



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**PAPEL DO RECEPTOR TRPV1 EM UM MODELO
ARTICULAR DE GOTA AGUDA EM RATOS**

TESE DE DOUTORADO

Carin G. H. Hoffmeister

**Santa Maria, RS, Brasil
2014**

PAPEL DO RECEPTOR TRPV1 EM UM MODELO ARTICULAR DE GOTA AGUDA EM RATOS

Por

Carin G. H. Hoffmeister

Tese apresentada ao curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutor em Farmacologia**.

Orientador: Prof. Dr. Juliano Ferreira

**Santa Maria, RS, Brasil
2014**

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação Farmacologia**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Tese de Doutorado

**PAPEL DO RECEPTOR TRPV1 EM UM MODELO
ARTICULAR DE GOTA AGUDA EM RATOS**

elaborada por
Carin G. H. Hoffmeister

como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Farmacologia

COMISSÃO EXAMINADORA

**Juliano Ferreira, Dr. (UFSC)
(Presidente/Orientador)**

Marco Aurélio Martins, Dr. (FIOCRUZ)

Eunice André, Dr^a (UFPR)

Maribel Rubin, Dra. (UFSM)

Flavia Carine Rigo (UFMG)

Santa Maria, 17 de Fevereiro de 2014.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por iluminar meu caminho e me dar forças para seguir sempre em frente.

Ao meu orientador, Juliano Ferreira, pela oportunidade oferecida e pelos ensinamentos.

Aos professores componentes da banca, Marco Aurélio Martins, Eunice André, Maribel Rubin e Flávia Rigo, pela disposição de avaliar meu trabalho e com certeza contribuir com valiosas sugestões ao presente estudo.

Ao meu esposo Paulo Cardoso, por me mostrar o verdadeiro significado da palavra “companheirismo”. Não tenho palavras pra expressar minha gratidão e o meu amor por ti. Obrigada pelo incentivo, paciência, carinho e cuidado que tanto me confortaram para que eu conseguisse seguir em frente.

Aos meus pais Glaci e Osmar, pelo incentivo constante na busca pelo meu ideal.

À minha querida irmã Camila, pelos momentos de apoio e reflexões (principalmente durante as madrugadas cansativas) que contribuíram para que todos os momentos difíceis se tornassem passageiros.

Aos meus amigos e colegas do Labneuro que após todos estes anos se tornaram como uma grande família. Agradeço por tudo que aprendi com vocês, pela parceria, paciência e apoio. Obrigada por todas as palavras de incentivo, foi um privilégio conviver com todos vocês! Em especial, quero agradecer aos meus colaboradores Mateus, Gabriela, Mariane, Sara e Cássia pela sua amizade e principalmente pela ajuda incondicional.

À minha “queridona” amiga Flávia Rigo. Obrigada pela amizade, pelos momentos de alegria, apoio, reflexões e também pela sempre carinhosa acolhida.

Agradeço, enfim, à Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia; ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) agradeço pela concessão da bolsa de estudos.

Por fim agradeço a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para esta tese tornar-se realidade, a minha gratidão e meu respeito. Muito obrigada!

“... Por mais longe que um homem vá, jamais fugirá de si...”.

Jayme Caetano Braun

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-graduação em Farmacologia
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

PAPEL DO TRPV1 EM UM MODELO ARTICULAR DE GOTA AGUDA EM RATOS

Autora: Carin Hoffmeister

Orientador: Juliano Ferreira

Local e data da Defesa: Santa Maria, 17 de fevereiro de 2014.

A gota é um tipo de artrite extremamente dolorosa. Apesar do grande número de fármacos disponíveis para seu tratamento. Muitos causam efeitos adversos que limitam seu uso. Maiores investigações são necessárias para um melhor entendimento dos diferentes mecanismos envolvidos na gota. Verificou-se previamente que o receptor TRPV1, um canal iônico modulado por vários mediadores inflamatórios, mediou as respostas nociceptiva e edematogênica induzidas pela injeção subcutânea de MSU em ratos. Neste modelo plantar, a ativação do TRPV1 dependeu amplamente da ativação de mastócitos. Sendo o ambiente articular amplamente diferenciado quanto a sua constituição celular, questionou-se o envolvimento deste receptor em um modelo mais fidedigno com a clínica dessa artropatia. O objetivo deste estudo foi investigar o papel do TRPV1 em um modelo de gota aguda, induzida pela administração intra-articular (i.a.) de cristais de urato monossódico (MSU) na articulação tíbio-tarsal de ratos. Observou-se que o antagonismo do receptor TRPV1 (pelo antagonista seletivo do receptor TRPV1 SB366791), a desfuncionalização sistêmica (causada pelo tratamento subcutâneo com resineratoxina) ou o silenciamento axonal (com a combinação pericárdica de capsaicina e QX 314) das fibras sensoriais TRPV1-positivas preveniram significativamente os comportamentos relacionados à dor (nociceção espontânea, hiperalgesia ao calor e alodínea mecânica) e à inflamação (edema, extravasamento plasmático, infiltração de leucócitos e produção de IL-1 β) causadas pela administração i.a. de MSU. Adicionalmente, observou-se um aumento expressivo da imunoreatividade do TRPV1 no tecido articular 4 horas após a administração do MSU. Posteriormente investigou-se a possibilidade do NO ser um ativador endógeno do TRPV1 neste modelo. Demonstrou-se que a administração i.a. de MSU induziu um aumento na produção de metabólitos estáveis (NOx) do óxido nítrico (NO) nos exsudatos articulares, o qual foi inibido pela administração i.a. de um inibidor não seletivo da óxido nítrico sintase (NOS). Além disso, o inibidor não seletivo da NOS preveniu a nociceção espontânea, o edema e também o extravasamento plasmático, a infiltração de leucócitos. Por outro lado constatou-se que a administração i.a. de um doador de NO induziu nociceção espontânea e hiperalgesia ao calor, mas não alodínea mecânica ou edema. O antagonismo do receptor TRPV1 preveniu somente o edema causado por esse doador. Assim, estes resultados sugerem que o TRPV1 exerce um papel relevante no desenvolvimento e manutenção das respostas nociceptiva e inflamatória desencadeadas no modelo articular de crise aguda de gota, porém, apenas a resposta edematogênica parece ser mediada pela ativação TRPV1 através do NO.

Palavras-chave: Articulação. Dor. Gota. Inflamação. Óxido nítrico. TRPV1.

ABSTRACT

PhD Thesis

Graduate Course in Pharmacology
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

THE ROLE OF TRPV1 IN AN ACUTE GOUT MODEL JOINT IN RATS

Author: Carin Hoffmeister

Advisor: Juliano Ferreira

Place and date of the defense: Santa Maria, February, 17th, 2014.

The gout is an extremely painful type of arthritis. Despite the large number of drugs available for its treatment, they usually cause many adverse effects that limit their use. Then, further investigations are necessary for a better understanding the different mechanisms involved in gout. It was found previously that TRPV1 receptor, an ion channel modulated by various inflammatory mediators mediated edema and the nociceptive responses induced by subcutaneous injection of MSU in rats. In this plantar model, activation of TRPV1 depended largely on the activation of mast cells. Since the environments articular broadly differ as their cellular constituents, questioned the involvement of this receptor in a more reliable model with this clinical arthropathy. The aim of this study was to investigate the role of TRPV1 in a model of acute gout induced by intra-articular administration (i.a.) of crystals of monosodium urate (MSU) tibio-tarsal articulation rats. It was observed that the antagonism of the TRPV1 receptor (by the selective antagonist SB366791), systemic knockdown (caused by treatment with resiniferatoxin subcutaneous injection a TRPV1 agonist) or axonal silencing (perineural injection a combination of capsaicin and QX-314) sensory fibers TRPV1-positive significantly prevented the pain-related behaviors (spontaneous nociception, heat hyperalgesia, and mechanical allodynia) and inflammation (edema, plasma extravasation, leukocyte infiltration and IL - 1β) was caused by the administration of MSU. Additionally, we observed a significant increase in immunoreactivity of TRPV1 in articular tissue 4 hours after administration of MSU. Subsequently, we investigated the possibility role of NO, an endogenous activator of TRPV1 in this model. The administration of MSU induced an increase in the production of stable metabolites (NOx) emissions of nitric oxide (NO) exudates in the joint, which was inhibited by a selective inhibitor of nitric oxide synthase (NOS). In addition, the non-selective NOS inhibitor prevented the spontaneous nociception, edema and plasma extravasation, and leukocyte infiltration after MSU injection. Moreover it was found that the administration of a NO donor induced heat hyperalgesia and spontaneous nociception, but not mechanical allodynia and edema. The TRPV1 receptor antagonism prevented only the edema caused by that donor. Thus, these results suggest that TRPV1 plays a role in the development and maintenance of nociceptive and inflammatory responses triggered in the model of acute articular gout, but only edematogenic response appears to be mediated by TRPV1 activation by NO.

Keywords : Artuculation. Pain. Gout. Inflammation. Nitric oxide. TRPV1.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1. Ativadores do Receptor de Potencial Transitório Vanilóide 1 (TRPV1)... 27

ARTIGOS

Artigo 1

- Figure 1** – MSU-crystal-induced nociception. Time courses for ongoing pain-like behaviour, heat hyperalgesia and mechanical allodynia caused by intra-articular injection 37
- Figure 2** – MSU-crystal-induced inflammation. Time course and dose response for oedema and time responses for plasma extravasation, total leukocyte infiltration, mieloperoxidase activity and IL-1 β production ... 38
- Figure 3** – Effect of the selective TRPV1 receptor antagonist SB 366791 on MSU-crystal-induced nociception 39
- Figure 4** – Effect of the selective TRPV1 receptor antagonist SB366791 on MSU-crystal-induced inflammation 40
- Figure 5** – MSU i.a. injection enhanced TRPV1 immunoreactivity 40
- Figure 6** – Role of TRPV1-positive sensory fibres on MSU-crystal-induced nociception and oedema 41

Artigo 2

- Figure 1** – Time course of the release of NO into the joint exudate of rats with MSU-induced acute gouty arthritis 67
- Figure 2** – Effect of the non selective NOS inhibitor L-NAME on MSU-crystal-induced nociceptive responses 68
- Figure 3** – Effect of the non-selective NOS inhibitor L-NAME on MSU crystal-induced edematogenic responses 70
- Figure 4** – Effect of the non selective NOS inhibitor L-NAME on MSU-crystal-induced inflammatory responses 4 hours after treatment 71
- Figure 5** – Effect of the NO donor SIN-1 induced nociceptive and edematogenic responses 73
- Figure 6** – Effect of the selective TRPV1 receptor antagonist SB 366791 on NO donor 3-morpholiniosydnonimine (SIN-1) induced nociceptive and edematogenic responses 75
- Figure 7** – Effect of the NOS substrate L-arginine-induced nociceptive and edematogenic responses..... 76
- Figure 8** – Effect of the selective TRPV1 receptor antagonist SB 366791 on NOS substrate (L-arginine)-induced nociceptive and edematogenic responses 78

CONCLUSÃO

Figura 2 – Proposta para a participação do receptor TRPV1, mediada pela modulação por NO, nos mecanismos envolvidos na nocicepção e no edema induzidos pela administração i.a. de cristais de MSU em ratos 97

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO

Tabela 1 – Principais agonistas e antagonistas do receptor TRPV1	29
---	----

ARTIGOS

Artigo 1

Table 1 – Effects of selective receptor TRPV1 antagonist SB 366791 on the i.a. capsaicin-induced nociceptive and oedematogenic responses in rats ...	44
Table 2 – Effects of pre-treatment with RTX on the nociceptive and oedematogenic responses induced by i.a. capsaicin in rats	44
Table 3 – Effects of the peri-sciatic pre-treatment of QX-314 plus capsaicin on the nociceptive and oedematogenic responses induced by i.a. capsaicin in rats	45
Table 4 – Effect of the mast cell stabiliser cromolyn on nociception and oedema observed 4 hours after i.a. injection of compound 48/80 or MSU in rats	46

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	Difosfato de adenosina
AINE	Anti-inflamatório não esteroide
AMP	Monofosfato de adenosina
ANOVA	Análise de variância
ATP	Trifosfato de adenosina
DRG	Gânglio da raiz dorsal
FDA	Food and Drug Administration
GN	Gânglio nodoso
GV	Gânglio vagal
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular 1
IL	Interleucina
M	Molar
Mg	Miligrama
MPO	Mieloperoxidase
MSU	Urato monossódico
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
PBS	Salina tamponada com fosfato
PG	Prostaglandina
RTX	Resiniferatoxina
SP	Substância P
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa

TRP	Receptor de potencial transitório
TRPA1	Receptor de Potencial Transitório Anquirina 1
TRPV1	Receptor de Potencial Transitório Vanilóide 1
VCAM-1	Molécula de adesão de célula vascular 1

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 Gota.....	14
1.1.1. Histórico	14
1.1.2. Epidemiologia	14
1.1.3. Fisiopatologia	15
1.1.4. Progressão Clínica da Gota	18
1.1.5. Tratamento da Gota	19
1.1.6. Dor e dor relacionada à Gota	21
1.1.7. Receptores de potencial transitório (TRP).....	25
2. OBJETIVOS	31
2.1 Objetivo Geral.....	32
2.2 Objetivos Específicos	32
3. MANUSCRITOS	33
3.1 Artigo 1	34
3.2 Artigo 2	47
4. DISCUSSÃO	77
5. CONCLUSÕES	87
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91

APRESENTAÇÃO

O item **INTRODUÇÃO** é constituído de uma revisão sucinta da literatura sobre os temas abordados nesta tese.

Apresenta-se os itens metodologia resultados que compõem esta tese sob a forma de artigo científico publicado e artigo científico enviado para publicação, os quais se encontram no item **ARTIGOS**. Já as seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas encontram-se nos próprios artigos e representam a íntegra deste estudo.

Os itens **DISCUSSÃO**, **CONCLUSÕES** e **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** acham-se no final desta dissertação.

As **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** referem-se somente as citações que aparecem nos itens Introdução e Discussão desta tese.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Gota

1.1.1. Histórico

A Gota, ou artrite gotosa, referida como podagra em 2640 a.C, foi identificada pela primeira vez pelos egípcios. Podagra significa dor no pé, referindo-se mais especificamente à dor no halux (articulação metatarso-falangeal). Cinco séculos antes de Cristo, Hipócrates a descreveu como “artrite dos ricos”, devido à sua associação com a ingestão excessiva de alimentos ricos em proteínas e de álcool. Galeno, seis séculos depois, mencionou os tofos como nódulos duros geralmente depositados sob a pele em torno das articulações, de pacientes com gota. A primeira referência à podagra como “Gota” foi feita pelo monge dominicano Randolfo de Bocking (1197-1258) (NUKI E SIMKIN, 2006). Somente quatro séculos depois, identificou-se o cristal de ácido úrico ao microscópio, sendo descritos como partículas pequenas e transparentes com extremidades pontiagudas semelhantes a giz (NUKI E SIMKIN, 2006). Já a relação do ácido úrico à Gota, menciona-se apenas em 1797, quando o pesquisador WOLLASTON demonstrou a presença de urato em um tofo de sua própria orelha. GARROD declarou que o depósito do urato seria a causa e não a consequência da inflamação ocasionada na Gota (NUKI E SIMKIN, 2006). Dois séculos depois, os pesquisadores FAIRES E MACCARTY ao injetarem os cristais de de urato monossódico (MSU) nas suas próprias articulações, desenvolveram uma rápida inflamação aguda, reproduzindo todas as características de uma crise aguda de gota e conseguiram assim, comprovar a ligação do MSU com a artrite gotosa. Embora este trabalho não tenha definido o mecanismo que iniciou o processo inflamatório, demonstrou que o cristal de MSU era o fator desencadeante da artrite gotosa (FAIRES E MCCARTY, 1962).

1.1.2. Epidemiologia

A gota é uma doença metabólica que acomete, sobretudo, o sexo masculino, ocorrendo geralmente a partir dos 40 anos. As mulheres costumam apresentar a doença aproximadamente em torno dos 60 anos. Alguns dos fatores predisponentes para o surgimento das crises: ser do sexo masculino, o período pós-menopausa (justificado pela queda no nível de hormônios estrógenos), a obesidade, a

insuficiência renal, o uso de determinados medicamentos (diuréticos, aspirina), o consumo excessivo de alimentos ricos em purinas (carne e mariscos) e de bebidas alcoólicas (NEOGI, 2011). Esses fatores estão diretamente ligados ao estilo de vida atual, principalmente em países industrializados, que justifica o aumento da incidência de gota nas últimas quatro décadas entre a população desses países. Embora no Brasil não existam dados que indiquem a prevalência da artrite úrica (como também é chamada), estimativas revelam que no ocidente, mais de 1% dos homens adultos têm gota (MARTINON, 2010) e nos Estados Unidos, a prevalência de hiperuricemia e gota chega a 4% em pessoas acima dos 75 anos (NEOGI, 2011).

1.1.3. Fisiopatologia

O ácido úrico é um ácido fraco (pKa 5,8) que se encontra em grande parte na sua forma ionizada (urato) em pH fisiológico. Nos seres humanos e em alguns primatas, o ácido úrico é o produto final resultante do metabolismo das purinas. Já os demais mamíferos, possuem a enzima uricase responsável pela transformação do urato em alantoína, uma substância de maior solubilidade. Acredita-se que essa enzima sofreu mutações resultando na perda de sua função durante a evolução dos primatas; em decorrência disso, altos níveis de urato predispõem os humanos à gota (BUSSO E SO, 2010; NEOGI, 2011).

Através do balanço entre a ingestão e a síntese de purinas e ainda taxa de excreção é mantido o equilíbrio dos níveis de urato no organismo. Tanto uma superprodução, como uma baixa excreção ou ainda a combinação de ambos pode resultar em hiperuricemia. A hiperprodução de urato pode ocorrer em situações como doenças inflamatórias (neoplasias ou psoríase, por exemplo), intervenção farmacológica (quimioterapia, diuréticos e aspirina), doenças genéticas (déficits enzimáticos no metabolismo de ácido úrico ou aumento da atividade das enzimas envolvidas na sua síntese), hipóxia ou ainda excesso de ingestão alimentar. Já a hipoexcreção é geralmente causada por disfunções renais (como por exemplo insuficiência renal crônica). A principal causa de aumento da uricemia é a excreção renal insuficiente, sendo que aproximadamente 90% dos indivíduos com hiperuricemia são hipoexcretores. Os restantes 10% apresentam hiperuricemia devido à hiperprodução de ácido úrico, embora o rim excrete níveis elevados deste metabólito (hiperexcretores) (NEOGI, 2011).

Quando a concentração máxima de ácido úrico ultrapassa os níveis de saturação no sangue (aproximadamente 6,8 mg/dl), há um aumento do risco de cristalização, sobretudo na presença de condições favoráveis, como a diminuição da temperatura corporal (explicando ataques noturnos), mudanças no pH (p.ex. cetose em pacientes durante o período pós-operatório) e nível de desidratação articular (p.ex. terapia diurética). O urato depositado na articulação ou em tecidos periarticulares possibilita sua ligação a um ânion sódio formando o urato monossódico. O urato monossódico é mais solúvel do que o urato livre a 37°C (BUSSO E SO 2010; NEOGI, 2011).

Sabe-se que os cristais MSU possuem uma notável capacidade de estimular vários mediadores inflamatórios provenientes de células sinoviais, macrófagos e leucócitos, por isso, sua precipitação provoca consideráveis danos ao tecido afetado. Assim, o MSU apresenta-se como um estímulo pró-inflamatório que pode iniciar, amplificar e sustentar uma intensa reação inflamatória (CHOI et al., 2005; DALBETH E HASKARD, 2005). De fato, muitos estudos demonstraram que o influxo de neutrófilos para a membrana sinovial e para a própria sinóvia parece ser a principal característica da fase aguda da gota. Sendo que a interação dos neutrófilos com o MSU desencadearia a liberação de uma variedade de mediadores, como espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (superóxido, peróxido de hidrogênio, oxigênio singleto e óxido nítrico), leucotrieno B₄, prostaglandina E₂ (PGE₂) e interleucinas (como IL-1 e IL-8). Esse episódio envolve a ativação de células endoteliais vasculares, conduzindo à vasodilatação com aumento do fluxo sanguíneo, aumento da permeabilidade a proteínas plasmáticas e finalmente o recrutamento dos leucócitos para tecidos. A expressão de moléculas de adesão tais como E-selectina, molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) e molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM-1) iniciam a ativação endotelial (MATSUKAWA et al., 1998). Além disso, sugere-se que os macrófagos residentes na articulação (sinoviócitos tipo A) ou os que migram para o tecido articular também sejam importantes para a produção de mediadores pró-inflamatórios na gota (DALBETH E HASKARD, 2005).

Adicionalmente, macrófagos e neutrófilos também parecem ser fontes de outro mediador pró-inflamatório, o óxido nítrico (NO). Outras fontes de NO são os condrócitos e os sinoviócitos tipo A, uma vez que ambos expressam uma das isoformas da enzima óxido nítrico sintase (NOS), a óxido nítrico sintase induzível

(iNOS) (SAKURAI et al., 1995; MURRELL et al., 1996). O NO pode ser sintetizado pelas três isoformas de NO sintase. Embora as duas isoformas constitutivas (NOS endotelial e NOS neuronal) sejam críticas para uma grande variedade de funções fisiológicas, a superexpressão da iNOS está envolvida em uma variedade de condições patológicas, incluindo a inflamação. Os principais metabólitos do NO são o nitrito e o nitrato (CHEN et al., 2004). A relevância da atuação do NO na gota enfatiza-se por estudos que mostram a expressão de iNOS aumentada nos tecidos sinoviais de pacientes com gota (CHEN et al., 2004, JU et al., 2011). Ainda, estudos indicam que os cristais de MSU aumentam a expressão de iNOS em macrófagos e condrócitos *in vitro* (CHEN et al., 2004). Além disso, outros pesquisadores já demonstraram que o MSU induz o aumento da expressão da iNOS no tecido plantar de camundongos, embora o inibidor seletivo de iNOS suprima a resposta inflamatória ao MSU (HOLTHUSEN E ARNDT, 1994; ALEY et al., 1998; JU et al., 2011).

Pondera-se que os cristais de MSU podem interagir diretamente com a superfície celular em alguns receptores ou indiretamente por fagocitose (MARTINON et al., 2006). Por fagocitose, subsequente ao englobamento do cristal pelos macrófagos, estes também são ativados, resultando na expressão de fatores pró-inflamatórios, incluindo IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8 e ciclooxigenase-2. Demonstrou-se que a ativação de leucócitos por MSU depende da estimulação da proteína intracelular de reconhecimento de antígenos criopirina, e uma vez ativada recruta a proteína adaptadora (ASC), que por fim ativa a enzima caspase-1 (o complexo formado por estas proteínas é denominado inflamossoma) (MARTINON et al., 2006). A caspase-1 transforma pró-interleucina em interleucina ativa resultando em uma produção de IL-1 β (PÉTRILLI E MARTINON, 2007). Estes mediadores também podem ser produzidos por células residentes no tecido afetado contribuindo com a resposta inflamatória; este é o caso dos sinoviócitos tipo B (tipo fibroblasto) que ao fagocitar os cristais de MSU liberam PGE₂ (DALBETH E HASKARD, 2005). Já a interação direta do MSU pode ocorrer devido ao seu reconhecimento por receptores de membrana, como receptores do tipo Toll (TLRs) 2 e 4, expressos em fagócitos mononucleares. Após essa ativação, estas células serão capazes de fagocitar os cristais de urato monossódico. A proteína adaptadora de TRL, a MyD88, auxilia tal processo sendo capaz de transduzir tal ativação ao fator de transcrição NF- κ B,

levando à expressão de uma variedade de moléculas inflamatórias (como o fator de necrose tumoral, TNF- α ; as interleucinas, IL-6 e IL-8; e a cicloxigenase 2, (COX-2).

É importante ressaltar que apesar de diversos estudos sugerirem que a dor observada na artrite gotosa é subsequente à fagocitose dos cristais de MSU por leucócitos (DALBETH E HASKARD, 2005; FAIRES E MCCCARTY, 1962), também se demonstrou que o urato pode igualmente causar percepções dolorosas na ausência de uma aparente infiltração leucocitária (HOROWITZ et al., 1990; HOFFMEISTER et al., 2011). Deste modo, outros eventos além da ativação leucocitária, devem contribuir para indução da dor durante ataques de gota.

1.1.4. Progressão Clínica da Gota

Embora exista uma variação significativa entre pacientes no desenvolvimento de gota, identificaram-se três fases principais (KEITH E GILLILAND, 2007; MANDELL, 2008). A primeira fase é a hiperuricemia assintomática, uma anormalidade fisiológica comum fortemente associada com a gota. Surpreendentemente, a maioria das pessoas com hiperuricemia não desenvolvem gota. Este aumento de ácido úrico no sangue tem sido associado com hipertensão, diabetes, doença renal e doença cardiovascular. Não há ainda clareza sobre o papel do ácido úrico ou cristais de ácido úrico nestas doenças (FEIG et al., 2008).

Já a segunda fase caracteriza-se por ataques periódicos seguidos de períodos assintomáticos. Esses pacientes geralmente desenvolvem febre, calafrios e dor que se estende ao longo de um período de 6 a 12 horas. Depósitos de cristal e liberação nas articulações causam inchaço e eritema. Nesta fase, a apresentação clínica inicial mais comum é a monoartrite aguda. A articulação mais frequentemente atingida é a primeira metatarso-falângica (50% dos casos), designando-se a crise de podagra. No entanto, podem envolver outras articulações, como a do tarso, tibiotalar, joelho ou punho. A crise geralmente inicia de madrugada exibindo os sintomas clássicos da inflamação: edema, calor, rubor e dor que continuam durante vários dias. Mesmo na ausência de tratamento, os sintomas inflamatórios desaparecem dentro de 7 a 10 dias (RICHETTE E BARDIN, 2010), sendo que em torno de 60% dos indivíduos que tiveram o primeiro ataque de gota sofrerão uma segunda experiência no intervalo de um ano (FERRAZ E O'BRIEN, 1995).

Finalmente, a terceira fase denominada gota tofácea crônica geralmente se desenvolve ao longo dos anos devido à falta de tratamento durante a fase aguda ou intermitente (RICHETTE E BARDIN, 2010). Os ataques seguem por diversos anos, onde as crises se tornam cada vez mais frequentes e intensas. Esse aumento na intensidade pode ser acompanhado pela formação de tofos (aglomerados de cristais de MSU e células imunes nas articulações ou tecidos moles). A formação de tofos ao redor das articulações leva à erosão óssea e deformações, inclusive podendo evoluir para uma forma debilitante (NAKAYAMA et al., 1984).

1.1.5. Tratamento da Gota

O tratamento consiste inicialmente no uso de fármaco(s) para aliviar a dor e abreviar a inflamação durante a crise aguda. Posterior ou concomitantemente se utilizada drogas para corrigir a hiperuricemia subjacente, com o objetivo de prevenir episódios futuros e evitar lesões nas articulações (TERKELTAUB, 2010). Além do tratamento farmacológico, tomam-se outras medidas comuns durante um ataque agudo de gota como: alterar a dieta, manter repouso, descontinuar a ingestão de álcool e proteínas, além de outros agentes precipitantes de crises agudas (uso de diurético, por exemplo). As principais classes de medicamentos utilizados na terapia inicial da gota são os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), a colchicina ou a associação de ambos. Inicia-se o referido tratamento o mais rápido possível (tratamento abortivo) para que tais fármacos sejam mais efetivos. Entretanto, utilizam-se os AINEs com cautela, pois podem provocar lesões gastroduodenais e são contraindicados em pacientes com insuficiência renal e hepática, úlcera péptica, gastrite e hipertensão. Já a administração da colchicina, um componente ativo da planta *Colchicum autumnale* (ROBERGE et al., 1993), deve ser realizada em doses mínimas sendo contraindicada em pacientes com insuficiência renal e hepática além de problemas gastrointestinais (TERKELTAUB, 2010; RICHETTE, 2010; NEOGI, 2011).

Utilizam-se também os anti-inflamatórios glicocorticóides no tratamento de pacientes com gota. Estes podem ser administrados de forma sistêmica, no entanto, por um período curto e em doses controladas, uma vez que causam uma gama de efeitos adversos. Nestes casos, há a alternativa da corticoterapia intra-articular, bastante eficaz e utilizada quando ocorre o acometimento de apenas uma ou duas

articulações. Utiliza-se ambos os tratamentos em doentes com baixa resposta ou intolerância aos AINEs ou à colchicina (TERKELTAUB, 2010).

Oportuno esclarecer que para o tratamento crônico, a terapia consiste no uso de fármacos antihiperuricêmicos, ou seja, que reduzam os níveis de ácido úrico baixando sua produção (drogas uricostáticas) ou aumentando sua excreção renal (drogas uricosúricas). Um dos principais fármacos utilizados no controle da hiperuricemia é o inibidor da xantina oxidase, o alopurinol. No entanto, este pode causar a síndrome de hipersensibilidade que inclui sintomas como febre, intolerância gastrointestinal, problemas hepáticos e falência renal, evita-se o uso em pacientes insuficientes renais e idosos. Neste caso, outra alternativa de antihiperuricêmico é o febuxostate, o qual pode causar erupções cutâneas menos graves e diarreia. Outra opção, ainda, são as drogas uricosúricas como a probenecida que atua inibindo a reabsorção de urato. Este fármaco não se administra em pacientes com problemas renais, pois seus efeitos adversos incluem síndrome nefrótica e nefrolitíase, além de intolerância gastrointestinal e hepatotoxicidade (WORTMANN, 2005; KEITH E GILLILAND, 2007; CHOHAN E BECKER, 2009; TERKELTAUB, 2010).

Alternativamente, para tratar os pacientes intolerantes ou com baixa resposta aos fármacos tradicionais, o FDA (Food and Drug Administration) aprovou em 2010 uma forma recombinante da enzima uricase, a Pegloticase. A função desta enzima é converter o urato em alantoína, reduzindo os níveis séricos de urato. Porém, reações indesejáveis na administração deste fármaco foram comuns, uma vez que a via recomendada é a intravenosa. A imunogenicidade da uricase torna-se um fator limitante para o uso, pois é frequente o desenvolvimento de anticorpos contra estes fármacos, mesmo usando a peguilação da enzima (Terkeltaub, 2010; SCHLESINGER et al., 2011(b)). Outro tratamento inovador é o uso de “agentes anticitocinas”, os quais se mostram uma alternativa promissora para o tratamento da gota. Os fármacos anticitocinas bloqueiam a ação da IL-1 β ou do TNF- α demonstrando eficiência em aliviar rapidamente a dor causada tanto pelos quadros agudos de gota quanto pelos quadros crônicos (TAUSCHE et al., 2004; FIEHN E ZEIER, 2006; SCHLESINGER, 2011(a)). No entanto, esse tipo de fármaco pode causar o desenvolvimento de infecções.

Apesar desse arsenal terapêutico disponível para o tratamento da gota, observa-se que muitos destes são ineficazes ou apresentam toxicidade, ou ainda, custo elevado. Além disso, muitos pacientes mostram apenas uma redução parcial

da dor (50%) que ocorre geralmente após 2-3 dias de tratamento (TERKELTAUB, 2010). Assim, necessitam-se mais estudos para investigar a possibilidade de diferentes mecanismos envolvidos na indução da dor e da inflamação que acompanham as crises agudas de gota; que levará à busca de novos agentes analgésicos e antiinflamatórios mais efetivos e seguros para tratar este tipo de artrite.

1.1.6. Dor e dor relacionada à Gota

A dor foi apontada por Cornelius Celsius (30 a.C.–38 d.C.) como sendo um dos sinais cardinais clássicos da inflamação aguda (WALL, 1999). Atualmente, segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), é definida como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a um dano tecidual real ou potencial (MERSKEY E BOGDUK, 1994).

O processo doloroso relaciona-se a dois componentes: um emocional e um sensorial. O componente sensorial é definido como nocicepção. Entende-se o termo nocicepção (do latim *nocere*, “ferir”) como um conjunto de processos neurais de codificação e processamento de estímulos nocivos, ou seja, é o reconhecimento e a transmissão do impulso nervoso, em resposta a um estímulo nocivo, enquanto a dor é um fenômeno subjetivo, sendo assim, a forma como a sensação é experimentada pelo indivíduo. Baseado nestes conceitos, o termo dor seria mais bem aplicado a seres humanos de que a animais, pelo fato deste termo envolver um componente emocional (NOBACK et al., 1996; LOESER E TREED, 2008; NAVRATILOVA et al., 2010).

Para tanto se classifica a dor em diferentes classes. Inicialmente, a dor, como processo agudo, desempenha o papel de um “sistema de alerta ativado” com o propósito de impedir uma lesão ou como um mecanismo protetor do organismo, uma vez que retém a atenção até se identificar e afastar sua causa (WALL, 1999; BREIVIK et al., 2006). Assim, esse alerta permite a detecção de estímulos nocivos (BASBAUM et al., 2009), e a criação de um sistema “autoprotetor”, ao desencadear uma situação de desestímulo de contato físico e ou movimento do membro afetado, auxiliando assim a recuperação da parte do corpo atingida (WOOLF, 2010). Ao funcionar como um sistema fisiológico protetor serve de alerta essencial para detecção e minimização do contato com estímulos nocivos, como no caso de

superfícies muito quentes ou frias, ou ainda cortantes. Neste caso define-a como dor nociceptiva. O processo doloroso é gerado pela ativação dos nociceptores, os quais são terminações nervosas livres de fibras sensoriais aferentes primárias capazes de serem ativadas por estímulos nocivos e transmiti-los até estruturas supra espinhais envolvidas na sua percepção (WOOLF, 2010).

As fibras sensoriais aferentes primárias são a porta de entrada pela qual os estímulos sensoriais nocivos externos convertem-se em atividade elétrica. Estas fibras são formadas por neurônios sensoriais nociceptivos, cujo corpo celular encontra-se no gânglio da raiz dorsal (DRG) para neurônios que inervam o corpo, (TG) trigeminal para neurônios que inervam a face e nos gânglios nodoso (GN) e vagal (GV) para as vísceras. Ambos têm um ramo axonal periférico (destinado a inervar os tecidos) e um ramo axonal central (destinado a inervar a medula espinhal e o tronco cerebral) (BASBAUM et al., 2009; WOOLF, 2010). Assim, se classificam essas fibras dentro de três principais grupos baseados em critérios anatômicos e funcionais. As primeiras incluem aferentes mielinizados de grande diâmetro (A β) que medeiam a transmissão rápida de estímulos sensoriais inócuos ou não nocivos (estímulos proprioceptivos). Ao contrário, corpos celulares de diâmetros pequenos e médios dão origem a maioria dos nociceptores, incluindo fibras desmielinizadas e condutoras lentas do estímulo sensorial denominadas fibras C e as fibras A δ as quais são pouco mielinizadas e condutoras do estímulo mais rápido (JULIUS E BASBAUM, 2001).

Afirma-se que a transmissão de um processo doloroso se dá através de um sensor nas terminações sensoriais de nociceptores que ao ser ativados, transmitem estímulos mecânicos, térmicos e químicos. Quando a amplitude do potencial é suficientemente alta, potenciais de ação são gerados e conduzidos pelo axônio da fibra nociceptiva até o corno dorsal da medula espinhal. As terminações dos nociceptores, encontrados nas lâminas superficiais do corno dorsal da medula espinhal (especialmente lâminas I e II) onde ocorre a liberação de neurotransmissores envolvidos no processamento da dor, principalmente substância P e glutamato, que por sua vez, estimularão seus respectivos receptores em neurônios de segunda ordem (ZAMPONI et al., 2009).

Salienta-se que os neurônios de segunda ordem formam vias que distribuirão informações para circuitos cerebrais. Os axônios ascendem através da via espinotalâmica, responsável pela atividade discriminatória do estímulo e terminam

dentro do tálamo ventroposterior e ventrobasal, e posteriormente projetam-se para o córtex (HUNT E MANTYH, 2001). A segunda via percorrida pelos axônios provenientes do corno dorsal da medula espinhal é a via espinoparabraquial amidalóide que termina no núcleo parabraquial com projeções para o hipotálamo e para a amígdala, áreas responsáveis por modular as dimensões afetivas e controle autonômico da dor (HUNT E MANTYH, 2001).

A dor fisiológica dificilmente ocorre como um processo isolado. Frequentemente o estímulo nocivo pode estar associado também com inflamação, denominando-se então dor inflamatória. Em relação a sua caracterização temporal, esse tipo de dor, pode apresentar-se como aguda (ocorrência recente) ou crônica (duração longa) (WOOLF, 2010). A dor inflamatória aguda relaciona-se ao processo adaptativo biológico para facilitar o reparo tecidual e cicatricial, no entanto, para auxiliar tal processo, a sensibilidade sensorial é aumentada. Enquanto o processo doloroso agudo (dor nociceptiva ou inflamatória) desencadeia respostas apropriadas para a proteção do organismo, a dor crônica ocorre em situações nas quais o organismo não é capaz de produzir uma resolução da lesão, ou quando a doença mantiver o processo doloroso mesmo após a resolução da lesão. Nesse caso a dor pode deixar de ser um processo fisiológico para se transformar em um estado de doença do sistema nervoso, assumindo um papel totalmente patológico (WOOLF, 2010; LINDSAY et al., 2011 ; CHANDRATRE et al., 2013).

Preleciona-se que o desenvolvimento de hipersensibilidade a estímulos potencialmente nocivos ou mesmo inócuo na área lesada é a principal característica da dor inflamatória e contribui para que o processo cicatricial ocorra sem interferências. Sob tais circunstâncias, os pacientes descrevem desconforto e sensibilidade anormal que passam a perceber estímulos anteriormente inócuos como dolorosos (dor resultante de estímulos não nociceptivos denominada de alodínia). Outra possibilidade é a percepção exacerbada da dor a estímulos anteriormente descritos como dolorosos (dor resultante de estímulos nociceptivos denominada de hiperalgesia). E ainda sensação de dor mesmo na ausência de qualquer estímulo externo (dor espontânea, mais atualmente referida como dor em curso) (LOESER E TREED, 2008; WOOLF, 2010). Essas alterações sensoriais resultam de um fenômeno conhecido como sensibilização, comumente encontrado em processos dolorosos (SCHAIBLE, 2007).

A sensibilização acontece tanto periféricamente, por promover uma redução do limiar de ativação dos nociceptores, quanto centralmente por gerar uma responsividade aumentada da medula espinhal aos estímulos sensoriais (SCHAIBLE, 2007). De tal modo, estes processos resultam em um aumento na magnitude da percepção da dor. Esses fenômenos responsáveis por facilitar o processo doloroso são frequentemente apresentados por indivíduos acometidos por doenças inflamatórias articulares entre elas, a gota (DOUGHERTY et al., 2004; LINDSAY et al., 2011; CHANDRATRE et al., 2013). Nesse caso, tanto células residentes no sítio da lesão (como fibroblastos ou mastócitos, por exemplo) quanto leucócitos recrutados para a região (como neutrófilos, macrófagos e linfócitos) podem causar liberação de mediadores que provocam a sensibilização das fibras sensoriais (LANDIS E HASKARD, 2001; YOSHIDA et al., 2006).

Caracteriza-se a artrite gótica por desencadear crises agudas súbitas bastante dolorosas, localizadas mais comumente na articulação metatarsofalangeal. Relatou-se uma descrição clássica de dor relacionada à gota por volta de 1680, quando o famoso físico inglês Thomas Sydenham descreveu sobre suas sensações durante uma crise aguda: “O paciente vai para a cama e dorme calmamente até aproximadamente duas da manhã quando é despertado por uma dor que acomete geralmente o dedo grande do pé, mas às vezes assalta calcanhar ou o tornozelo. A dor assemelha-se a de um osso deslocado... e esta é imediatamente sucedida por um calafrio, uma ligeira febre...a dor... que é suave no início, aumenta gradualmente mais intensa a cada hora, tão dolorosa que não permite resistir ao peso da roupa nem a agitação de uma pessoa que anda fortemente no quarto” (NUKI E SIMKIN, 2006). Durante as crises agudas de gota, alguns pacientes reportam uma sensação inicial de calor moderado seguido por uma dor em queimação que classificam como excruciante (LINDSAY et al., 2011).

A detecção da sensação dolorosa induzida por calor nocivo parece ser feita pelos receptores de potencial transitório vaniloide 1 (TRPV1). Apesar do receptor TRPV1 participar da produção de dor em diversas patologias, incluindo algumas formas de artrites, seu papel nas crises agudas de gota ainda é pouco conhecido.

1.1.7. Receptores de potencial transitório (TRP)

O primeiro canal TRP, chamado de TRP mutante (mais tarde denominado canônico) foi originalmente identificado em um estudo de foto receptores na mosca *Drosophila melanogaster* (mosca da fruta). Neste estudo observou-se que durante o processo de foto transdução, o estímulo por uma fonte luminosa desencadeava a deflagração de um potencial transitório em animais mutantes e não sustentado como o apresentado pela espécie selvagem. (CATERINA ET AL., 2005). Esta foi a primeira de muitas ligações entre os canais TRP e transdução sensorial (PATAPOUTIAN et al. 2003). Baseado na sequência de aminoácidos e no seu perfil de ativação, os membros da família TRP classificam-se em seis distintas subfamílias: TRPV (Vanilóide), TRPA (Anquirina), TRPC (Canônico), TRPM (Melastatina), TRPP (Polistina) e TRPML (Mucolipina). Além disso, as regiões N- e C-terminal localizam-se intracelularmente, sendo que a região formadora do poro encontra-se entre os domínios transmembrana 5 e 6 (NILLIUS et al., 2005).

Cabe ressaltar que os TRPs são canais iônicos considerados excepcionais pelo fato de serem, na sua maioria, receptores polimodais, ou seja, ativam-se por muitos tipos de estímulos diferentes, como por exemplo, temperatura (calor ou frio), compostos químicos, osmolaridade, estimulação mecânica, lipídios, luminosidade, estresse oxidativo e outros. Estes receptores constituem-se integradores para uma multiplicidade de sinais externos ou internos e por isso, caracterizados como sensores celulares polimodais envolvidos em uma grande variedade de processos celulares (MORAN, 2010). O enorme potencial funcional desses canais é especialmente importante para o entendimento da patogênese de diversas doenças. Consideram-se os TRPs alvos candidatos ao desenvolvimento de novos fármacos. No entanto, o membro da superfamília de TRPs mais alvejado para esta finalidade é o receptor vanilóide subtipo 1 (TRPV1). O TRPV1 apresenta forte relevância em uma ampla gama de patologias, comprovando deste modo, possuir excelente potencial como alvo terapêutico empregado no controle da dor (NILLIUS et al 2005; MORAN, 2010).

1.1.7.1. Receptores de potencial transitório vanilóide 1

O receptor vanilóide subtipo 1 (TRPV1) foi clonado (1997) a partir de culturas de neurônios do gânglio da raiz dorsal, sendo inicialmente identificado como um sensor para o calor nocivo (CATERINA et al., 1997). Este receptor foi o primeiro membro da família de receptores vanilóides (TRPV1 à TRPV6) a ser caracterizado. Esta subfamília é assim denominada (vanilóide), pelo fato de ser sensível a substâncias exógenas irritantes que apresentam um grupamento vanilil em sua estrutura, como a capsaicina (8-methyl-Nvanilil-6-nonanamida – principal e mais irritante constituinte ativo da *Capsicum sp*, popularmente conhecida como pimenta vermelha) e a resiniferatoxina (RTX – irritante presente da planta *Euphorbia resinifera*) (SZALASSI E LUMBERG, 1999) (principais agonistas exógenos e antagonistas – Figura 1).

O referido receptor parece ser um dos principais codificadores de estímulos externos e internos em neurônios sensoriais. Similarmente aos demais receptores TRPs, os receptores TRPV1 formam homotetrâmeros ou heterotetrâmeros funcionais, sendo que todos os monômeros contribuem para a formação do poro e seletividade do canal. A permeação de íons pelo canal é controlada alostericamente através de interações entre as diferentes subunidades e por ativação do canal na região interna do segmento transmembrana seis (SZALLASI et al., 2007; SCHUMACHER, 2010; JARA-OSGUERA et al., 2010) (Figura 1). Dentre os ligantes endógenos dos receptores TRPV1 (endovanilóides) estão a anandamida (AEA), a N-araquidonoildopamina (NADA), o 12-S-ácido hidroperoxieicosatetranoico (12-HPETE), a oleoiletanolamida e N-oleoildopamina, os prótons (pH < 5.2), as espécies reativas de nitrogênio (NO), as espécies reativas de oxigênio (H₂O₂), a bradicinina, o trifosfato de adenosina (ATP), o fator de crescimento do nervo (NGF), o leucotrieno B₄ e a tripsina, que podem ativar ou sensibilizar este canal através das vias de segundos mensageiros e, ainda, por modificação da atividade do receptor (fosforilação ou nitrosilação) (CALIXTO et al., 2005; YOSHIDA et al., 2006; JARA-OSGUERA et al., 2008; BASBAUM et al., 2009; MIYAMOTO et al., 2009; SCHUMