gourmand at Dinner* por Thomas Rowlandson.



Fonte: *At Home: A Short History of Private Life*, Bill Bryson.

1.3 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

Os níveis de ácido úrico persistentemente elevados geram depósitos articulares em ossos e cartilagens e em tecidos periarticulares, como ligamentos e tendões. Esses depósitos, a princípio subclínicos, podem desencadear o processo inflamatório levando às manifestações clínicas da gota. A doença caracteriza-se por um processo inflamatório agudo intenso, com dor, edema e hiperemia acentuados, com crises que duram tipicamente de 7 a 10 dias e ocorrem de forma intermitente (15). Ocorrem, habitualmente, períodos intercríticos de duração variável, em que os indivíduos acometidos ficam livres de sintomas a despeito da presença de depósitos de ácido úrico. Na fase crônica da doença, contudo, comumente apaga-se a distinção entre os períodos crítico e intercrítico, havendo um processo inflamatório mais persistente, porém muitas vezes de menor intensidade (4).

No início do quadro, a maior parte dos casos apresenta-se como uma mono ou oligoartrite periférica, que tem predomínio pelos membros inferiores, acometendo especialmente a primeira articulação metatarsofalangeana (a podagra – que chega a atingir 90 % dos pacientes ao longo da evolução da doença), podendo ainda acometer outras metatarsofalangeanas, tarso, tornozelo, joelhos e menos comumente punho, metacarpofalangeanas e cotovelos. A artrite se não for tratada resolve-se espontaneamente em média entre 3 e 14 dias e o intervalo entre as crises é bastante variável, podendo durar de dias a anos, mas geralmente diminui com a transição para o estágio crônico (4).

No período intercrítico, apesar de livre de sintomas, pode haver progressão do dano radiológico, indicando a persistência de atividade inflamatória subclínica (16). Com a cronificação da doença, aumenta a frequência das crises e modifica-se o padrão, mais frequentemente poliarticular e assimétrico. A distribuição pode variar, com aumento na frequência do acometimento de metacarpofalangeanas e grandes articulações dos membros superiores, embora ainda predominem as articulações distais de membros inferiores. Com o tempo de doença e menor controle da uricemia, aumenta a frequência da presença de tofos (depósitos de cristais de ácido úrico em matriz proteinácea, rodeados por infiltrado inflamatório intenso) (17). Os principais sítios de acometimento são bursa prepatelar, helix, bursa olecraniana, tarso, primeira metatarsofalangeana e inserções de tendões como tendão aquileu e quadricipital e canto pósterolateral (inserção dos gastrocnêmios e biceps crural).

1.4 DIAGNÓSTICO

Para o diagnóstico da gota, os critérios utilizados são ainda os critérios do *American College of Rheumatology* (ACR), de 1977 (**Figura 2**), e o padrão ouro é ainda a visualização direta de cristais de ácido úrico no líquido sinovial (18). Esforços vem sendo realizados no sentido de atualizar os critérios, de acordo com novas tecnologias vigentes e maior conhecimento acerca da doença, permitindo maior sensibilidade e especificidade. Contudo, novos critérios propostos ainda aguardam validação (19, 20).

A gota tem relação com doenças como *diabetes mellitus* (DM), hipertensão arterial sistêmica (HAS) e doenças cardiovasculares, dislipidemia e obesidade (21).

A própria a hiperuricemia faz parte da síndrome metabólica e é considerada como fator de risco cardiovascular isolado (22). Há estudos que demonstram associação da hiperuricemia com progressão da HAS e de piora da função renal (22). Considera-se que isto pode ocorrer pela elevação persistente de fatores inflamatórios, como citocinas pró-inflamatórias (23).

Figura 2 – Critérios de classificação de gota

Critérios de classificação de gota (ACR 1977) (18)
Presença dos cristais de urato no líquido sinovial <u>OU</u> Tofos com presença comprovada dos cristais <u>OU</u> Presença de 6 das 12 características clínicas, laboratoriais ou radiográficas abaixo:
1. Mais de uma crise de artrite 2. A inflamação máxima se desenvolve em 1 dia 3. Artrite monoarticular 4. Eritema articular observado pelo médico 5. Primeira metatarsofalangeana dolorosa ou edemaciada 6. Ataque unilateral envolvendo a 1a. metatarsofalangeana 7. Ataque unilateral envolvendo a articulação tarsal 8. Suspeita de tofo 9. Hiperuricemia 10. Edema assimétrico articular (radiografia) 11. Cistos subcorticais sem erosões (radiografia) 12. Cultura do líquido sinovial negativa

1.5 GOTA E IMUNIDADE

1.5.1 Imunidade inata

O sistema imune é dividido em dois grandes sistemas interconectados em vários pontos. Primeiro, a imunidade adaptativa - que gera resposta específica e associada à memória a determinado patógeno através de seus componentes humoral e celular. Segundo, a imunidade inata - que gera resposta imediata e independente de contato prévio através de barreiras físico-químicas (como pele, mucosas, lisozimas e determinados ácidos graxos) e do reconhecimento de padrões moleculares “genéricos” com subsequente fagocitose e desencadeamento de processo inflamatório local. A disfunção dos sistemas de reconhecimento e dos mecanismos de controle de resposta tanto na imunidade humoral quanto na inata é capaz de induzir a estados inflamatórios persistentes, com subsequente geração de processos patológicos (24).

Na imunidade inata o componente celular é representado por macrófagos, células dendríticas, monócitos, células endoteliais, fibroblastos, fibrócitos, além de células NK, linfócitos gama delta e granulócitos. Várias destas células tem função apresentadora de antígenos, uma ponte chave entre o sistema inato e o adaptativo. Fatores biologicamente ativos como complemento, citocinas, quimiocinas e imunoglobulinas naturais, proteínas de fase aguda e espécies reativas de oxigênio (*ROS- reactive oxygen species*) também participam da imunidade inata (25, 26).

Uma das características da imunidade natural é a reação ao reconhecimento de padrões moleculares (como por exemplo lipossacarídeos) que podem sinalizar inespecificamente a presença de patógenos (*pathogen associated molecular pattern* - PAMP) – ou dano celular (*damage associated molecular pattern* - DAMP). Tal reconhecimento é efetivado por uma gama de receptores não clonais, como, por exemplo, os *Toll-like receptors* (TRL) (27). Estes estão presentes em macrófagos, neutrófilos e células dendríticas. Além dos TRL's, destacam-se os *NOD like receptors* (NRL), que são respectivamente receptores celulares e citosólicos, e que podem ativar células da imunidade inata. Os NRL's atuam gerando ativação celular, provocando a transdução de proteínas ligadas à imunidade inata, levando, assim, à produção de citocinas, entre outras proteínas envolvidas no processo inflamatório

(28). Outros receptores, como receptores de frações do complemento, citocinas, interleucinas e imunoglobulinas, são também importantes por sinalizar a resposta inflamatória e realizar a comunicação com a imunidade adaptativa (27, 29). A ativação de células da linhagem monocítica é dependente de receptores do tipo NLR, que fazem parte de uma estrutura macromolecular complexa, formada por vários domínios, denominada inflamassomo, que responde através da produção do pirógeno endógeno IL-1 β (30).

Diversas moléculas sinalizam dano celular, a exemplo de algumas proteínas intracelulares e proteínas derivadas da matriz extracelular que sinalizam injúria tissular. O ácido úrico, purinas, ATP e DNA são também sinalizadores de lesão celular quando presentes no meio extracelular (31). A sinalização de dano ativa a fagocitose e inicia o processo inflamatório, responsável pela depuração dos debris celulares e ativação imunológica contra possíveis patógenos causadores de dano. Além de importante sinalizador de dano, o ácido úrico tem função de adjuvante, reforçando a atividade inflamatória e estimulando a ativação da resposta específica na presença de moléculas antigênicas (32).

Várias citocinas são importantes no sistema imune inato. Entre elas TNF- α , IL-1, IL-6, têm papel central na gênese do processo inflamatório. A IL-8 e o interferon- γ agem atraindo neutrófilos e ativando fagócitos respectivamente, enquanto a IL-10 parece ter ação no controle do processo inflamatório ao inibir os macrófagos. A relação entre citocinas pró-inflamatórias e o processo inflamatório na gota será abordado mais adiante.

Por sua atividade inflamatória ser dependente de hiperfunção do processo inflamatório, a gota vem recentemente sendo considerada uma doença autoinflamatória desencadeada por mecanismos primários associados à imunidade inata (33). A presença dos cristais de MUS desencadearia uma disfunção nos mecanismos regulatórios da inflamação, gerando excesso de atividade dos inflamassomos. Estes, quando ativados desencadeariam em cascata a produção de diversas citocinas, quimiocinas e outros mediadores, culminando no conhecido processo inflamatório gotoso, caracterizado por acentuado infiltrado neutrofílico intra-articular com a presença de fagocitose dos cristais durante os períodos de exacerbação (34).

Defeitos na codificação de proteínas da imunidade inata podem gerar distúrbios auto-inflamatórios como a febre familiar do Mediterrâneo e as criopirinopatias (doença inflamatória multi-sistêmica de início neonatal, síndrome de Muckle-Wells e síndrome autoinflamatória familiar associada ao frio) (33). O ponto de disfunção pode estar relacionado à ativação do inflamassomo (mutações na codificação do TRL/NRL) ou à codificação das próprias proteínas do inflamassomo NPRL3. Em ambos os casos, ocorre excesso da produção de IL-1 β e subsequente resposta inflamatória inapropriada com sintomas inflamatórios sistêmicos (35). Na gota, a resposta inflamatória hiperaguda que ocorre em resposta à presença de cristais de ácido úrico também é associada a excesso da atividade do NLRP3 e consequente hiperprodução de IL-1 β , o que fez com que fosse considerada uma *doença auto-inflamatória* de origem metabólica. Na **Figura 3** estão ilustradas as principais características de ativação imune relacionadas ao processo inflamatório na gota.

1.5.2 Imunidade adaptativa

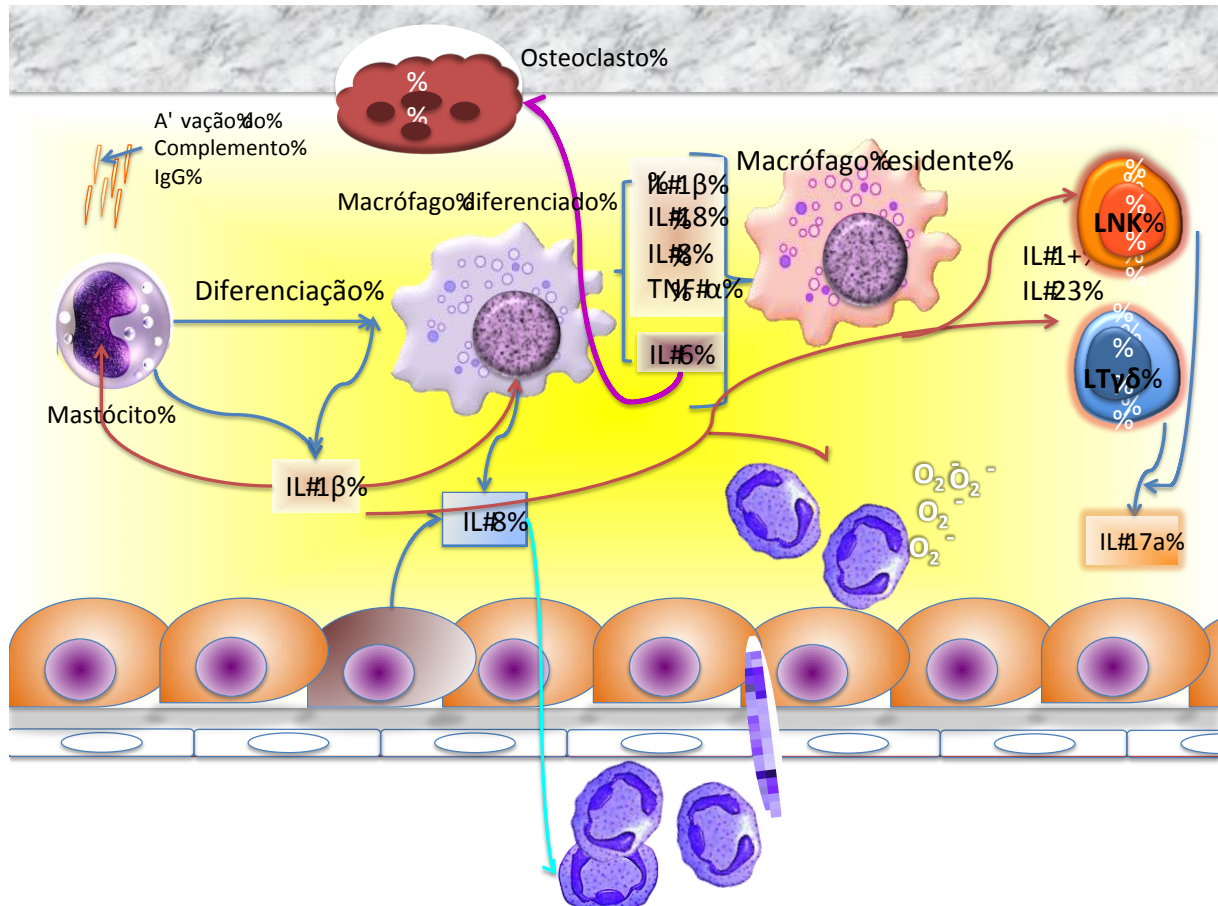
O monourato de sódio é capaz de estimular a resposta imune funcionando como adjuvante. Ao ser liberado para o meio extracelular após apoptose, necrose ou lesão tecidual, este metabólito seria capaz de ativar as células apresentadoras de antígenos, exacerbando a resposta imune a outros antígenos presentes na região da lesão celular (36). Além disso, alguns estudos demonstram que o ácido úrico pode ativar células T (tanto células CD4+ quanto CD8+) de sem a dependência da presença de células apresentadoras de antígenos. E ainda que as células T ativadas por MUS expressam CD70 que é importante na interação entre células T e B. Assim poderia ocorrer redução do limiar para a ativação de células T, perpetuando o processo inflamatório (37). Em concordância, alguns estudos experimentais demonstram maior capacidade de rejeição a células tumorais na presença de concentrações elevadas de ácido úrico (38). Entretanto, na prática clínica isto não se confirma, visto que há maior incidência de câncer entre pacientes portadores de gota (39).

Nos casos de gota tofácea crônica, possivelmente a imunidade adaptativa tem um papel mais relevante. A presença de linfócitos T (CD4+ e CD8+), B e

plasmócitos no interior de tofos (onde ainda identifica-se a presença de macrófagos e mastócitos) é um indício da participação da imunidade adaptativa na gota (17). O mesmo achado foi confirmado por Lee e colaboradores em 2011 (40), que identificaram a produção de IL-1, IL-6, TNF-alfa produzidos pelas células mononucleares infiltrantes e de RANKL (*receptor activator of nuclear factor B ligand*) expressou-se nas células T. Em cultura de células, Lee demonstrou expressão de RANKL tardia em células T, com pico 72h após a estimulação com MUS. O mesmo grupo vincula, ainda, a osteoclastogênese à presença necessária de células T em culturas de monócitos derivados do líquido sinovial. Lai, em 2013, relatou a presença predominante de células T, células gigantes multinucleadas e macrófagos em fragmentos teciduais de pacientes portadores de gota. Encontrou em menor proporção a presença de células B, plasmócitos e neutrófilos nestes fragmentos. O grupo relata correlação entre a presença tecidual de células T e B com hipertensão (41).

Sabe-se de longa data que cristais de ácido úrico são imunogênicos e são recobertos por anticorpos da classe IgG, IgM e IgA no interior de tofos (42). E que os anticorpos da classe IgG podem nuclear o monourato de sódio, estimulando a precipitação de cristais(43, 44).

Figura 3 – Esquema simplificado da atuação das citocinas pró-inflamatórias na gota.



Fonte: Autor.

1.5.3 IL-1β e inflamassomo

A IL-1 pertence a um grupo que congrega características de mecanismo de origem, estrutura de receptores e vias de sinalização similares: a família da IL-1, que inclui a IL-1α e IL-1β, o inibidor do receptor da IL-1 (IL-1Ra), dois receptores (IL-1R tipo I, biologicamente ativo e IL-1R tipo II, biologicamente inativo) e uma proteína acessória ao receptor IL-1RAcP. Este grupo engloba ainda os subgrupos da IL-18 e da IL-33 (45, 46). Todas as três principais citocinas são sintetizadas sob a forma de precursores inativos, e clivadas, gerando as formas biologicamente ativas que são liberadas para o meio extra celular. As três citocinas compartilham a caspase-1 como principal enzima de clivagem (47).

IL-1β: É uma citocina pró inflamatória, produzida em diversas células mononucleares como fibroblastos, macrófagos, mastócitos, células da glia e schwannócitos. Essa citocina tem importantes funções reguladoras na homeostase do

organismo, porém quando presente em elevadas concentrações, seria a principal citocina envolvida na inflamação (mediador inflamatório) (47).

Na gota a principal forma de produção ocorre principalmente em monócitos e macrófagos (de origem medular) ao passo que as células efetoras seriam as células locais, como demonstrado em modelo animal por Getting (48). O IL-1 β é produzido inicialmente na forma inativa: pró-IL-1 β . Após exposição de monócitos e macrófagos ao ácido úrico, a estimulação direta de receptores TRL ou NRL levaria à produção e liberação de pro-IL-1 β e oligomerização intracelular de complexos moleculares multi-protéicos denominados inflamassomos (49, 50).

Os inflamassomos agem, através de seus receptores NRL, como sensores intracelulares de padrões moleculares de dano, geradores de estímulo inflamatório, regulando ativação dos sistema de produção de IL-1 β e iniciando a cadeia inflamatória (49). O mais bem estudado e o que se sugere ter atuação central na patogênese da gota é o inflamassomo NLRP3, que parece ser também estimulado diretamente pelo ácido úrico, de modo independente da ação dos receptores TRL. Os cristais se ligariam ao inflamassomo, aumentando sua atividade. O NLRP3 cliva a caspase-1 ativando-a, como demonstrado por Martinon e colaboradores (50). A caspase, por sua vez, ativa a pró-IL-1 β à IL-1 β ativa. Subsequentemente a IL-1 β estimularia a produção de outras citocinas.

Após a clivagem, a IL-1 é secretada para o meio extracelular e pode então ligar-se a seu receptor na membrana celular. Através da sinalização por proteínas citosólicas, como o adaptador TRL MyD88 (fator de diferenciação mielóide 88) (51), ativa uma cascata de enzimas (cinases vinculadas ao IL-1R (51, 52) que induzem os fatores de transdução protéica nuclear (como por exemplo o NF-k β), iniciando-se então a transcrição de uma série de citocinas, quimiocinas, fatores de adesão e mediadores inflamatórios como anteriormente descrito (32).

Existem dois principais mecanismos de auto regulação que limitam a hiperfunção da IL-1: A presença do receptor inativo IL-1RII, que permanece na membrana celular competindo pela ligação com a IL-1; e a IL-1Ra que se liga fortemente a IL-1R, porém é incapaz de ativá-lo (23).

A IL-1 parece ter um papel central na instalação da resposta inflamatória na gota. Estudos demonstraram a produção de IL-1 β após a sensibilização de macrófagos, monócitos e células dendríticas com ácido úrico in vitro (52) ou em

modelos experimentais de gota (artrite induzida em ratos, peritonite induzida por ácido úrico ou *air-pouch model* – modelos que simulam a composição celular da cavidade articular). Ocorre a acentuada redução no processo inflamatório desencadeado por cristais de ácido úrico na ausência dos receptores para IL-1 e na ausência da produção de IL-1, seja em ratos knock-out para o componente ASC do inflamassomo NLRP3 (ASC^{-/-}) ou deficientes em caspase-1 (caspase-1^{-/-}) (35, 53, 54).

Outras formas de produção do IL-1 β foram descritas, como a ativação por proteinases – metaloproteinases (stromelisina 1, gelatinase A e gelatinase B), quimiotripsina, tripsina, plasmina, proteinase 3 e elastase de neutrófilos, entre outras. A participação destas enzimas como conversoras de IL-1 β no processo inflamatório não está elucidado ainda, porém, sabe-se que o bloqueio (ou a ausência) da caspase ou do inflamassomo NLRP3 atenua o processo inflamatório em cerca de 50% (53-55).

Estudos experimentais demonstrando a redução do processo inflamatório com o uso de bloqueadores da IL-1 (anticorpos anti IL-1 e receptores solúveis) levantaram a questão da utilidade clínica deste bloqueio (56, 57). Estudos clínicos com anticorpos anti-IL-1 (canakinumab), receptores solúveis ligados a fração FC do anticorpo humano de IL-1 (IL-1- trap - *Target-Related Affinity Profiling* - rilonacept) e com bloqueadores dos receptores de IL-1 (anakinra) demonstraram resposta no controle do processo inflamatório, comprovando clinicamente os resultados experimentais obtidos (54, 56, 58-60).

1.5.4 IL-18

A IL-18 faz parte da família da IL-1 e é produzida também por clivagem de um precursor inativo, pela caspase-1 ativada pelo NLRP3. O precursor da IL-18 é expresso de forma mais universal que a IL-1, estando presente em células mononucleares do sangue periférico independente de estímulo prévio (47).

É uma citocina que se expressa em macrófagos, células dendríticas, células de Kupffer, queratinócitos, condrócitos, fibroblastos sinoviais, e osteoblastos. Também necessita de receptor (IL-18R). Tem propriedades imunorreguladoras e próinflamatórias. A IL-18 é particularmente importante no *clearance* de patógenos

intracelulares e vírus, via indução de IFN- γ , e de células T citotóxicas, respectivamente. A IL-18 amplifica a imunidade inata através do estímulo à produção de fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF - *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α – *tumor necrose factor alpha*), IL-1b e IL-8, entre outros. Aumenta a expressão de moléculas de adesão ao endotélio (principalmente VCAM-1), óxido nítrico, e é descrita resposta estimulatória à agregação neutrofílica(61). Tem propriedades quimioatratora de linfócitos T. Em conjunto com IL-12 e IL-15, aumenta a expressão de Interferon- γ (IFN γ) em linfócitos T, contribuindo para amplificação da resposta Th1 especialmente. Isoladamente ou em conjunto com IL-15 a IL-18 assume sua função imunorreguladora ao induzir atividade de células NK (47, 62). Estimula também a resposta TH17, através do estímulo à produção de IL-17 por células T conjuntamente com IL-23 (63). A IL-18 ainda inibe a síntese de proteoglicanos em condrócitos favorecendo o dano articular (61).

A IL-18 parece ter também papel na remodelação cardíaca associada à hipertensão e à disfunção miocárdica pós isquêmica. Por outro lado, a deficiência de IL-18 em ratos predispõe ao aparecimento de obesidade e tendência à intolerância à glicose (64).

Uma relação importante para o efeito patogênico da elevação da IL-18 é o desequilíbrio em relação aos níveis da sua proteína solúvel de ligação (IL-18BP – *binding protein*), um inibidor natural da IL-18. Esta proteína parece neutralizar a IL-18 quando em níveis equilibrados (65). Contudo, a relação entre a citocina e sua proteína de ligação não foi estudada em relação à gota ou hiperuricemia.

Na gota, a IL-18 foi estudada por Inokushi e colaboradores, que encontraram elevação de IL-18 no sangue periférico de pacientes de gota com artrite. O grupo realizou experimentos para avaliar a participação da IL-18 no processo inflamatório induzido por MUS. No modelo animal o grupo não encontrou aumento da expressão da IL-18 ao estímulo por monourato de sódio. Não encontrando também diferença na agregação neutrofílica em animais deficientes para IL-18, quando comparados a ratos controle (66). O papel da elevação da IL-18 na gota, portanto, ainda encontra-se em aberto.

1.5.5 IL-6

A IL-6 é uma citocina que agrega efeitos pró e anti-inflamatórios. A família da IL-6 inclui também a IL-11, IL-27, IL-30 e IL-31, além do fator de inibidor de leucemia, oncostatina M, fator inibidor ciliar, cardiotrofina-1, citocina cardiotrofina-like, neurotrofina estimulatória-1 e neuropoietina. A IL-6 liga-se ao receptor IL-6 (IL-6R transmembrana ou solúvel) e esse conjunto posteriormente liga-se ao receptor comum à toda a família- GP130. A expressão de IL-6R transmembrana é limitada à poucas células, porém a IL-6 é capaz de atuar sobre diversas células que não possuem o IL-6R mas possuem o GP 130 através da interação com seu receptor solúvel, isso faz que tenha uma ação ampla e variada sobre diversos grupos celulares (67).

A IL-6 é secretada por macrófagos teciduais e células T, com função pró-inflamatória pluripotente e é estimuladora da imunidade inata e adaptativa, é estimulador de hepatócitos e estimula a secreção de proteínas pró-inflamatórias e/ou sinalizadoras, como a PCR, fibrinogênio e proteína amilóide, tem papel na gênese da anemia da doença crônica ao estimular a produção de hepcidina e induz a diferenciação de linfócitos B e produção de imunoglobulinas. Do ponto de vista reumatológico seu papel na artrite reumatóide é bem conhecido e sua inibição faz parte do arsenal terapêutico estabelecido(68-70). O tecido sinovial é fonte e alvo desta citocina e ela tem ação sobre o metabolismo ósseo: Choe, em 2011 encontrou elevação sérica de IL-1, IL-6, do receptor solúvel de IL-6, RANK-L e osteoprotegerina em pacientes quando comparados a controle. Encontrou ainda associação negativa entre os níveis de receptor solúvel da IL-6 e alterações ósseas avaliadas radiograficamente em 50 pacientes de gota (71).

Sabe-se que a produção de IL-6 por monócitos e sinoviócitos é estimulada pelo ácido úrico (72), que na artrite gotosa há elevação dos níveis de IL-6 no líquido sinovial e possivelmente no soro (73, 74). Vários dos sinais inflamatórios sistêmicos da gota como produção de proteínas de fase aguda foram abolidos ao se administrar anticorpos anti-IL-6 em modelos experimentais de gota (72).

Estudos populacionais sugerem que o componente inflamatório (avaliado pelo aumento da PCR) que é associado à elevação dos níveis de ácido úrico - e que é

considerado como causa do aumento do risco cardiovascular que ocorre nestes pacientes - tem relação com a elevação de IL-6 (75).

1.5.6 IL-8

A IL-8 (ligante C-X-C) também conhecida como fator quimiotático de neutrófilos ou CXCL-8 é uma citocina quimiotática sobre neutrófilos, com função ativadora de diversas funções como a degranulação, mobilização de cálcio intracelular, adesão celular, produção de leucotrienos, atividade oxidativa, entre outras. É membro da superfamília das quimiocinas que inclui várias outras quimiocinas como a beta trombo globulina – bTG; os oncogenes relacionados ao crescimento (GRO) α , β e γ ; o peptídeo ativador de neutrófilos NAP-2; a proteína quimiotática de granulócitos GCP-2; o peptídeo ativador de neutrófilos derivado de células epiteliais ENA-78, entre outros (76).

É evidente a participação de fatores quimiotáticos de neutrófilos na gota, onde é sabido de longa data que a infiltração neutrofílica tem um papel dominante, geralmente com espaço temporal limitado, o que indica que existe um processo regulatório envolvido, assim, a investigação da presença de IL-8 no líquido sinovial é demonstrada em diversos artigos (15, 77). Sabe-se pouco sobre os fatores quimiotáticos envolvidos neste processo. A IL-8, em conjunto com C5a, o PAF (fator ativador de plaquetas) e o leucotrieno B₄ são os mais estudados, mas provavelmente vários outros fatores controlam o processo da migração neutrofílica (26). A IL-8 pode ser produzida por diversas células como fibroblastos (incluindo células sinoviais tipo B), monócitos (incluindo células sinoviais tipo A), macrófagos, células epiteliais, neutrófilos e células T ativadas (32).

O papel destas citocinas na gota vem sendo estudado há pelo menos duas décadas. A presença de neutrófilos em abundância no líquido sinovial levanta a suspeita de quimiocinas neutrofílica envolvidas no processo. De fato, ainda em 1991, Terkatab (78) atribui à IL-8 a função de fator quimiotático de neutrófilos derivado de monócitos na artrite gotosa, confirmando tal papel ao inibir a ativação neutrofílica bloqueando a IL-8. Em 1993 Harada (79) descreve a presença de IL-8 nas articulações acometidas por processo inflamatório agudo e bloqueia o processo

inflamatório neutrofílico através da administração de anti-IL-8 em várias condições inflamatórias experimentais, inclusive artrite induzida por IL-1.

Em 1995 Hachicha colaboradores descreveram o papel das citocina quimiotática (quimiocina) IL-8 (e afastaram a participação da Proteína Inflamatória de Macrófagos-1 alfa (MIP-1^a) - atualmente nomeada como CCL3 (chemokine [c-c motif] ligand 3). A IL-8 teria ação quimiotática predominante sobre neutrófilos, enquanto a CCL-3 teria ação quimiotática sobre leucócitos mononucleares e outros granulócitos não neutrófilos. O estudo demonstrou a produção de IL-8 por neutrófilos incubados com MSU, com ação sinérgica com a pré-ativação por fator de necrose tumoral-alfa (TNF α) e fator estimulados de colônias de granulócitos (GM-CSF). A produção de CCL3 não ocorreu quando os neutrófilos foram incubados com MSU mesmo com a pré-ativação por TNF α ou GM-CSF (embora ocorresse com TNF α isoladamente). A implicação sugerida é a do papel principal no recrutamento dos neutrófilos pelos próprios neutrófilos ativados inicialmente no processo inflamatório num processo de amplificação da resposta inflamatória. Os autores sugerem um possível envolvimento do MSU na inibição da produção de CCL3 em resposta ao pré estímulo de TNF α o que poderia explicar a relativa ausência de células mononucleares no processo inflamatório da gota (80).

Dois anos depois, Nishimura e colaboradores descreveram a participação da IL-8 no processo quimiotático ao desencadear experimentalmente artrite induzida por MSU em coelhos, evidenciando a correlação temporal com a elevação local de IL-8 precedendo a infiltração neutrofílica, o que comprovaram ao reduzirem de forma significativa o processo inflamatório através da administração local de anticorpo neutralizante anti-IL-8 conjunta ao MSU (81). Estudos em pacientes de gota demonstram a elevação do nível sérico (66, 82, 83) e articular de IL-8 em pacientes portadores de gota durante a vigência do processo inflamatório (84, 85). Em 2010, Martin comprovou o papel da IL-8 na hiperprodução de superóxido por neutrófilos ativados in vitro por MUS em de seu papel em conjunto a IL-6 e TNF alfa na sobrevivência dos neutrófilos ativados, e avaliou ainda a produção de citocinas produzidas por monócitos estimulados por MUS, demonstrando hiperprodução de IL-1 β , IL-6, IL-8, e TNF- α . Neste estudo, os níveis séricos de IL-6, IL-8 e TNF- α mostravam tendência a elevação em pacientes portadores de gota e hiperuricêmicos quando comparados a controles (83). Porém existem evidências de que a IL-8 não

estaria sozinha na tarefa de atrair neutrófilos ao foco inflamatório. Vários trabalhos tentam desenredar a intrincada rede de citocinas que culmina no infiltrado característico e demonstram participação de múltiplas citocinas, quimiocinas e proteínas de origem mielóide, envolvidas no processo de atração e ativação de neutrófilos, como C5a, leucotrieno B₄, oncogenes reguladores de crescimento tecidual, fosfocolina, fator ativador de plaquetas, proteínas macrofágicas inflamatórias (MIP)-1 α /CCL3, MIP-2/CXCL2, MCP-1 e KC/CXCL1, entre diversos outros (32, 86-88). Contudo o papel destes especificamente na gota ainda necessita de maiores investigações.

1.5.7 IL-17A

A IL-17A pertence à família IL-17 que inclui ainda a IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (também denominada IL-25), e IL-17F (estrutural e funcionalmente similar a IL-17A), além de seu receptor, IL-17R (89).

O mais importante representante da família, a IL-17A, é considerada um eficaz indutor/mediador de resposta inflamatória, envolvida principalmente na resposta Th17 mediada por linfócitos T helper17 (Th17), célula esta que é sua maior fonte de produção. Possui atividade enquanto mediador da imunidade adaptativa, porém também possui papel relevante enquanto mediador da imunidade inata – sendo produzida por outras células da imunidade inata como células $\gamma\delta$ T, células indutoras do tecido linfóide. Estas podem rapidamente reagir a determinados antígenos através da expressão de TLR's, iniciando uma resposta imune através da produção de mediadores imunorregulatórios. É produzida também por células T natural killer, macrófagos e células de Paneth. É bem reconhecido seu papel no combate precoce a infecções fúngicas e bacterianas e micobacterianas (89).

IL-17A promove a secreção de citocinas e quimiocinas próinflamatórias; induz o recrutamento de neutrófilos e macrófagos para o local da infecção/inflamação; a secreção local de proteínas inflamatórias e promove a produção de metaloproteinases da matriz, levando a degradação de proteínas estruturais da matriz cartilaginosa. Estimula a produção de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e outros fatores angiogênicos levando à hipervascularização local especialmente nas artrites crônicas. Seu receptor é expresso em células como

macrófagos, neutrófilos, células epiteliais, fibroblastos além dos próprios linfócitos (89, 90).

A IL-17A atua como um dos mediadores envolvidos na patogênese da artrite reumatóide – onde sua elevação de forma sustentada está relacionada a lesão da cartilagem, erosões ósseas, e ativação de osteoclastos, estando diretamente envolvida na progressão de artropatias erosivas como a AR, como demonstrado por diversos estudos (90-92). Atua no balanço negativo do metabolismo ósseo, estimulando a diferenciação e ativação de osteoclastos estimulando a produção de RANK-L e ativação de RANK, em detrimento da osteoprotegerina, além de reabsorção óssea direta induzida por monócitos independente de osteoclastos. Processo que culmina com a osteopenia e erosões ósseas observadas na artrite reumatóide e em outras doenças inflamatórias como a própria gota (93-95). Está envolvida também em respostas de hipersensibilidade tardia. Promove ativação e maturação de neutrófilos (é indutora da produção de G-CSF e IL-8/CXCL2), além de induzir a produção de outras citocinas e quimiocinas como IL-6, GM-CSF, IL-1 β , TGF- β , TNF- α e GRO- α , e MCP-1 e prostaglandinas (89).

Lalor demonstrou, sequencialmente, que a IL-1 é necessária para a produção de IL-17 e que age em sinergia com a IL-23 promovendo a produção de IL-17 por células T gamadelta (produtoras de IL-23) em resposta ao estímulo pela IL-1, sem a participação de receptores T antígeno-específicos (96, 97). A IL-18, da família da IL-1, também produzida pela caspase-1 via inflamassomo, pode participar como cofator estimulador sinérgico a IL-23 tal qual a IL-1, como demonstrado por Lalor. Sugerindo que para o bloqueio da ação da IL-17 a intervenção sobre a caspase ou o inflamassomo podem ser melhores alvos terapêuticos que a inibição direta da IL-1 (98). Doisne avaliou a produção de IL-17 por células Natural Killer (NK) via estímulo sinérgico IL-18 / IL-23, que ocorreria precocemente e sem participação de receptores específicos, como mecanismo da imunidade inata (99). Empson, revisa as funções das células NK e hipotetiza um papel destas células no controle da atividade inflamatória na gota (100). Já foi demonstrada a ativação direta de linfócitos T pelo ácido úrico (37), o que poderia estar envolvido diretamente na produção de IL-17 associada ao ácido úrico, contudo, não foram avaliados linfócitos T helper ou células NK neste estudo, e tal hipótese ainda permanece em aberto.

Conforti-Andreoni, em 2011, demonstraram *in vitro* e *in vivo* utilizando células dendríticas pré sensibilizadas por ativadores do NF- κ B (dipeptídeo muramíl - MDP) que os cristais de ácido úrico são capazes de estimular a polarização Th17 em linfócitos CD4, gerando a produção por estes de IL-17. A presença do estímulo de cristais de ácido úrico agiria por via da consequente produção de IL-1 e IL-18 pelo inflamassomo, sem a qual ocorreria aumento na produção de IFN γ e IL-4, indicando talvez um favorecimento da polarização Th1/Th2 (63).

Uma recente revisão de Ferraccioli e Zizzo defende o envolvimento das células Th17 na progressão de uma inflamação base, inicial, mediada pela imunidade inata, para a inflamação crônica, autoimune e dificilmente reversível da AR (101). Um mecanismo similar poderia estar envolvido na “cronicificação” da gota.

1.5.8 IL-22

A IL-22, outra citocina potencialmente envolvida em processos inflamatórios articulares, é uma citocina da família da IL-10, em conjunto com IL-10, IL-19, IL-26, IL-28a, IL-28b e IL-29. É produzida por linfócitos T ativados (principalmente da linhagem CD4 e linfócitos diferenciados TH1) e linfócitos T gamadelta e TH17, além de células NK e dendrócitos. Seu receptor é o IL-22R1, expresso no tecido sinovial, células epiteliais em mucosas e trato respiratório, onde a IL-22 atua exacerbando resposta da imunidade inata através do estímulo à produção e liberação da proteína 1 quimiotática para monócitos (92, 102).

Experimentos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que, no sistema músculo esquelético, atua induzindo a proliferação dos fibroblastos sinoviais, formação de pannus sinovial e induzindo à lesão óssea, através a promoção à osteoclastogênese (102, 103).

Na gota o papel da IL-22 ainda não foi estudado, mas diante de seu papel regulador da inflamação na via inata da imunidade em conjunto com a IL-17, e de sua função na proliferação sinovial e osteoclastogênese, torna-se uma importante citocina a ser investigada nesta patologia.

1.5.9 IL-23

A IL-23, faz parte da família da IL-12 que engloba além destas a IL-27 e IL-35. É um heterodímero formado por duas subunidades (P19 e P40), produzido por dendrócitos e macrófagos ativados. Tem papel pró inflamatório, estimulando a produção de interferon- γ por células T na imunidade adaptativa. Porém o principal efeito de interesse em relação à gota seria a capacidade de estimular a IL-17 em linfócitos Th17 em sinergia com a IL-1, e no controle de processos de inflamação crônica (97, 104, 105). Contudo não há estudos que evidenciem seu papel diretamente no processo gotoso.

1.6 JUSTIFICATIVA

Historicamente a gota vem sendo relegada a segundo plano do ponto de vista médico, do ponto de vista da pesquisa científica e ainda do ponto de vista social. Há evidente subestimativa de seu elevado custo sócio-econômico – foi durante séculos considerada doença restrita aos abastados. Porém após a revolução industrial e com o maior acesso a bens de consumo e a uma alimentação mais rica em purinas, a doença é cada vez mais prevalente na população (5). A existência de poucas possibilidades terapêuticas para o tratamento desta doença, - o que ainda é uma verdade em nosso meio - e a dificuldade de tratar uma patologia associada a hábitos nutricionais e sociais, levou a um desinteresse do meio médico sobre o assunto. Porém, vários fatores contradizem esta postura: o aumento da prevalência da doença, a percepção da hiperuricemia e da gota como associados em um processo inflamatório sistêmico mais amplo que gera aumento do risco cardiovascular e ainda o reconhecimento de que a gota tem custo econômico direto e indireto muito elevado (106).

Em uma era em que começamos a entender os mecanismos genéticos e moleculares em diversas artropatias inflamatórias complexas, e a tratá-las de acordo com tal conhecimento, manter uma doença de etiologia conhecida no obscurantismo molecular seria uma forma de negligência a nossos pacientes. Assim, embora tenham sido identificados em pacientes com gota em 1700 (107) e tenham sido apontados como agente causal em 1899 (108), os mecanismos pelos quais os

cristais de MUS precipitam ataques de inflamação aguda só recentemente começaram a ser compreendidos (109).

Alçar uma ponte entre dados clínicos e sinais moleculares relacionados ao processo inflamatório na gota pode trazer informações significantes, não apenas sobre a patogenia da gota, mas também sobre o funcionamento do sistema imune e suas disfunções. Acreditamos que as informações obtidas com este estudo são importantes como fonte de conhecimento básico à respeito de processo inflamatório da gota, mas sobretudo, que o conhecimento acerca dos mediadores bioquímicos do processo inflamatório pode gerar informações importantes para o desenvolvimento de novas opções terapêuticas.

1.7 OBJETIVOS

1.7.1 Geral

- Avaliar o perfil de citocinas pró-inflamatórias em pacientes portadores de gota.

1.7.2 Específicos

- Comparar os níveis de IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-17A, IL-18, IL-22, IL-23 em pacientes com artrite gotosa, período intercrise e grupo de comparação.
- Avaliar a relação entre os níveis de IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-17A, IL-18, IL-22, IL-23 e dados clínicos como idade, tempo de doença, presença de comorbidades como HAS, DM e DLP em pacientes com gota e grupo de comparação.
- Avaliar a relação entre os níveis de IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-17A, IL-18, IL-22, IL-23 e tratamento realizado entre os pacientes portadores de gota.
- Avaliar a relação entre os níveis de IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-17A, IL-18, IL-22, IL-23 e dados laboratoriais como VHS, PCR, dosagem sérica do ácido úrico em pacientes com gota e grupo de comparação.

1.8 HIPÓTESE

Existe associação entre a atividade clínica na gota e mediadores pró-inflamatórios.

1.9 MÉTODOS

1.9.1 Delineamento do estudo

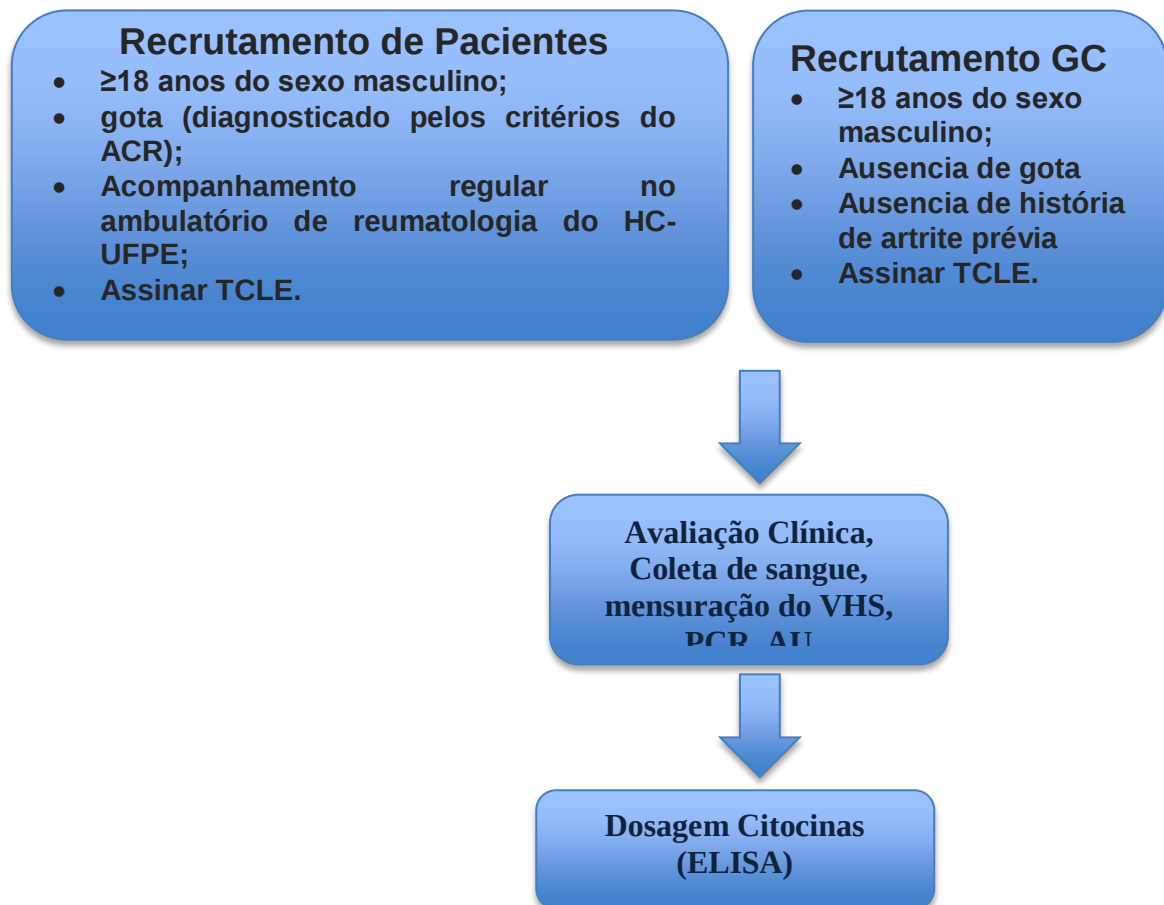
Estudo de corte transversal, observacional, de base hospitalar, com grupo de comparação, delineado conforme esquema apresentado na Figura 4.

1.9.2 Local de realização do estudo

Estudo realizado no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC-UFPE), em cooperação com o Núcleo de Pesquisas em Inovação Terapêutica Suely Galdino – NUPIT SG, durante o período de 06/08/13 a 10/06/14.

A avaliação clínica dos participantes e a coleta de material biológico foram realizadas no ambulatório de gota do Serviço de Reumatologia do HC-UFPE, onde foi realizada a coleta dos dados através de ficha clínica específica para este estudo.

Figura 4 - Delineamento do estudo.



1.9.3 População do estudo

Foram selecionados pacientes portadores de gota do serviço de reumatologia do HC-UFPE, de acordo com os critérios do *American College of Rheumatology (ACR)*, para compor o grupo gota (GG).

O grupo de comparação (GC) foi composto por voluntários sem história clínica ou diagnóstico de gota, sem relato de artrite prévia, que não apresentavam nenhuma doença reumatológica ou estavam em uso de imunossupressores. Os indivíduos do GC foram selecionados, aleatoriamente, entre acompanhantes de paciente do Hospital das Clínicas, HC-UFPE, que concordaram em participar do estudo.

Pela baixa frequência de mulheres entre os portadores de gota em nosso ambulatório foram incluídos apenas indivíduos do sexo masculino.

1.9.4 Critérios de inclusão e exclusão

1.9.4.1 Critérios de inclusão:

- Idade acima de 18 anos;
- Ser portador de gota, diagnosticado de acordo com os critérios do *American College of Rheumatology* (ACR)
- Estar em acompanhamento regular no ambulatório de reumatologia do HC-UFPE.

1.9.4.2 Critérios de exclusão:

- Não consentimento em participar do estudo;
- Ser portador de outra condição clínica que cause hiperuricemia, como doenças mieloproliferativas, anemia hemolítica, psoríase, sarcoidose, insuficiência renal aguda ou crônica com clearance <30 , intoxicação alcoólica, cetoacidose diabética, acidose láctica, doença por depósito de glicogênio tipo I, hipo e hiperparatireoidismo e infecções concomitantes.

1.9.5 Tamanho da amostra e técnica de amostragem

A amostra foi censitária. Foram avaliados todos os pacientes atendidos no ambulatório durante o período de estudo, incluídos de acordo com os critérios de inclusão e exclusão.

1.9.6 Definição e categorização das variáveis

1.9.6.1 Avaliação clínica

A partir da seleção, os pacientes elegíveis foram convidados a participar do estudo e realizada a leitura e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (APENDICE B). Após a assinatura do documento, foi realizado o preenchimento da ficha clínica do estudo (APENDICE C) composta pelas variáveis

de interesse. Para análise, os pacientes portadores de gota foram divididos em dois grupos:

- Gota ativa: definida pela presença de artrite em paciente com gota aguda ou crônica associada ou não à presença de tofos,
- Período intercrise: período totalmente livre de sintomas em paciente com diagnóstico confirmado de gota.

1.9.6.2 Avaliação laboratorial

Após avaliação clínica, foram coletados amostras de cerca de 10 ml de sangue em veia periférica em tubo seco com gel e 1 ml em tubo com citrato de sódio para realização da VHS (BD bioscience). Mensuramos a VHS através do método de Westergreen, logo em seguida à coleta e o restante do material biológico coletado foi separado por centrifugação a 10000 rpm por 10 minutos e armazenado em freezer com temperatura a -80°, localizado no Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT) para posterior quantificação das citocinas através de ELISA sanduíche (*Enzyme-linked immunosorbent assay*).

- Foi realizada a análise da PCR – método quantitativo - por nefelometria (valor de referência normal até 8mg/l).
- A mensuração do nível sérico de ácido úrico foi feita por método enzimático colorimétrico automaticamente em leitor Beckman Coulter (valor de referência normal 3.5 – 7.2 mg/dl).

1.9.6.3 Dosagem de citocinas

As citocinas presentes no soro dos pacientes e dos controles foram quantificadas por ELISA sanduíche (*Enzyme-linked immunosorbent assay*), seguindo protocolo recomendado pelos fornecedores. A técnica básica consiste em sensibilização da placa de 96 poços por 12h a -4°C (Nunc, Roskilde, Dinamarca) com o anticorpo policlonal de captura, específico para a citocina estudada, seguida respectivamente de bloqueio dos sítios inespecíficos com albumina sérica bovina (BSA), aposição dos padrões das citocinas em diluições sequenciais de concentrações conhecidas e das amostras (soros de pacientes e controles), anticorpo de detecção – IgG

específica para a interleucina estudada, anticorpo IgG conjugado com enzima e substrato (HRP-avidina e tetrametilbenzidina – TMB respectivamente). Entre cada fase a placa é lavada para retirada de possíveis resíduos. Após o tempo de reação colorimétrica esta é interrompida com ácido sulfúrico (H_2SO_4) e procede-se à leitura com absorvância de 450 e 570nm. Os Kits para dosagem de citocinas utilizados foram: IL-1 β - BD bioscience, IL-6 - BD bioscience, IL-8 – eBioscience, IL-17A – eBioscience, IL-22 - R&D bioscience, IL-23 – eBioscience. Os limites de detecção foram: 1,95pg/ml para IL-1 β , 4.69 pg/ml para IL-6 , 1.95pg/ml para IL-8, 3.91 pg/ml para IL-17A, 46.875pg/ml para IL-18, 15.625pg/ml para IL-22 e 15.625pg/ml para IL-23.

1.9.7 Análise estatística

Inicialmente as variáveis categóricas foram analisadas em termos de distribuições de frequências e as variáveis contínuas foram submetidas ao teste de Komogorov-Smirnov para verificação da normalidade. As variáveis com distribuição normal foram descritas em termos de média e desvio padrão, enquanto as com distribuição não normal foram descritas em como mediana e com a respectiva variância.

Para verificar a distribuição das variáveis contínuas entre os grupos foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Para avaliar a correlação (R_{xy}) entre os grupos o teste de Spearman foi utilizado para os dados quantitativos não paramétricos e o teste de correlação de Pearson para os dados paramétricos. Os níveis de correlação considerados foram: forte= $0,67 < R_{xy} \leq 1$, moderada= $0,35 < R_{xy} \leq 0,67$ e fraca= $0 < R_{xy} \leq 0,35$ (110). Foi considerada correlação negativa quando abaixo de zero ($-1 < r_{xy} < 0$). Na comparação entre variáveis categóricas foi utilizado o teste Qui-Quadrado de Pearson.

Todos os testes foram calculados assumindo-se significância de 5% ($p < 0,05$). O *software* utilizado para análise foi o Prisma, versão 6.01.

1.9.8 Aspectos éticos

O Projeto foi submetido para avaliação e aprovado pelo Comitê de Ética em

Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, sob o número de protocolo 384250. Foi realizada leitura e coletada assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (APENDICE 3) para todos os participantes. Não houve qualquer tipos de remuneração ou privilégio para aqueles que optaram em participar da pesquisa.

2 RESULTADOS

2.1 AVALIAÇÃO CLÍNICA DOS PACIENTES PORTADORES DE GOTA E DOS PARTICIPANTES DO GRUPO DE COMPARAÇÃO

Foram selecionados 39 pacientes, todos do sexo masculino, com média de idade de 58,2 ($\pm 1,6$) anos. O GC consistiu de 34 voluntários do sexo masculino, com média de idade 54,3 ($\pm 1,8$) anos. Na tabela 1 podem ser observados os dados clínicos e laboratoriais da amostra. Embora os grupos tenham se mostrado homogêneos para idade e raça, observamos frequência significativamente maior de hipertensão e dislipidemia no GG.

Para avaliar o grau de inflamação utilizamos exames laboratoriais de provas de atividade inflamatória (VHS e PCR), que demonstraram diferença significativa entre os grupos, o mesmo tendo ocorrido em relação à uricemia.

Foram recrutados 39 pacientes com média de idade do grupo 58,23 $\pm$ 1.6 anos, os pacientes foram estratificados segundo a presença de artrite, sendo 17 (43.6%) no grupo crise e 22 (54.4%) no grupo intercrise. O grupo controle consiste de 34 voluntários do sexo masculino, saudáveis que aceitaram participar da pesquisa, com média de idade 54,32 $\pm$ 1.8 anos. Não apresentavam nenhuma doença reumatológica ou estavam em uso de imunossupressores, porém não foram excluídos pacientes com hipertensão, diabetes ou dislipidemias, visto que os pacientes apresentam incidência aumentada de tais comorbidades. Em virtude do número muito baixo de pacientes do sexo feminino em nosso ambulatório, foram selecionados apenas pacientes do sexo masculino.

Para todos os indivíduos do grupo de comparação não havia sinais clínicos de artrite. A velocidade de sedimentação das hemácias (VSH) e a proteína C reativa (PCR) foram avaliadas nos grupos Gota (GG) e de Comparação (GC) e a média dos valores de hemossedimentação foi, respectivamente 27,00 $\pm$ 4.3 e 16,62 $\pm$ 3.2, enquanto a media dos valores de PCR foi 12,48 $\pm$ 3.3 e 2,93 $\pm$ 0.28, para GG e GC, respectivamente.

Dezessete pacientes encontravam-se em crise no momento da avaliação, e 22 em período intercrítico. A presença de artrite correlacionou-se com os níveis séricos de PCR. Como já é descrito, não houve correlação dos níveis séricos de

ácido úrico, VHS ou outros dados clínicos com a presença de artrite.

Tabela 1 – Dados Clínicos e laboratoriais

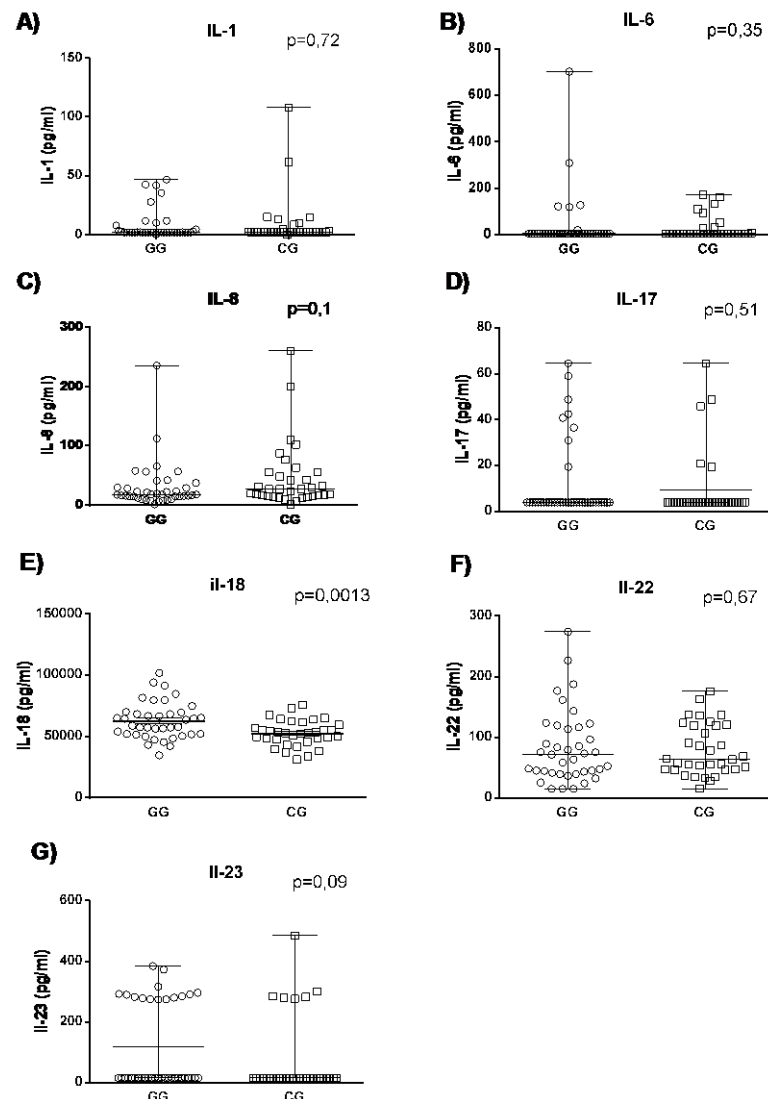
Variáveis	Casos N=39		Controle N=34		P
		%		%	
Idade (média ± DP)	58,2 (±1.6)		54,32(±1.8)		0,103
Sexo					
Masculino	39		34		
Feminino	0		0		
Raça					
parda	18	46,15	27	79,41	
negra	5	12,82	2	5,88	
branca	16	41,02	5	14,70	
HAS	28	71,79	10	29,41	
DM	11	28,21	5	14,71	
DLP	25	64,10	10	29,41	
Obesidade	15	38,46	9	26,47	
Alopurinol	35	89,74			
Colchicina	30	76,92			
Prednisona	7	17,95			
AINH	7	17,95			
Tempo de doença (média ± DP)	11,0 (±1.9)				
Deformidade	9	23,1			
Tofos	18	46,2			
Artrite	17	43,6	0		
Sem artrite	22	54,4	34	100	
VHS	27,0± 4.3		16,62±3.2		0,007*
PCR	12,5±3,3		2,93±0,28		0,039*
Ac Úrico	7,1±0.3		5,58±0.26		0,854

Análise estatística por Teste T para dados paramétricos e teste U de Mann-Whitney para dados não paramétricos. Nível de significância de $p < 0,05$

2.2 DOSAGEM SÉRICA DAS CITOCINAS INFLAMATÓRIAS

Foi realizada a dosagem sérica de citocinas nos grupos GG e GC. Os valores das medianas (m) dos níveis séricos das citocinas encontrados foram, respectivamente, para GG e GC: $m=1,95$ e $1,95$ para IL-1; $m=18,12$ e $27,6$ para IL-8; $m=3,9$ e $3,9$ para IL-17a; $m=6.2701,0 \pm 2.399,0$ e $52.597,0 \pm 1.805,0$ para IL-18; $m=4,69$ e $4,69$ para IL-6; $m=71,8$ e $64,3$ para IL-22, $m=15,6$ e $15,6$ para IL-23. A avaliação da diferença entre as distribuições das citocinas nos GG e GC, realizada pelo teste U de Mann-Whitney, não demonstrou significância estatística para as citocinas estudadas, conforme valores do parâmetro p fornecidos na Figura 5.

Figura 5 – Comparação dos níveis de citocinas no soro dos pacientes com gota (□) e controles (○). m = mediana.

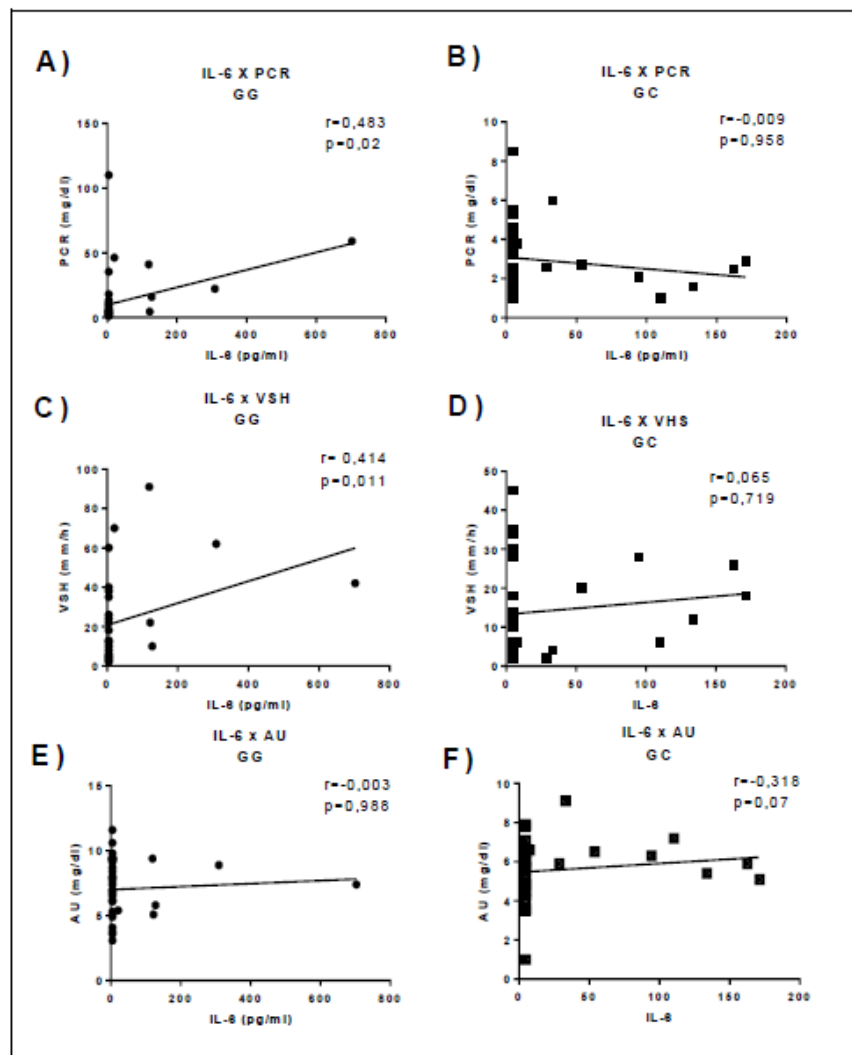


As barras em torno da mediana representam a variância. Nível de significância de $p<0,05$.

2.3 AVALIAÇÃO DAS RELAÇÕES CLÍNICO-LABORATORIAIS

Analisando a correlação entre os níveis séricos de citocinas e os dados laboratoriais, encontramos moderada mas significativa correlação positiva entre os níveis séricos de IL-6 e o PCR e VHS para pacientes do GG apenas (ver Figura 6). Não foi encontrada correlação entre as citocinas e uricemia.

Figura 6 – Correlações da IL-6 (GG e GC) com PCR (A e B), VHS (C e D) e ácido úrico (E e F).



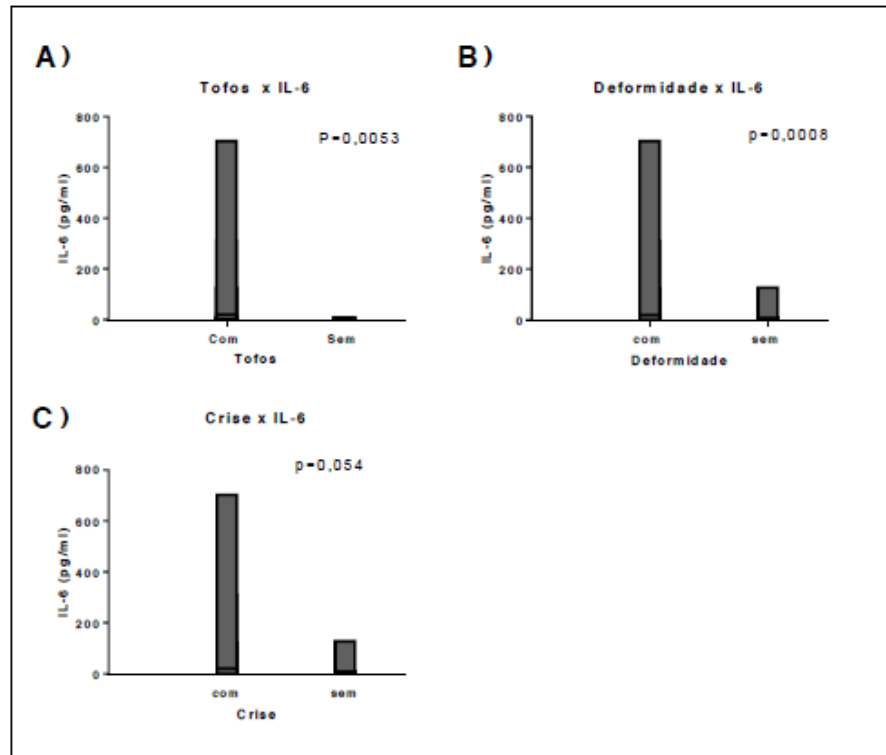
r = coeficiente de correlação de Spearman. Nível de significância de $p < 0,05$.

Na avaliação da distribuição do nível sérico das citocinas em relação aos dados clínicos, encontramos associação entre os níveis séricos de IL-6 e a presença de deformidades e de tofos no GG apenas, como demonstrado na figura 7. Nesta figura ainda é demonstrado que embora não tenha sido encontrada associação entre IL-6 e a presença de artrite (crise), evidencia-se clara tendência a essa associação. Não encontramos associação entre nenhuma das citocinas dosadas e outros dados clínicos (idade, raça, hipertensão, diabetes, dislipidemia, obesidade, uso de medicações e tempo de doença).

Avaliamos ainda se existia correlação entre as diferentes citocinas, encontrando apenas correlação fraca entre os níveis de IL-1 e IL-17 ($r = 0,397$ e

$p=0,012$) para os pacientes do grupo gota. Não foi visualizada correlação entre as interleucinas no grupo controle.

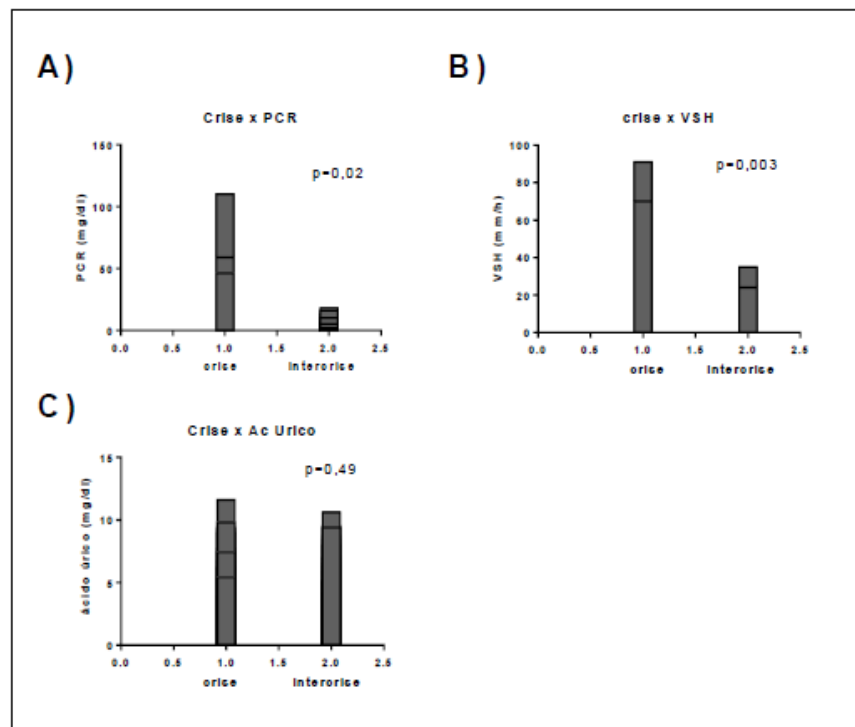
Figura 7 – Níveis de IL-6 estratificados por grupos (A) com e sem tofos; (B) com e sem deformidade e (C) com e sem artrite (crise).



Nível de significância de $p<0,05$.

Entre os indivíduos do GG, dezessete pacientes encontravam-se em crise no momento da avaliação, e 22 em período intercrítico. Foram testadas as distribuições das variáveis contínuas no grupo GG com crise e intercrise (Figura 8), sendo encontrada diferença significativa para PCR ($p<0,05$) e VHS ($p<0,01$). Em relação aos outros dados clínicos e laboratoriais avaliados não houve diferença entre os subgrupos crise e intercrise.

Figura 8 – Comparação entre pacientes com e sem artrite no momento da avaliação em relação à PCR (A), VSH (B), e ácido úrico (C).



Nível de significância de $p < 0,05$.

3 DISCUSSÃO

Vários estudos vêm sendo realizados nas doenças inflamatórias crônicas para entender o desencadeamento molecular do processo inflamatório, e sua relação com as manifestações clínicas destas doenças. Em gota existem poucos estudos que avaliam dados clínicos em relação ao nível sérico de citocinas. Assim, objetivamos correlacionar características clínicas e laboratoriais usualmente avaliadas em pacientes portadores de gota com as citocinas para as quais já existem dados experimentais demonstrando participação na patogênese desta doença.

Nossos resultados não demonstram diferença estatisticamente significativa no nível das citocinas mensuradas entre pacientes e controles, a despeito da significativa diferença em relação aos níveis séricos das provas de atividade inflamatórias. Em comparação a dados de literatura, encontramos valores acima da média para os níveis de citocinas entre os pacientes de gota e especialmente entre os controles. Contudo, os níveis de citocinas mensurados são ainda muito díspares entre os estudos, especialmente quando dosadas em portadores de patologias inflamatórias. Vários fatores podem ser responsabilizados por tal variação: forma de coleta, o tempo entre a coleta e o processamento da amostra e as diferenças entre os kits comerciais utilizados que podem alterar os níveis de valores medidos. O horário de coleta pode também ser um fator relevante: dados recentes indicam variação no nível sérico de citocinas de acordo com o ritmo circadiano (1).

Necessita-se ainda, portanto, de maior padronização na técnica de coleta e mensuração, além de estudos populacionais mais extensos, que determinem os valores “normais” para as citocinas. Em relação ao nível sérico das outras citocinas dosadas em pacientes com gota, os dados da literatura são também conflitantes. Inokuchi e colaboradores encontraram elevação de IL-18, IL-6, e IL-8 em pacientes em relação à controles, porém só foi verificada associação com inflamação (mensurada pelo nível sérico de PCR) para IL-6 e IL-8. Martin et al (2010) encontraram resultados similares aos nossos em relação à IL-1 e IL-8 em 45 portadores de gota e 46 controles. Porém não foram obtidos dados de correlação clínica (2, 3).

Em relação à IL-1, um fator que pode justificar os resultados negativos é a utilização de colchicina por grande parte dos pacientes (76,92%). É relatado que a colchicina pode inibir, ao menos parcialmente, a oligomerização do inflamassomo NLRP3(4). Outra possível explicação seria a ação predominantemente local de tais citocinas. Não existem dados que descrevam o comportamento de tais citocinas ao longo de todo o curso do processo inflamatório na gota e a tentativa de parear a análise durante e após a crise se mostrou inconclusiva(3).

Em consonância com dados da literatura encontramos aumento de IL-6 em pacientes com gota, com boa correlação com os níveis séricos de PCR e VHS, e significativa associação desta citocina com a presença de artrite, deformidade e de tofos. Estes dados podem refletir o papel desta citocina na gravidade da doença, sugerindo papel prognóstico.

A IL-6 é uma citocina pró-inflamatória, que pode ter sua produção desencadeada pela exposição de sinoviócitos e monócitos pelo ácido úrico(5). Tem ação sobre ativação sinovial e sobre a regulação da osteoclastogênese (6), sendo bem reconhecida a associação a dano ósseo em outras patologias inflamatórias. Na gota, Choe e colaboradores encontraram associação negativa do receptor solúvel da IL-6 com índices de dano radiográfico, porém não houve associação direta com os níveis de IL-6 (7). Existem indicações de que, na gota, a disfunção da relação entre a IL-6 e seu receptor gere a falência na mudança da fase neutrofílica para a fase monocítica da inflamação, perpetuando um processo inflamatório mais intenso e com maior possibilidade de dano articular (8). Há descrição de associação entre elevação sérica dos níveis de IL-6 e PCR(2, 9), ambos geralmente correlacionados à elevação concomitante do ácido úrico. Estudos populacionais sugerem que o componente inflamatório avaliado pelo aumento da PCR, que é associado à elevação dos níveis de ácido úrico, tem relação direta com a elevação de IL-6 (10, 11). A elevação sérica da IL-6 vem sendo correlacionada na população geral com maior frequência de eventos e mortalidade cardiovascular (12, 13). Esta correlação pode ser especialmente relevante para os pacientes de gota, uma vez que a exacerbação da atividade inflamatória assim como a elevação dos níveis séricos de ácido úrico predispõe portadores de gota a um maior risco cardiovascular que a população geral (14). A IL-6 pode ter papel direto no aumento dos risco nestes

pacientes. Nosso estudo, porém não foi desenhado para avaliar tal relação, e estudos nessa direção são necessários para avaliar esta hipótese.

4 CONCLUSÕES

Encontramos diferença significativa nos níveis séricos de IL-18 entre pacientes e grupo de comparação. Não houve diferença estatisticamente significativa para os níveis séricos das demais citocinas avaliadas entre os dois grupos. Encontramos correlação fraca entre os níveis de IL-18 e IL-6 e IL-1 β e IL-17A entre os pacientes apenas. Não foi visualizada correlação entre as interleucinas no grupo de comparação. Os níveis séricos de IL-6 e de IL-18 correlacionaram-se com aumento de VHS e PCR e o nível sérico de IL-6 associou-se à presença de tofos e deformidades. Não foram observadas outras associações estatisticamente significativas entre os níveis séricos das citocinas avaliadas e parâmetros clínicos ou laboratoriais da doença. Não encontramos associação significativa entre o uso de medicações para o tratamento da gota e a expressão de citocinas. Nossos resultados sugerem que a IL-6 está vinculada ao processo inflamatório e pode ter papel prognóstico na gota.

4.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Cada vez mais a atenção investigativa recai sobre os processos moleculares através dos quais se desencadeia e se estabelece a inflamação na gota. Quais os coadjuvantes e os oponentes neste processo? Como e porque a inflamação se resolve espontaneamente? O que muda a nível molecular, levando à cronificação da doença? Neste campo ainda há muito a caminhar, mas os avanços atuais já determinam uma compreensão totalmente diferente da doença, com repercussões inclusive para a prevenção e o tratamento de diversos aspectos desta patologia. A avaliação do papel dos mediadores inflamatórios no comportamento clínico de diversas doenças inflamatórias vem gerando enormes ganhos terapêuticos. Assim, este trabalho faz parte de um projeto de pesquisa mais amplo. Além de avaliar a expressão de citocinas, pretendemos, subsequentemente, investigar a atividade da enzima caspase-1 na gota e a ação anti-inflamatória e imunomoduladora de agonistas dos receptores ativados pelo proliferador do peroxissoma γ (PPAR γ), *in vitro*. Com o desenvolver do projeto, esperamos estabelecer uma ponte entre a pesquisa clínica e a investigação terapêutica.

REFERÊNCIAS

1. So A. Developments in the scientific and clinical understanding of gout. *Arthritis research & therapy*. 2008;10(5):221.
2. Roddy E, Doherty M. Gout. *Epidemiology of gout*. *Arthritis research & therapy*. 2010;12(6):223.
3. Martillo MA, Nazzari L, Crittenden DB. The crystallization of monosodium urate. *Current rheumatology reports*. 2014;16(2):400.
4. Robinson PC, Horsburgh S. Gout: Joints and beyond, epidemiology, clinical features, treatment and co-morbidities. *Maturitas*. 2014.
5. Zhu Y, Pandya BJ, Choi HK. Prevalence of gout and hyperuricemia in the US general population: the National Health and Nutrition Examination Survey 2007-2008. *Arthritis and rheumatism*. 2011;63(10):3136-41.
6. Krishnan E. Gout in African Americans. *Am J Med*. 2014.
7. Alvarez-Lario B, Macarron-Vicente J. Uric acid and evolution. *Rheumatology (Oxford)*. 2010;49(11):2010-5.
8. Pillinger MH, Rosenthal P, Abeles AM. Hyperuricemia and Gout New Insights into Pathogenesis and Treatment. *Bulletin of the NYU Hospital for Joint Diseases*. 2007;65(3):215-21.
9. Nuki G, Simkin P. A concise history of gout and hyperuricemia and their treatment. *Arthritis research & therapy*. 2006;8(Suppl 1):S1.
10. Bhattacharjee S. A brief history of gout. *International Journal of Rheumatic Diseases*. 2009;12:61-3.
11. Garrod AB. Researches on Gout.-Part I. The Urine in the Different Forms of Gout.-Part II. The Influence of Colchicum upon the Urine. *Med Chir Trans*. 1858;41:325-60.
12. McCarty DJ, Hollander JL. Identification of urate crystals in gouty synovial fluid. *Ann Intern Med*. 1961;54:452-60.
13. Seegmiller JE, Howell RR. The old and new concepts of acute gouty arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 1962;5:616-23.
14. Phelps P, Steele AD, McCarty DJ, Jr. Compensated polarized light microscopy. Identification of crystals in synovial fluids from gout and pseudogout. *JAMA*. 1968;203(7):508-12.

15. Villa L, Robecchi A, Ballabio CB. Physiopathology, clinical manifestations, and treatment of gout. I. Physiopathology and pathogenesis. *Annals of the rheumatic diseases*. 1958;17(1):9-15 passim.
16. Schlesinger N, Thiele RG. The pathogenesis of bone erosions in gouty arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2010;69(11):1907-12.
17. Dalbeth N, Pool B, Gamble GD, Smith T, Callon KE, McQueen FM, et al. Cellular characterization of the gouty tophus: a quantitative analysis. *Arthritis and rheumatism*. 2010;62(5):1549-56.
18. Wallace S, Robinson H, Masi A, Decker J, Mccarty D. Preliminary criteria for the classification of the acute arthritis of primary gout. *Arthritis and rheumatism*. 1977;20:895 - 900.
19. Vazquez-Mellado J, Hernandez-Cuevas CB, Alvarez-Hernandez E, Ventura-Rios L, Pelaez-Ballestas I, Casasola-Vargas J, et al. The diagnostic value of the proposal for clinical gout diagnosis (CGD). *Clin Rheumatol*. 2012;31(3):429-34.
20. Dalbeth N, Fransen J, Jansen TL, Neogi T, Schumacher HR, Taylor WJ. New classification criteria for gout: a framework for progress. *Rheumatology (Oxford)*. 2013;52(10):1748-53.
21. Choi H, Ford E, Li C, Curhan G. Prevalence of the metabolic syndrome in patients with gout: the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Arthritis and rheumatism*. 2007;57:109 - 15.
22. Billiet L, Doaty S, Katz JD, Velasquez MT. Review of Hyperuricemia as New Marker for Metabolic Syndrome. *ISRN rheumatology*. 2014;2014:852954.
23. Ruggiero C, Cherubini A, Ble A, Bos AJ, Maggio M, Dixit VD, et al. Uric acid and inflammatory markers. *European heart journal*. 2006;27(10):1174-81.
24. Watanabe H, Gehrke S, Contassot E, Roques S, Tschopp J, Friedmann PS, et al. Danger Signaling through the Inflammasome Acts as a Master Switch between Tolerance and Sensitization. *The Journal of Immunology*. 2008;180(9):5826-32.
25. Sonnenberg GF, Fouser LA, Artis D. Border patrol: regulation of immunity, inflammation and tissue homeostasis at barrier surfaces by IL-22. *Nature immunology*. 2011;12(5):383-90.
26. Tramontini N, Huber C, Liu-Bryan R, Terkeltaub RA, Kilgore KS. Central role of complement membrane attack complex in monosodium urate crystal-induced neutrophilic rabbit knee synovitis. *Arthritis and rheumatism*. 2004;50(8):2633-9.

27. Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*. 2000;406(6797):782-7.
28. Shaw OM, Steiger S, Liu X, Hamilton JA, Harper JL. GM-CSF drives MSU crystal-induced inflammatory macrophage differentiation and NLRP3 inflammasome upregulation in vivo. *Arthritis & rheumatology*. 2014.
29. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 2004;4:499 - 511.
30. Gersch MS, Johnson RJ. Uric acid and the immune response. *Nephrol Dial Transplant*. 2006;21(11):3046-7.
31. Riteau N, Baron L, Villeret B, Guillou N, Savigny F, Ryffel B, et al. ATP release and purinergic signaling: a common pathway for particle-mediated inflammasome activation. *Cell death & disease*. 2012;3:e403.
32. Jaramillo M, Godbout M, Naccache PH, Olivier M. Signaling events involved in macrophage chemokine expression in response to monosodium urate crystals. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(50):52797-805.
33. Petrilli V, Martinon F. The inflammasome, autoinflammatory diseases, and gout. *Joint, bone, spine : revue du rhumatisme*. 2007;74(6):571-6.
34. Punzi L, Scanu A, Ramonda R, Oliviero F. Gout as autoinflammatory disease: new mechanisms for more appropriated treatment targets. *Autoimmunity reviews*. 2012;12(1):66-71.
35. Mitroulis I, Skendros P, Ritis K. Targeting IL-1beta in disease; the expanding role of NLRP3 inflammasome. *European journal of internal medicine*. 2010;21(3):157-63.
36. Shi Y, Evans JE, Rock KL. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature*. 2003;425(6957):516-21.
37. Webb R, Jeffries M, Sawalha AH. Uric acid directly promotes human T-cell activation. *Am J Med Sci*. 2009;337(1):23-7.
38. Hu DE, Moore AM, Thomsen LL, Brindle KM. Uric acid promotes tumor immune rejection. *Cancer research*. 2004;64(15):5059-62.
39. Kuo CF, Luo SF, See LC, Chou IJ, Fang YF, Yu KH. Increased risk of cancer among gout patients: a nationwide population study. *Joint, bone, spine : revue du rhumatisme*. 2012;79(4):375-8.

40. Lee SJ, Nam KI, Jin HM, Cho YN, Lee SE, Kim TJ, et al. Bone destruction by receptor activator of nuclear factor kappaB ligand-expressing T cells in chronic gouty arthritis. *Arthritis research & therapy*. 2011;13(5):R164.
41. Lai S, Zhou X. Inflammatory cells in tissues of gout patients and their correlations with comorbidities. *The open rheumatology journal*. 2013;7:26-31.
42. Hasselbacher P, Schumacher HR. Immunoglobulin in tophi and on the surface of monosodium urate crystals. *Arthritis and rheumatism*. 1978;21(3):353-61.
43. Kam M, Perl-Treves D, Caspi D, Addadi L. Antibodies against crystals. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1992;6(8):2608-13.
44. Kam M, Perl-Treves D, Sfez R, Addadi L. Specificity in the recognition of crystals by antibodies. *Journal of molecular recognition : JMR*. 1994;7(4):257-64.
45. Delbarre F, Auscher C, de Gery A, Kha Vang T. [Molecular bases of the treatment of Lesch-Nyhan syndrome, related syndromes and common gout]. *Biochimie*. 1972;54(5):709-21.
46. March CJ, Mosley B, Larsen A, Cerretti DP, Braedt G, Price V, et al. Cloning, sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary DNAs. *Nature*. 1985;315(6021):641-7.
47. Arend WP, Palmer G, Gabay C. IL-1, IL-18, and IL-33 families of cytokines. *Immunol Rev*. 2008;223:20-38.
48. Getting SJ, Lam CW, Chen AS, Grieco P, Perretti M. Melanocortin 3 receptors control crystal-induced inflammation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2006;20(13):2234-41.
49. Mylona EE, Mouktaroudi M, Crisan TO, Makri S, Pistiki A, Georgitsi M, et al. Enhanced interleukin-1beta production of PBMCs from patients with gout after stimulation with Toll-like receptor-2 ligands and urate crystals. *Arthritis research & therapy*. 2012;14(4):R158.
50. Martinon F, Petrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature*. 2006;440(7081):237-41.
51. Chen CJ, Shi Y, Hearn A, Fitzgerald K, Golenbock D, Reed G, et al. MyD88-dependent IL-1 receptor signaling is essential for gouty inflammation stimulated by monosodium urate crystals. *The Journal of clinical investigation*. 2006;116(8):2262-71.

52. Roberge CJ, de Medicis R, Dayer JM, Rola-Pleszczynski M, Naccache PH, Poubelle PE. Crystal-induced neutrophil activation. V. Differential production of biologically active IL-1 and IL-1 receptor antagonist. *Journal of immunology*. 1994;152(11):5485-94.
53. Guma M, Ronacher L, Liu-Bryan R, Takai S, Karin M, Corr M. Caspase 1-independent activation of interleukin-1 β in neutrophil-predominant inflammation. *Arthritis & Rheumatism*. 2009;60(12):3642-50.
54. Joosten LAB, Netea MG, Fantuzzi G, Koenders MI, Helsen MMA, Sparrer H, et al. Inflammatory arthritis in caspase 1 gene-deficient mice: Contribution of proteinase 3 to caspase 1-independent production of bioactive interleukin-1 β . *Arthritis & Rheumatism*. 2009;60(12):3651-62.
55. Stehlik C. Multiple interleukin-1 β -converting enzymes contribute to inflammatory arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2009;60(12):3524-30.
56. So A, De Smedt T, Revaz S, Tschopp J. A pilot study of IL-1 inhibition by anakinra in acute gout. *Arthritis research & therapy*. 2007;9(2):R28.
57. Torres R, Macdonald L, Croll SD, Reinhardt J, Dore A, Stevens S, et al. Hyperalgesia, synovitis and multiple biomarkers of inflammation are suppressed by interleukin 1 inhibition in a novel animal model of gouty arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2009;68(10):1602-8.
58. Chen K, Fields T, Mancuso CA, Bass AR, Vasanth L. Anakinra's efficacy is variable in refractory gout: report of ten cases. *Seminars in arthritis and rheumatism*. 2010;40(3):210-4.
59. Terkeltaub R, Sundy JS, Schumacher HR, Murphy F, Bookbinder S, Biedermann S, et al. The interleukin 1 inhibitor rilonacept in treatment of chronic gouty arthritis: results of a placebo-controlled, monosequence crossover, non-randomised, single-blind pilot study. *Annals of the rheumatic diseases*. 2009;68(10):1613-7.
60. Tran AP, Edelman J. Interleukin-1 inhibition by anakinra in refractory chronic tophaceous gout. *Int J Rheum Dis*. 2011;14(3):e33-7.
61. Sedimbi SK, Hagglof T, Karlsson MC. IL-18 in inflammatory and autoimmune disease. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2013;70(24):4795-808.

62. van de Veerdonk FL, Netea MG, Dinarello CA, Joosten LA. Inflammasome activation and IL-1 β and IL-18 processing during infection. *Trends in immunology*. 2011;32(3):110-6.
63. Conforti-Andreoni C, Spreafico R, Qian HL, Riteau N, Ryffel B, Ricciardi-Castagnoli P, et al. Uric acid-driven Th17 differentiation requires inflammasome-derived IL-1 and IL-18. *Journal of immunology*. 2011;187(11):5842-50.
64. Krishnan SM, Sobey CG, Latz E, Mansell A, Drummond GR. IL-1 β and IL-18: Inflammatory markers or mediators of hypertension? *British journal of pharmacology*. 2014.
65. Dinarello CA, Novick D, Kim S, Kaplanski G. Interleukin-18 and IL-18 binding protein. *Frontiers in immunology*. 2013;4:289.
66. Inokuchi T, Moriwaki Y, Tsutsui H, Yamamoto A, Takahashi S, Tsutsumi Z, et al. Plasma interleukin (IL)-18 (interferon- γ -inducing factor) and other inflammatory cytokines in patients with gouty arthritis and monosodium urate monohydrate crystal-induced secretion of IL-18. *Cytokine*. 2006;33(1):21-7.
67. Rose-John S. IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6. *International journal of biological sciences*. 2012;8(9):1237-47.
68. Yanni G, Whelan A, Feighery C, Bresnihan B. Synovial tissue macrophages and joint erosion in rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*. 1994;53(1):39-44.
69. Smolen JS, Avila JC, Aletaha D. Tocilizumab inhibits progression of joint damage in rheumatoid arthritis irrespective of its anti-inflammatory effects: disassociation of the link between inflammation and destruction. *Annals of the rheumatic diseases*. 2012;71(5):687-93.
70. Jones G, Ding C. Tocilizumab: a review of its safety and efficacy in rheumatoid arthritis. *Clinical medicine insights Arthritis and musculoskeletal disorders*. 2010;3:81-9.
71. Choe JY, Lee GH, Kim SK. Radiographic bone damage in chronic gout is negatively associated with the inflammatory cytokines soluble interleukin 6 receptor and osteoprotegerin. *The Journal of rheumatology*. 2011;38(3):485-91.

72. Guerne PA, Terkeltaub R, Zuraw B, Lotz M. Inflammatory microcrystals stimulate interleukin-6 production and secretion by human monocytes and synoviocytes. *Arthritis and rheumatism*. 1989;32(11):1443-52.
73. Desgeorges A, Gabay C, Silacci P, Novick D, Roux-Lombard P, Grau G, et al. Concentrations and origins of soluble interleukin 6 receptor-alpha in serum and synovial fluid. *The Journal of rheumatology*. 1997;24(8):1510-6.
74. Tsai PC, Chen CJ, Lai HM, Chang S.J. Analysis of polymorphisms in the promoter region and protein levels of interleukin-6 gene among gout patients. *Clinical and Experimental Rheumatology* 2008;;26:841-7.
75. Ruggiero C, Cherubini A, Miller E, 3rd, Maggio M, Najjar SS, Lauretani F, et al. Usefulness of uric acid to predict changes in C-reactive protein and interleukin-6 in 3-year period in Italians aged 21 to 98 years. *The American journal of cardiology*. 2007;100(1):115-21.
76. Fujiwara K, Matsukawa A, Ohkawara S, Takagi K, Yoshinaga M. Functional distinction between CXC chemokines, interleukin-8 (IL-8), and growth related oncogene (GRO) alpha in neutrophil infiltration. *Lab Invest*. 2002;82(1):15-23.
77. McNearney T, Baethge BA, Cao S, Alam R, Lisse JR, Westlund KN. Excitatory amino acids, TNF- α , and chemokine levels in synovial fluids of patients with active arthropathies. *Clinical & Experimental Immunology*. 2004;137(3):621-7.
78. Terkeltaub R, Zachariae C, Santoro D, Martin J, Peveri P, Matsushima K. Monocyte-derived neutrophil chemotactic factor/interleukin-8 is a potential mediator of crystal-induced inflammation. *Arthritis & Rheumatism*. 1991;34(7):894-903.
79. Harada A, Sekido N, Akahoshi T, Wada T, Mukaida N, Matsushima K. Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation. *J Leukoc Biol*. 1994;56(5):559-64.
80. Mohamed Hachicha PHN, Shaun R.McColl*. Inflammatory Microcrystals Differentially Regulate the Secretion of Macrophage Inflammatory Protein 1 and Interleukin 8 by Human Neutrophils: A Possible Mechanism of Neutrophil Recruitment to Sites of Inflammation in Synovitis. *J Exp Med*. 1995;182:2019-25.
81. Nishimura A, Akahoshi T, Takahashi M, Takagishi K, Itoman M, Kondo H, et al. Attenuation of monosodium urate crystal-induced arthritis in rabbits by a neutralizing antibody against interleukin-8. *J Leukoc Biol*. 1997;62(4):444-9.

82. Terkeltaub R, Baird S, Sears P, Santiago R, Boisvert W. The murine homolog of the interleukin-8 receptor CXCR-2 is essential for the occurrence of neutrophilic inflammation in the air pouch model of acute urate crystal-induced gouty synovitis. *Arthritis and rheumatism*. 1998;41:900 - 9.
83. Martin WJ, Grainger R, Harrison A, Harper JL. Differences in MSU-induced superoxide responses by neutrophils from gout subjects compared to healthy controls and a role for environmental inflammatory cytokines and hyperuricemia in neutrophil function and survival. *The Journal of rheumatology*. 2010;37(6):1228-35.
84. Verburgh CA, Hart MH, Aarden LA, Swaak AJ. Interleukin-8 (IL-8) in synovial fluid of rheumatoid and nonrheumatoid joint effusions. *Clin Rheumatol*. 1993;12(4):494-9.
85. McNearney T, Baethge BA, Cao S, Alam R, Lisse JR, Westlund KN. Excitatory amino acids, TNF-alpha, and chemokine levels in synovial fluids of patients with active arthropathies. *Clinical and experimental immunology*. 2004;137(3):621-7.
86. Matsukawa A, Yoshimura T, Maeda T, Takahashi T, Ohkawara S, Yoshinaga M. Analysis of the cytokine network among tumor necrosis factor alpha, interleukin-1beta, interleukin-8, and interleukin-1 receptor antagonist in monosodium urate crystal-induced rabbit arthritis. *Lab Invest*. 1998;78(5):559-69.
87. Ben-Baruch A MD, Oppenheim JJ. . Signals and receptors involved in recruitment of inflammatory cells. *The Journal of biological chemistry*. 1995;270.
88. Foxman EF, Kunkel EJ, Butcher EC. Integrating conflicting chemotactic signals. The role of memory in leukocyte navigation. *J Cell Biol*. 1999;147(3):577-88.
89. Jin W, Dong C. IL-17 cytokines in immunity and inflammation. *Emerging Microbes & Infections*. 2013;2(9):e60.
90. Jones SA, Sutton CE, Cua D, Mills KH. Therapeutic potential of targeting IL-17. *Nature immunology*. 2012;13(11):1022-5.
91. Nakae S, Saijo S, Horai R, Sudo K, Mori S, Iwakura Y. IL-17 production from activated T cells is required for the spontaneous development of destructive arthritis in mice deficient in IL-1 receptor antagonist. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(10):5986-90.
92. Carrion M, Juarranz Y, Martinez C, Gonzalez-Alvaro I, Pablos JL, Gutierrez-Canas I, et al. IL-22/IL-22R1 axis and S100A8/A9 alarmins in human osteoarthritic

and rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Rheumatology (Oxford)*. 2013;52(12):2177-86.

93. Daoussis D, Andonopoulos AP, Liossis SN. Wnt pathway and IL-17: novel regulators of joint remodeling in rheumatic diseases. Looking beyond the RANK-RANKL-OPG axis. *Seminars in arthritis and rheumatism*. 2010;39(5):369-83.

94. Milanova V, Ivanovska N, Dimitrova P. TLR2 elicits IL-17-mediated RANKL expression, IL-17, and OPG production in neutrophils from arthritic mice. *Mediators of inflammation*. 2014;2014:643406.

95. Yago T, Nanke Y, Ichikawa N, Kobashigawa T, Mogi M, Kamatani N, et al. IL-17 induces osteoclastogenesis from human monocytes alone in the absence of osteoblasts, which is potently inhibited by anti-TNF-alpha antibody: a novel mechanism of osteoclastogenesis by IL-17. *Journal of cellular biochemistry*. 2009;108(4):947-55.

96. Sutton C, Brereton C, Keogh B, Mills KH, Lavelle EC. A crucial role for interleukin (IL)-1 in the induction of IL-17-producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med*. 2006;203(7):1685-91.

97. Sutton CE, Lalor SJ, Sweeney CM, Brereton CF, Lavelle EC, Mills KH. Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity. *Immunity*. 2009;31(2):331-41.

98. Lalor SJ, Dungan LS, Sutton CE, Basdeo SA, Fletcher JM, Mills KH. Caspase-1-processed cytokines IL-1beta and IL-18 promote IL-17 production by gammadelta and CD4 T cells that mediate autoimmunity. *Journal of immunology*. 2011;186(10):5738-48.

99. Doisne JM, Soulard V, Becourt C, Amniai L, Henrot P, Havenar-Daughton C, et al. Cutting edge: crucial role of IL-1 and IL-23 in the innate IL-17 response of peripheral lymph node NK1.1- invariant NKT cells to bacteria. *Journal of immunology*. 2011;186(2):662-6.

100. Empson VG, McQueen FM, Dalbeth N. The natural killer cell: a further innate mediator of gouty inflammation? *Immunology and cell biology*. 2010;88(1):24-31.

101. Ferraccioli G, Zizzo G. The potential role of Th17 in mediating the transition from acute to chronic autoimmune inflammation: rheumatoid arthritis as a model. *Discovery medicine*. 2011;11(60):413-24.

102. Wolk K, Kunz S, Witte E, Friedrich M, Asadullah K, Sabat R. IL-22 increases the innate immunity of tissues. *Immunity*. 2004;21(2):241-54.
103. Leipe J, Schramm MA, Grunke M, Baeuerle M, Dechant C, Nigg AP, et al. Interleukin 22 serum levels are associated with radiographic progression in rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2011;70(8):1453-7.
104. Tang C, Chen S, Qian H, Huang W. Interleukin-23: as a drug target for autoimmune inflammatory diseases. *Immunology*. 2012;135(2):112-24.
105. Murphy CA, Langrish CL, Chen Y, Blumenschein W, McClanahan T, Kastelein RA, et al. Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J Exp Med*. 2003;198(12):1951-7.
106. Wertheimer A, Morlock R, Becker MA. A revised estimate of the burden of illness of gout. *Curr Ther Res Clin Exp*. 2013;75:1-4.
107. Carl Wilhelm Scheele (1742-1786) Swedish apothecary. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 1970;212(13):2258-9.
108. Freudweiler M. Studies on the nature of gouty tophi. *Dtsch Arch Klin Med*. 1899;63:266.
109. Kingsbury SR, Conaghan PG, McDermott MF. The role of the NLRP3 inflammasome in gout. *Journal of inflammation research*. 2011;4:39-49.
110. Taylor R. Interpretation of the Correlation-Coefficient - a Basic Review. *Journal of Diagnostic Medical Sonography*. 1990;6(1):35-9.

APENDICE A - ARTIGO ORIGINAL:

CYTOKINE PROFILE IN GOUT: INFLAMMATION DRIVEN BY IL-6 AND IL-18?

Apresentação do artigo

Apresentamos o artigo intitulado “**Cytokine profile in gout: inflammation driven by IL-6 and IL-18?**” submetido à avaliação para publicação no jornal Immunological Investigations.

O processo imunopatogênico que gera a gota está em foco no momento, em decorrência da descrição da ativação do inflamassomo pelo ácido úrico e consequente produção de IL-1 β , fazendo com que a gota viesse a ser compreendida como uma doença auto-inflamatória. Contudo, há muito ainda o que se conhecer a cerca dos mecanismos imunológicos envolvidos nesta doença. O papel de outras citocinas, à exceção da IL-1 β não foi ainda suficientemente bem estudado na gota.

Apesar da importância de conhecer como a doença é determinada pelas citocinas e pelas vias imunológicas por elas desencadeadas, poucos artigos foram publicados com esse foco e várias perguntas ainda encontram-se em aberto:

- Existe relação entre as manifestações clínicas e o nível sérico de citocinas?
- Há relação entre grau de atividade inflamatória e o nível sérico de citocinas?
- Sabendo que as citocinas são estimuladas em cascata, como se comportam as correlações entre as citocinas mensuradas na gota?

Assim, estudamos as citocinas pró-inflamatórias na gota e seu comportamento em relação a aspectos clínicos da doença. Encontramos correlação dos marcadores inflamatórios com IL-6 e IL-18, bem como associação de tofos e deformidades à IL-6, demonstrando portanto associação desta citocina com a gravidade da doença. Inesperadamente, não encontramos associação de IL-1 β ou de IL-8 com parâmetros clínicos ou laboratoriais. O que nos instiga a questionar se a IL-6 e a IL-18 não conduziriam o processo patogênico desencadeado pela IL-1 β . Sugerimos também que pode haver maior participação da imunidade adaptativa no processo inflamatório da gota. Acreditamos que nosso trabalho, enquanto estudo transversal, foi bem sucedido, no sentido de levantar novas hipóteses que merecem ser mais profundamente investigadas.

CYTOKINE PROFILE IN GOUT: INFLAMMATION DRIVEN BY IL-6 AND IL-18?

Nara Gualberto Cavalcanti¹; Claudia Diniz Lopes Marques¹; Thiago Ubiratan Lins e Lins²; Michelly Cristiny Pereira²; Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo²; Angela Luzia Branco Pinto Duarte¹; Ivan da Rocha Pitta²; Maira Galdino da Rocha Pitta²

1. Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)
2. Laboratório de Inovação Terapêutica Suely Galdino (LINAT-SG)

Correspondence Address: Nara Gualberto Cavalcanti

Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas (HC) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Av. Professor Moraes Rego, s/n,

CEP 50670-420, Recife/PE

Phone: +5581 2126-3575

E-mail: nara.gual@gmail.com

We declare the inexistency of conflicts of interest.

Formatado para Cytokines (Anexo A)

<http://www.journals.elsevier.com/cytokine/>

ABSTRACT

Introduction: Gout is considered an autoinflammatory disease characterized by activation of innate immunity. However, the association between serum cytokines levels and clinical manifestations of the disease is not yet well understood. We evaluated the serum profile of proinflammatory cytokines in gout (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-17A, IL-18, IL-22 and IL-23) and described their relationship with clinical and laboratory data in a group of patients with the disorder. **Methodology:** This is a cross-sectional, observational study of 39 male patients with gout (GG), assessing the following variables: age, disease duration, body mass index (BMI), presence or not of comorbidities such as diabetes mellitus (DM), arterial hypertension (AH), dyslipidemia (DLD), and the presence of tophi, deformities and arthritis. Laboratory data on erythrocyte sedimentation rate (ESR), C-reactive protein (CRP) and uric acid were also analyzed. Levels of IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-17A, IL-18, IL-22 and IL-23 were measured by ELISA, following the supplier's recommendations. For the purposes of comparison, 34 males with no previous history of arthritis were also included in the study (CG). **Results:** The average age in the GG was 58.2 ($\pm$ 1.6) years and 54.3 ($\pm$ 1.8) years ($p=0.102$) in the CG. Seventeen participants (43%) exhibited active arthritis on evaluation. Levels of IL-18 were significantly higher in patients in relation to the CG ($p=0.0013$). No statistically significant differences were found between the GG and CG for the other measured cytokines. There was moderate correlation between IL-18 and ESR ($R= 0.43$, $p=0.0073$), PCR ($R= 0.47$, $p=0.0025$) and serum levels of IL-6 ($R=0.36$, $p=0.023$). No correlation was recorded between the cytokines analyzed and uric acid, age, time since diagnosis or the presence of comorbidities. An association was observed between serum levels of IL-6 and the presence of tophi ($p=0.005$) and deformities ($p=0.0008$), as well as a correlation between this cytokine and ESR ($R=0.41$, $p=0.011$) and CRP ($R=0.48$, $p=0.02$). **Conclusions:** IL-18 is correlated with inflammatory activity in gout, as well as IL-6 levels, while IL-6 is associated with clinical and laboratory activity, the presence of tophi and deformities, and may be a prognostic marker or negatively influence the development of this pathology.

Keywords: gout, clinical marker, IL-6, IL-18, inflammation, gouty arthritis.

Introduction: Gout, a chronic inflammatory disease, is considered the most common form of inflammatory arthritis in men over 40 years old. It is associated with sustained hyperuricemia and caused by the deposit of monosodium urate (MSU) crystals in articular and periarticular tissues [1, 2].

It is considered an autoinflammatory disease whose main characteristic is activation of the innate immune system. The presence of uric acid crystals causes oligomerization and dysfunctional activity of NLR3 inflammasome macromolecules [3], resulting in hyperactivity of caspase-1. This process causes increased secretion of inflammatory cytokines such as IL-1 β and IL-18 [4]. These cytokines, in turn, trigger a cascade of proinflammatory mediators, leading to endothelial activation and leukocyte recruitment. The main cytokines with secondary involvement in this process are IL-8 (neutrophil recruitment and activation) [5], IL-6 (amplification of the inflammatory process, possible contribution to bone damage) [6-8], TNF α (proinflammatory activation, maturation and increased monocyte to macrophage transformation) [9]. Figure 1 depicts the cascade for cytokine production in gout.

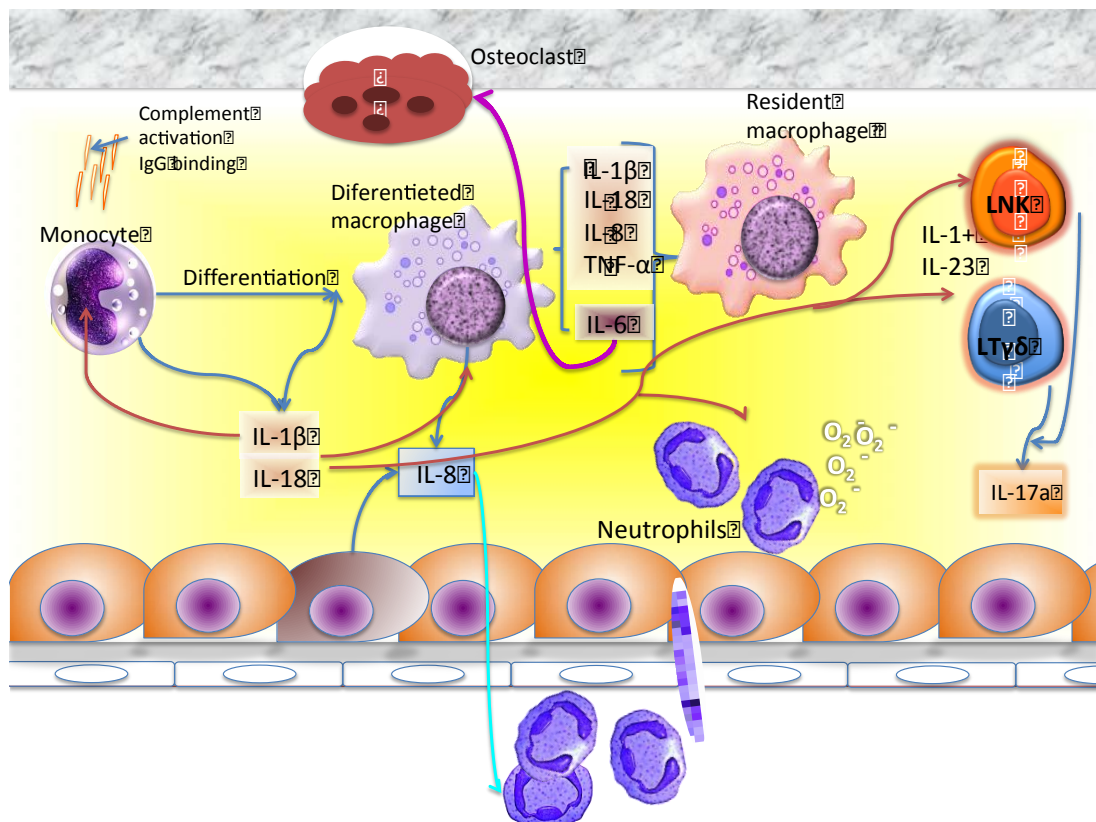


Figure 1 – Participation of proinflammatory cytokines in gout. By author.

The literature contains considerable experimental evidence on how molecules involved in innate immunity activation behave when stimulated by MSU, with increased production of IL-1 β , IL-6, and IL-17A [4, 10-23]. Understanding of how immunochemical basis of disease correlates with clinical presentation may increase the number of possible therapeutics targets, contributing to the process of developing new drugs [24-28]. However, few studies address the correlation between clinical manifestations and cytokine expression.

The objective of our study, then, was to evaluate the serum profile of cytokines (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-17A, IL-18, IL-22, and IL-23) in patients suffering from gout and to correlate these with clinical and laboratory data, comparing the results against a group of participants without gout.

Methods: Clinical demographical evaluation - This was a cross-sectional, hospital-based, observational study conducted at the Hospital das Clínicas of the Federal University of Pernambuco (HC-UFPE) using a comparison group. Patients were selected based on the following inclusion criteria: aged over 18 years; diagnosed with gout according to the criteria of the American College of Rheumatology (ACR) [29]; and regular clinical follow-up conducted at our facility. Exclusion criteria were: failure to consent to the study; suffering from another clinical condition that causes hyperuricemia and/or may elevate cytokine levels, such as myeloproliferative disorders, hemolytic anemia, psoriasis, sarcoidosis, acute or chronic renal failure with creatinine clearance <30, alcohol intoxication, diabetic ketoacidosis, lactic acidosis, glycogen storage disease type I, hypo and hyperparathyroidism, or concurrent infections. The comparison group (CG) consisted of randomly selected volunteers, with no clinical history or diagnosis of gout or previous reports of arthritis, who exhibited no rheumatologic disease nor were taking immunosuppressants. Participants were exclusively male. The study was approved by the Human Research Ethics Committee of the UFPE's Center for Health Sciences, protocol number 384250, and was developed in accordance with Declaration of Helsinki.

Participants were evaluated for the presence of comorbidities, such as *diabetes mellitus* (DM), arterial hypertension (AH), dyslipidemia (DLD) and obesity. Medications in use were recorded. The enrolled individuals were also examined for the presence of arthritis, tophi and deformities. Gout attack was defined as the

presence of arthritis in a patient with acute or chronic gout, and an intercritical phase as the period where a patient with a confirmed diagnosis of gout remained symptom free. After clinical assessment, blood samples were collected and the erythrocyte sedimentation rate (ESR) was measured using the Westergren method (BD bioscience), the C-reactive protein (CRP) was measured by nephelometry (normal range: < 8mg/l). We also measured the uric acid levels (Beckman Coulter – normal range: 3.5 – 7.2 mg/dL).

Cytokine measurement: Cytokines were measured by Sandwich ELISA (enzyme-linked immunosorbant assay), according to the protocol recommended by suppliers. The analyzed cytokines and their respective suppliers are as follows: IL-1 β and IL-6 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA); IL-8, IL-17A, and IL-23 (eBioscience, San Diego, CA, USA); IL-18 and IL-22 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Detection limits were: 1.95 pg/ml for IL-1 β , 4.69 pg/ml for IL-6, 1.95 pg/ml for IL-8, 3.91 pg/ml for IL-17A, 46.87 pg/ml for IL-18, 15.62 pg/ml for IL-22 and 15.62 pg/ml for IL-23.

Statistical Analysis: Data values are given as median and range for non-parametric data and mean $\pm$ standard error of the mean (SEM) for data with Gaussian distribution. The Mann-Whitney test was used to determine the inter-group distribution of continuous variables for non-parametric data and the student's t-test for parametric data. To assess inter-group correlation, Spearman's correlation test was used for non-parametric quantitative data and Pearson's chi-square test for parametric data. We considered correlation (R_{xy}) strength as follows: $0 < R_{xy} \leq 0.35$ = weak correlation; $0.35 < R_{xy} \leq 0.67$ = moderate correlation; $0.67 < R_{xy} \leq 1$ = strong correlation [30]. All tests were calculated using a significance level of 5% ($p < 0.05$). Prism software (version) 6.01 was used for analysis.

Results: The study included 39 male patients, with an average age of 58.2 ($\pm$ 1.6) years and mean disease duration of 11 ($\pm$ 1.9) years. The CG consisted of 34 male volunteers with an average age of 54.3 ($\pm$ 1.8) years. Table 1 presents the clinical and laboratory data of the sample. Although the groups were homogeneous for age and race, we observed significantly higher rates of hypertension and dyslipidemia in the GG. Thirty patients were using colchicine (all at low dosage levels) and seven were taking prednisone (maximum dose of 5mg/d). We found no difference regarding cytokine levels among these patients compared to the patients

without colchicine or prednisone, respectively.

Laboratory tests were conducted for inflammatory activity (ESR and CRP) to evaluate the degree of inflammation, indicating a significant difference for CRP between the groups. The same occurred for uric acid.

Table 1 – Clinical and laboratory data for the two groups (GG and CG)

Variable	GG		CG		P value
	N=39	%	N=34	%	
Age in years, mean $\pm$ SEM	58.2 ($\pm$ 1.6)		54.32($\pm$ 1.8)		0.102
Ethnicity (n)					
brown	18	46.15	27	79.41	
black	5	12.82	2	5.88	
white	16	41.02	5	14.70	
AH (n)	28	71.79	10	29.41	<0.001
DM (n)	11	28.21	5	14.71	0.169
DLD (n)	25	64.10	10	29.41	0.03
Obesity (n)	15	38.46	9	26.47	0.283
Allopurinol (n)	35	89.74			
Colchicine (n)	30	76.92			
Prednisone (n)	7	17.95			
NSAIDs (n)	7	17.95			
Disease duration, years, mean $\pm$ SEM	11.0 ($\pm$ 1.9)				
Deformity (n)	9	23.1			
Tophi (n)	18	46.2			
Arthritis (n)	17	43.6			
No arthritis (n)	22	54.4			
ESR mm/h, median, range	18(2-91)		10 (2-45)		0.066
CRP mg/l, median, range	4.6(1-110)		2.5(1-8.5)		0.001*
Urate mg/dl, mean $\pm$ SEM	7.1 $\pm$ 0.3		5.58 $\pm$ 0.26		0.001**

Statistical analysis using the student's t-test for parametric data and Mann-Whitney test for non-parametric data. Significance level of $p < 0.05$. SEM = Standard error of the mean.

Serum Levels of Inflammatory Cytokines: Serum levels of cytokines were measured in the GG and CG as depicted in table 2.

Table 2: Serum levels of cytokines for GG and CG

	IL-1 β	IL-6	IL-8	IL-17a	IL-18 *	IL-22	IL-23
GG	1.9	4.7	18.1	3.9	62,701.0	71.8	15.6
(pg/ml)	1.9-46.6	4.7-702.6	1.9-702.6	3.9-64.5	$\pm 2,399.0$	15.6-273.8	15.6-384.7
CG	1.9	4.7	27.6	3.9	52,597.0	64.3	15.6
(pg/ml)	1.9-107.9	4.7-171.3	1.9-259.5	3.9-64.5	$\pm 1,805.0$	175.8	15.6-484.6

Median and range, except IL-18, for which mean and SEM are demonstrated.* $p < 0.005$.

The serum level of IL-18 in the GG was significantly higher ($p = 0.0013$) than in the CG. Analysis of the difference between cytokine distribution in the GG and CG showed no statistical significance for the other cytokines studied, according to the p-values provided in figure 2.

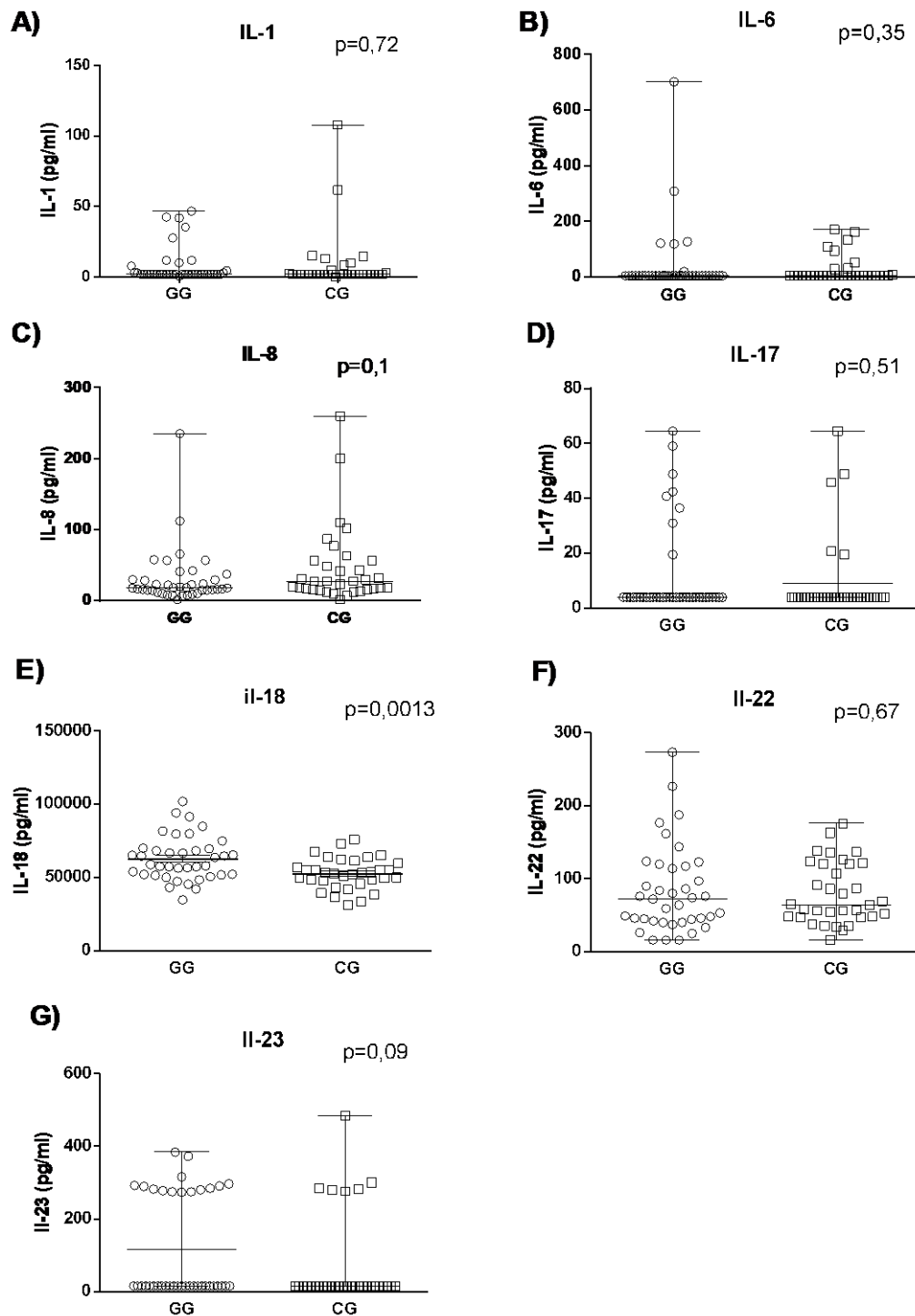


Figure 2 - Comparison of serum cytokine levels in patients with gout and controls. The bars represent the median and range. For IL-18, they represent mean and SEM. Significance level $p<0.05$.

Analysis of correlation between serum cytokine levels and inflammatory activity tests (CRP and ESR) demonstrated a significant positive correlation with

serum levels of IL-18 and IL-6 only for those in the GG (figure 3). No correlation was recorded between the cytokines measured and the serum level of uric acid (data not shown).

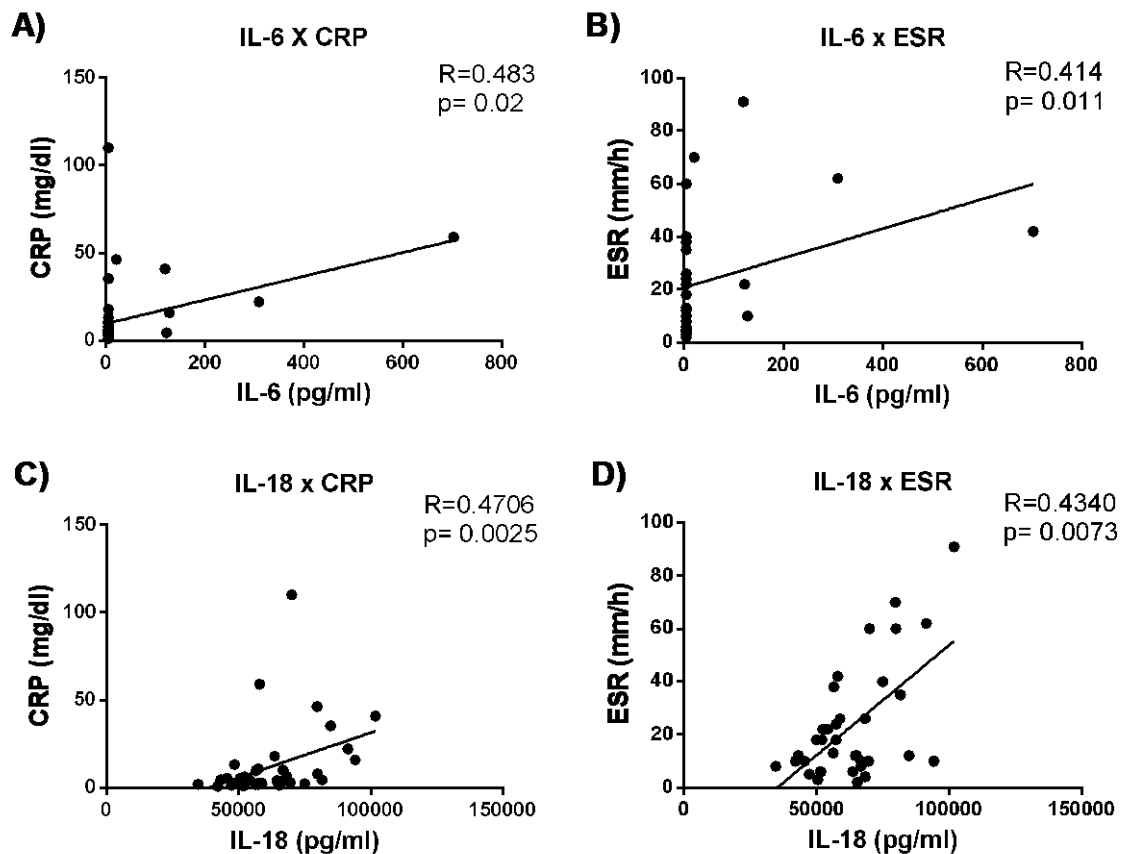


Figure 3: Correlations in the GG for IL-6 with CRP (A) and ESR (B). Correlations of IL-18 with CRP (C) and ESR (D). R = Spearman's correlation coefficient. Significance level $p<0.05$.

Evaluation of the distribution of serum cytokine levels in relation to clinical data showed an association between serum levels of IL-6 and the presence of deformities ($p=0.0008$) and tophi ($p=0.0053$) in the GG. There was no relationship between any other cytokines measured and these or other clinical data (age, race, hypertension, diabetes, dyslipidemia, obesity, use of medication and duration of disease). Distributions of continuous variables were tested in the GG with active arthritis ($n=17$) and in the intercritical period ($n=22$). However, no association was found between the

presence of arthritis and cytokine levels, although a tendency toward association between the presence of arthritis and IL-6 levels ($p=0.054$) was observed.

Table 3 shows the number of patients that expressed each of the tested cytokines divided into groups according to the presence (+) or absence (-) of tophi, deformities and arthritis, respectively. Considering only the patients that had cytokine levels above the detection limit, we also found association of IL-8 and IL-23 with deformities and of IL-8 with tophi. As the number of patients with IL-6 level above the detection limit in the group without tophi, deformities or arthritis was too small ($n=0$ or 1), it was not possible to determine p for IL-6 for these variables.

Table 3: Patients (n) with cytokine levels above detection limit according to stratification by clinical manifestation.

Cytokine GG	N Above limit	Tophi		p	Deformities		p	Arthritis		p
		(+)	(-)		(+)	(-)		(+)	(-)	
IL-1 β	(13/39)	4/18	9/21	0.214	2/9	11/30	0.231	7/17	6/22	0.7133
IL-6	6/39	6/18	0/21	**	5/9	1/30	**	5/17	1/22	**
IL-8	38/39	17/18	21/21	0.043*	8/9	30/30	0.042*	16/17	22/22	0.543
IL-17A	8/39	3/18	5/21	0.999	2/9	6/30	0.214	4/17	4/22	0.486
IL-18	39/39	18/18	21/21	0.119	9/9	30/30	0.292	17/17	22/22	0.109
IL-22	37/39	16/18	21/21	0.519	9/9	28/30	0.851	14/17	21/22	0.804
IL-23	14/39	7/18	7/21	0.155	4/9	10/30	0.013*	6/17	8/22	0.482

*Level of significance = $p<0.05$, **Not possible to determine p value.

Considering the cytokine cascade, we also evaluated whether there was a correlation between the different cytokines and found only a weak association between levels of IL-18 and IL-6 ($r=0.3627$ and $p=0.0233$) and IL-1 β and IL-17A ($r=0.397$ and $p=0.012$) for patients in the GG. No correlation was observed between interleukins in the CG.

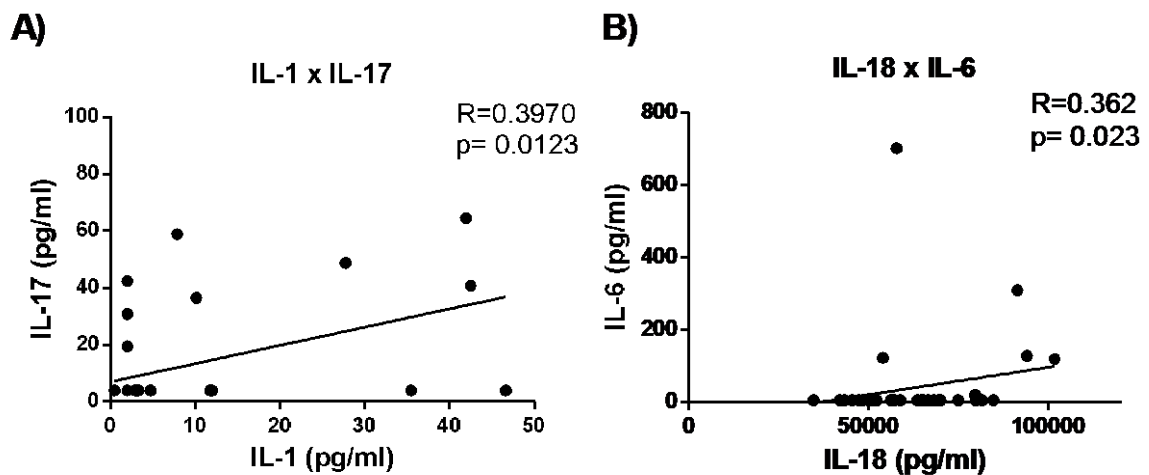


Figure 4: Correlations recorded between cytokines. R = Spearman's correlation coefficient.

Discussion: Several studies have been conducted on chronic inflammatory diseases to understand the molecular trigger of the inflammatory process and its relationship with clinical manifestations of these diseases. Few studies of gout investigate clinical data in relation to serum cytokine levels [8, 12, 23, 31]. Thus, the present study aimed to correlate clinical and laboratory characteristics typically assessed in patients suffering from gout with cytokines for which clinical data demonstrate involvement in the pathogenesis of this disease.

Our data show differences in the proportion of hypertensive and dyslipidemic individuals between the GG and CG. Individuals suffering from gout are known to have a higher prevalence of AH, given the recognized relationship between chronically high uric acid levels and higher blood pressure. There is also an association between hyperuricemia, dyslipidemia and insulin resistance [32, 33]. Barbaro et. al [34] found an association between levels of IL-6, IL-1 β and CRP (as well as IL-10 and TNF) in hypertensive patients with arterial stiffness. Jiang et. al [31] recorded higher levels of oxidized LDL (ox-LDL) in patients with gout compared to controls, with a positive correlation between CRP, IL-6 and ox-LDL in these subjects. The question that emerges is how our results might be affected by the inter-group differences observed in relation to hypertension and dyslipidemia. Patients were therefore separated into groups according to the presence or absence of AH and DLD; however, no difference in cytokine levels was observed.

With the exception of high IL-18 levels in patients, our results showed no statistically significant difference in cytokine levels between patients and controls. The measured cytokine levels were above the average found in the literature for both the GG and CG, although there is still substantial difference in these levels among different studies, particularly when measured in those suffering from inflammatory pathologies [8, 12, 23, 31, 35, 36]. Several factors may be responsible for this variation: sample collection method, time between collection and processing of the sample, and differences between commercial kits of choice, which can alter the measured levels. Collection time may also be a relevant factor: recent data indicate variation in serum cytokine in accordance with circadian rhythm [37]. Disruption in the circadian pattern is reported in rheumatoid arthritis, with higher and more continuous cytokine production than in healthy individuals [38]. However, there are no studies that assess whether patients with acute or chronic gout exhibit changes in basal cytokine secretion. As such, there is a need for greater standardization in collection and measuring techniques, as well as more extensive population studies to determine “normal” values for cytokines.

With respect to the serum levels of cytokines measured specifically for patients with gout, conflicting results are found in the literature, which also differ from our findings. Martin et al [14] recorded results similar to ours for IL-1 β and IL-8 in 45 patients with gout and 46 controls. However, the authors did not assess the correlation between cytokines and patient’s clinical and laboratory data, whereas the present study found high levels IL-18 in patients in relation to controls and an correlation between IL-18 and IL-6 with inflammatory activity. Inokuchi et al [12] observed high IL-18, IL-6 and IL-8 levels in patients with gout suffering from arthritis, but only observed an association with inflammation using serum CRP for IL-6 and IL-8. Possibly the discrepancy involving IL-18 is an effect of the sample size, since both studies found association with manifestations of inflammation. In an experimental model of gout (air pouch model), the authors found that stimulation by monosodium urate did not increase IL-18 expression. They also found no difference in neutrophil aggregation for animals deficient in IL-18 when compared to control rats (wild type) [12]. However, the experimental model may not correspond to what occurs in the disease, particularly in chronic gout, when inflammatory activity is more persistent. In these cases, adaptive immunity may also play an important role. This can be

indirectly inferred by the presence of T lymphocytes (CD4+ and CD8+), B cells and plasma cells in the tophi and tissue samples of patients with gout [39-41].

IL-18 is a cytokine with proinflammatory and immunoregulatory properties produced by inflammasome through activation of caspase-1. It induces the adaptive immune system by stimulating the Th1 response [42] and, in conjunction with IL-12 or IL-15, causes interferon- γ (IFN γ) expression in activated Th1 cells. In the absence of IL-12 and IL-15, IL-18 takes on an immunoregulatory role by inducing IFN γ expression in NK cells. In association with IL-23, it also prompts Th17 response by stimulating IL-17A production by T cells [11]. These properties of IL-18 may be related to perpetuation of the inflammatory process, especially in chronic gout, though further research is needed to evaluate this hypothesis. In the present study we found no association of IL-18 levels with presence of tophi or disease duration. However, we did not assess patients as to the duration of symptoms during gout attacks, which would be an interesting fact to examine in this context.

It is known that IL-1 β and IL-18 share the same production source. In regard to the difference in expression of these two cytokines in our data, we point out the constitutional and continuous expression of IL-18 in peripheral blood mononuclear cells in contrast to the intermittent expression triggered by IL-1 β stimulation [43]. Another factor that may explain the lack of inter-group difference regarding IL-1 β expression is the fact that most patients use colchicine (76.92%). It is reported that colchicine can at least partially inhibit the oligomerization of the NLRP3 inflammasome [44]. Another possibility is the predominantly local action of these cytokines or their production just at the onset of the gout attack, with subsequent rapid degradation.

Although there is considerable experimental evidence (in animal models and cell cultures) of the correlation between high cytokine levels (particularly IL-1 β and IL-6) and inflammatory activity triggered by monosodium urate, there are few clinical studies with data on the behavior of these cytokines throughout the inflammatory process in gout. The results obtained by Martin et al [14] were inconclusive when attempting to compare their analyses during and after the gout attack. Nevertheless, there is a substantial amount of indirect clinical evidence in relation to IL-1 β .

Experimental studies indicating a reduction in the inflammatory process through the use of IL-1 antagonists (anti-IL-1 antibodies and soluble receptors) raised questions as to the clinical relevance of this type of blocking [22, 26]. Clinical studies with canakinumab (anti-IL-1 antibodies), with rilonacept (IL-1 trap) and with anakinra (IL-1 receptor antagonist) demonstrated success in controlling the inflammatory process in gout, clinically corroborating the experimental results previously obtained [26-28, 45, 46].

For IL-22, IL-17A, and IL-23, there are no studies evaluating their levels in gout patients. Considering new data showing participation of T cells in tophi [39-41] and activation of Th17 path by MUS [11], and considering that IL-22 may have a role in the pathogenesis of erosion in other erosive diseases such as rheumatoid arthritis [47] and psoriatic arthritis [48], we decided to evaluate the levels of these cytokines in gout patients. We found no elevation of them and no association with clinical data. However, if we observe the levels of these cytokines only among individuals who expressed them above the detection limit, there may be some association of IL-23 and IL-8 with severity of the disease, as we found higher levels of these cytokines when looking at patients of this group with deformities (and with tophi for IL-8). These data may indicate the connection of cytokine levels with other aspects, not yet investigated, of gout immunology.

Our findings showed a significant association between IL-6 and the presence of deformities and tophi. In line with the literature, we also found a correlation between serum levels of CRP and ESR and IL-6 in patients with gout. These data may reflect a role for IL-6 in determining the disease severity. IL-6, a proinflammatory cytokine whose production may be triggered by the exposure of synoviocytes and monocytes to uric acid, is involved in innate immunity [49], and is also part of the Th2 pathway in the adaptive immune system. It is as well involved in synovial activation and osteoclastogenesis regulation [50], and its association with bone damage in other inflammatory diseases is well documented. In gout, Choe et al. [8] found a negative association between the soluble IL-6 receptor (sIL-6R) and radiographic joint damage scores, though there was no direct correlation with IL-6 levels. The author hypothesizes that these results can be explained by the fact that the evaluated patients were chronic and not experiencing gout attack at the time of their

assessment. However, this raises the question of whether sIL-6R might be generating a negative feedback mechanism, thus explaining the lack of correlation between IL-6 in these chronic patients and greater radiological joint damage.

There are indications that the dysfunctional relationship between IL-6 and its receptor in gout compromises the transition from the neutrophilic to monocytic phase of inflammation, resulting in more severe inflammation and greater probability of joint damage [35]. There are reports of association between high serum levels of IL-6 and CRP [12, 23], both generally correlated with a simultaneous increase in uric acid. Population studies suggest that the inflammatory component measured by increased CRP, which is associated with high levels of uric acid, is directly related to elevated IL-6 content [51, 52]. In the general population increased serum IL-6 has been correlated with more frequent cardiovascular events and heart-related mortality [53, 54]. This correlation may be particularly relevant for patients with gout, since the exacerbation of inflammatory activity and high serum levels of uric acid predispose those suffering from gout to greater cardiovascular risk than the general population [55]. IL-6 may have a direct role in heightened risk among these patients. However, the present study was not designed to evaluate this relationship and further research is needed to investigate this hypothesis.

In conclusion, we found significant differences in serum levels of IL-18 between patients and controls. IL-18 proved to be associated with the intensity of systemic expression in the inflammatory process. Serum IL-6 was also related to increased ESR and CRP and was associated with the presence of tophi and deformities. No other statistically significant associations were observed between serum levels of the evaluated cytokines and clinical or laboratory parameters of the disease. Moreover, there was no significant association between the use of gout medication and cytokine levels.

Acknowledgment: This work was supported by CAPES and CNPq (Brazilian agencies), through the program INCT-if (Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Inovação Farmacêutica), and Universal program nº 476907/213-6.

References

1. Edwards, N.L., *Gout. Clinical Features*, in *Primer on the Rheumatic Diseases*, J.H. Klippel, Editor. 2011: Boston - MA. p. 241-249.
2. Roubenoff, R., et al., *Incidence and risk factors for gout in white men*. JAMA, 1991. **266**(21): p. 3004-7.
3. Martinon, F., K. Burns, and J. Tschopp, *The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta*. Mol Cell, 2002. **10**(2): p. 417-26.
4. Martinon, F., et al., *Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome*. Nature, 2006. **440**(7081): p. 237-41.
5. Terkeltaub, R., et al., *Monocyte derived neutrophil chemotactic factor/interleukin-8 is a potential mediator of crystal-induced inflammation*. Arthritis Rheum 1991. **34**(7): p. 894-903.
6. Guerne, P.A., et al., *Synovium as a source of interleukin 6 in vitro. Contribution to local and systemic manifestations of arthritis*. J Clin Invest, 1989. **83**(2): p. 585-92.
7. Rose-John, S., *IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6*. Int J Biol Sci, 2012. **8**(9): p. 1237-47.
8. Choe, J.Y., G.H. Lee, and S.K. Kim, *Radiographic bone damage in chronic gout is negatively associated with the inflammatory cytokines soluble interleukin 6 receptor and osteoprotegerin*. J Rheumatol, 2011. **38**(3): p. 485-91.
9. di Giovine, F.S., et al., *Urate crystals stimulate production of tumor necrosis factor alpha from human blood monocytes and synovial cells. Cytokine mRNA and protein kinetics, and cellular distribution*. J Clin Invest, 1991. **87**(4): p. 1375-81.
10. Amaral, F.A., et al., *NLRP3 inflammasome-mediated neutrophil recruitment and hypernociception depend on leukotriene B(4) in a murine model of gout*. Arthritis Rheum, 2012. **64**(2): p. 474-84.
11. Conforti-Andreoni, C., et al., *Uric acid-driven Th17 differentiation requires inflammasome-derived IL-1 and IL-18*. J Immunol, 2011. **187**(11): p. 5842-50.
12. Inokuchi, T., et al., *Plasma interleukin (IL)-18 (interferon-gamma-inducing factor) and other inflammatory cytokines in patients with gouty arthritis and*

- monosodium urate monohydrate crystal-induced secretion of IL-18*. Cytokine, 2006. **33**(1): p. 21-7.
13. Liu-Bryan, R., et al., *TLR2 Signaling in Chondrocytes Drives Calcium Pyrophosphate Dihydrate and Monosodium Urate Crystal-Induced Nitric Oxide Generation*. J Immunol, 2005. **74**:**5016-5023**; ;: p. 5016-23.
 14. Martin, W.J., et al., *Differences in MSU-induced superoxide responses by neutrophils from gout subjects compared to healthy controls and a role for environmental inflammatory cytokines and hyperuricemia in neutrophil function and survival*. J Rheumatol, 2010. **37**(6): p. 1228-35.
 15. Martin, W.J., et al., *Monosodium urate monohydrate crystal-recruited noninflammatory monocytes differentiate into M1-like proinflammatory macrophages in a peritoneal murine model of gout*. Arthritis Rheum, 2011. **63**(5): p. 1322-32.
 16. Martin, W.J., M. Walton, and J. Harper, *Resident macrophages initiating and driving inflammation in a monosodium urate monohydrate crystal-induced murine peritoneal model of acute gout*. Arthritis Rheum, 2009. **60**(1): p. 281-9.
 17. Mohamed Hachicha, P.H.N., Shaun R.McColl*, *Inflammatory Microcrystals Differentially Regulate the Secretion of Macrophage Inflammatory Protein 1 and Interleukin 8 by Human Neutrophils: A Possible Mechanism of Neutrophil Recruitment to Sites of Inflammation in Synovitis*. J. Exp. Med., 1995. **182** p. 2019-2025.
 18. Mylona, E.E., et al., *Enhanced interleukin-1beta production of PBMCs from patients with gout after stimulation with Toll-like receptor-2 ligands and urate crystals*. Arthritis Res Ther, 2012. **14**(4): p. R158.
 19. Nishimura, A., et al., *Attenuation of monosodium urate crystal-induced arthritis in rabbits by a neutralizing antibody against interleukin-8*. J Leukoc Biol, 1997. **62**(4): p. 444-9.
 20. Ruggiero, C., et al., *Uric acid and inflammatory markers*. Eur Heart J, 2006. **27**(10): p. 1174-81.
 21. Steiger, S. and J.L. Harper, *Mechanisms of spontaneous resolution of acute gouty inflammation*. Curr Rheumatol Rep, 2014. **16**(1): p. 392.

22. Torres, R., et al., *Hyperalgesia, synovitis and multiple biomarkers of inflammation are suppressed by interleukin 1 inhibition in a novel animal model of gouty arthritis*. Ann Rheum Dis, 2009. **68**(10): p. 1602-8.
23. Urano, W., et al., *The inflammatory process in the mechanism of decreased serum uric acid concentrations during acute gouty arthritis*. jrheum, 2002. **29**(9): p. 1950-3.
24. Mitroulis, I., P. Skendros, and K. Ritis, *Targeting IL-1beta in disease; the expanding role of NLRP3 inflammasome*. Eur J Intern Med, 2010. **21**(3): p. 157-63.
25. Moll, M. and J.B. Kuemmerle-Deschner, *Inflammasome and cytokine blocking strategies in autoinflammatory disorders*. Clin Immunol, 2013. **147**(3): p. 242-75.
26. So, A., et al., *A pilot study of IL-1 inhibition by anakinra in acute gout*. Arthritis Res Ther, 2007. **9**(2): p. R28.
27. Terkeltaub, R., et al., *The interleukin 1 inhibitor rilonacept in treatment of chronic gouty arthritis: results of a placebo-controlled, monosequence crossover, non-randomised, single-blind pilot study*. Ann Rheum Dis, 2009. **68**(10): p. 1613-7.
28. TRAN, A.P. and J. EDELMAN, *Interleukin-1 inhibition by anakinra in refractory chronic tophaceous gout*. International Journal of Rheumatic Diseases 2011. **14**: p. e33–e37.
29. Wallace, S., et al., *Preliminary criteria for the classification of the acute arthritis of primary gout*. Arthritis Rheum, 1977. **20**: p. 895 - 900.
30. Taylor, R., *Interpretation of the Correlation-Coefficient - a Basic Review*. Journal of Diagnostic Medical Sonography, 1990. **6**(1): p. 35-39.
31. Jiang, X., et al., *Oxidized low density lipoprotein and inflammation in gout patients*. Cell Biochem Biophys, 2014. **69**(1): p. 65-9.
32. Pillinger, M.H., P. Rosenthal, and A.M. Abeles, *Hyperuricemia and Gout New Insights into Pathogenesis and Treatment*. Bulletin of the NYU Hospital for Joint Diseases, 2007. **65**(3): p. 215-21.
33. Billiet, L., et al., *Review of Hyperuricemia as New Marker for Metabolic Syndrome*. ISRN Rheumatol, 2014. **2014**: p. 852954.

34. Barbaro, N.R., et al., *Increased arterial stiffness in resistant hypertension is associated with inflammatory biomarkers*. Blood Pressure. **0**(0): p. 1-7.
35. Tsai, P.C., et al., *Analysis of polymorphisms in the promoter region and protein levels of interleukin-6 gene among gout patients*. Clinical and Experimental Rheumatology 2008;. **26**: p. 841-847.
36. Cicuttini, F.M., et al., *Serum IL-4, IL-10 and IL-6 levels in inflammatory arthritis*. Rheumatol Int, 1995. **14**(5): p. 201-6.
37. Nakao, A., *Temporal regulation of cytokines by the circadian clock*. J Immunol Res, 2014. **2014**: p. 614529.
38. Yoshida, K., et al., *Involvement of the circadian rhythm and inflammatory cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis*. J Immunol Res, 2014. **2014**: p. 282495.
39. Dalbeth, N., et al., *Cellular characterization of the gouty tophus: a quantitative analysis*. Arthritis Rheum, 2010. **62**(5): p. 1549-56.
40. Lai, S. and X. Zhou, *Inflammatory cells in tissues of gout patients and their correlations with comorbidities*. Open Rheumatol J, 2013. **7**: p. 26-31.
41. Lee, S.J., et al., *Bone destruction by receptor activator of nuclear factor kappaB ligand-expressing T cells in chronic gouty arthritis*. Arthritis Res Ther, 2011. **13**(5): p. R164.
42. Kaser, A., et al., *Interleukin-18 attracts plasmacytoid dendritic cells (DC2s) and promotes Th1 induction by DC2s through IL-18 receptor expression*. Blood, 2004. **103**(2): p. 648-55.
43. Puren, A.J., G. Fantuzzi, and C.A. Dinarello, *Gene expression, synthesis, and secretion of interleukin 18 and interleukin 1beta are differentially regulated in human blood mononuclear cells and mouse spleen cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(5): p. 2256-61.
44. Nuki, G., *Colchicine: its mechanism of action and efficacy in crystal-induced inflammation*. Curr Rheumatol Rep, 2008. **10**: p. 218 - 227.
45. Chen, K., et al., *Anakinra's efficacy is variable in refractory gout: report of ten cases*. Semin Arthritis Rheum, 2010. **40**(3): p. 210-4.
46. Joosten, L.A.B., et al., *Inflammatory arthritis in caspase 1 gene-deficient mice: Contribution of proteinase 3 to caspase 1-independent production of bioactive interleukin-1 β* . Arthritis & Rheumatism, 2009. **60**(12): p. 3651-3662.

47. Leipe, J., et al., *Interleukin 22 serum levels are associated with radiographic progression in rheumatoid arthritis*. Ann Rheum Dis, 2011. **70**(8): p. 1453-7.
48. Mitra, A., S.K. Raychaudhuri, and S.P. Raychaudhuri, *Functional role of IL-22 in psoriatic arthritis*. Arthritis Res Ther, 2012. **14**(2): p. R65.
49. Guerne, P.A., et al., *Inflammatory microcrystals stimulate interleukin-6 production and secretion by human monocytes and synoviocytes*. Arthritis Rheum, 1989. **32**(11): p. 1443-52.
50. Harre, U., et al., *T cells as key players for bone destruction in gouty arthritis?* Arthritis Res Ther, 2011. **13**(6): p. 135.
51. Ruggiero, C., et al., *Usefulness of uric acid to predict changes in C-reactive protein and interleukin-6 in 3-year period in Italians aged 21 to 98 years*. Am J Cardiol, 2007. **100**(1): p. 115-21.
52. Lyngdoh, T., et al., *Elevated serum uric acid is associated with high circulating inflammatory cytokines in the population-based ColaUS study*. PLoS One, 2011. **6**(5): p. e19901.
53. Harris, T.B., et al., *Associations of elevated interleukin-6 and C-reactive protein levels with mortality in the elderly*. Am J Med, 1999. **106**(5): p. 506-12.
54. Kritchevsky, S.B., M. Cesari, and M. Pahor, *Inflammatory markers and cardiovascular health in older adults*. Cardiovasc Res, 2005. **66**(2): p. 265-75.
55. Meek, I.L., H.E. Vonkeman, and M.A. van de Laar, *Hyperuricaemia: a marker of increased cardiovascular risk in rheumatic patients: analysis of the ACT-CVD cohort*. BMC Musculoskelet Disord, 2014. **15**(174): p. 174.

APÊNDICE B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

HOSPITAL DAS CLÍNICAS

SERVIÇO DE REUMATOLOGIA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convidamos o (a) Sr.(a) para participar, como voluntário (a), da pesquisa **PERFIL DE CITOCINAS DA IMUNIDADE INATA NA GOTA E AVALIAÇÃO DA RESPOSTA À UTILIZAÇÃO *IN VITRO* DO AGONISTA DO PPAR γ GQ-16**, que está sob a responsabilidade da pesquisadora Cláudia Diniz Lopes Marques, que pode ser encontrada na Avenida Professor Moraes Rego, s/n - Cidade Universitária - Recife/PE - CEP 50670-420 - Serviço de Reumatologia da UFPE - sala 133 - Fone 21263576 e 92945459 (podem ser realizadas ligações a cobrar). Também participam também desta pesquisa como médicas e pesquisadoras: Dra. Angela Duarte (F: 99288550) e a Dra. Andrea Tavares Dantas (F: 917215820).

Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar a fazer parte do estudo, rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa o (a) Sr.(a) não será penalizado (a) de forma alguma. O (a) Senhor (a) tem o direito de retirar o consentimento a qualquer tempo, sem qualquer penalidade.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

- O objetivo principal deste estudo é avaliar o efeito de um composto químico (substância que pode se tornar um medicamento) no sangue de pacientes com gota. Para isso não será necessário que o (a) Sr (a) usem este composto como um remédio. Será coletado 10 ml de sangue de uma veia em seu braço e, no laboratório, será adicionado o composto ao sangue, dentro de um tubo de ensaio. Para avaliar como este composto funciona, serão dosadas substâncias que são produzidas pelo organismo humano durante a inflamação, chamadas de citocinas.
- Será solicitado ao (a) Sr (a) que compareça ao ambulatório de reumatologia onde é realizado seu atendimento em dia previamente agendado, para que seja preenchida uma ficha com informações sobre sua doença e do seu

exame físico reumatológico. Em seguida, será coletado o sangue (10 ml) em uma veia de seu braço, em uma única ocasião.

- Os riscos em participar da pesquisa são apenas os decorrentes de uma coleta de sangue comum, podendo ocorrer hematoma (mancha roxa) no local, que desaparece em alguns dias, ou ainda dor durante a coleta. Caso ocorra uma complicação decorrente deste procedimento, os responsáveis pela pesquisa darão todo o suporte necessário e o atendimento será realizado dentro do Hospital das Clínicas.
- Os benefícios desta pesquisa não são individuais, mas podem beneficiar várias pessoas com gota, melhorando o conhecimento dos médicos sobre a doença ou ainda descobrindo um novo medicamento que pode ajudar no tratamento de uma doença é bastante comum e pode provocar grande incapacidade.
- As informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa (fichas clínicas) ficarão armazenados em pastas de arquivo e computador pessoal, sob a responsabilidade da pesquisadora principal, no endereço acima informado, pelo período de 5 anos.
- O (a) senhor (a) não pagará nada para participar desta pesquisa. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidos pelos pesquisadores (ressarcimento de despesas). Fica também garantida indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extra-judicial. Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: Avenida da Engenharia s/n – 1o Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br).

_____ (assinatura do pesquisador)

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO (A)

Eu, _____, CPF _____, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas

dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do estudo **PERFIL DE CITOCINAS DA IMUNIDADE INATA NA GOTA E AVALIAÇÃO DA RESPOSTA À UTILIZAÇÃO *IN VITRO* DO AGONISTA DO PPAR γ GQ-16**, como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo(a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade (ou interrupção de meu acompanhamento/ assistência/tratamento).

Recife, _____ de _____ de _____

Assinatura do participante (ou responsável legal):

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e aceite do voluntário em participar:

Testemunha 1: Nome _____

Assinatura: _____

Testemunha 1: Nome _____

Assinatura: _____

APÊNDICE C - FICHA CLÍNICA

ID: _____

Reg: _____

Data de coleta: ____/____/____

Idade: _____ anos

Data de nascimento: ____/____/____

Tempo de doença (anos): _____ (tentar identificar a data da primeira crise)

Sexo: (1) masculino (2) feminino

Raça: (1) parda (2) negra (3) branca (4) amarela (5) indígena

Comorbidades: (1) HAS (2) DM (3) obesidade (4) Dislipidemia

Estágio clínico de gota: (1) aguda (2) crônica (3) intercrise

Medicações em uso para tratamento da gota:

(a) alopurinol (b) colchicina (c) benzobromarona (d) prednisona (e) AINE

Exame físico articular

Artrite: (1) sim (2) não

(1) Monoarticular (2) Oligoarticular (3) Poliarticular

Bloqueio/deformidade: (1) sim (2) não

Presença de tofos: (1) sim (2) não

Resultados laboratoriais

PCR:

VSH:

Ácido urico: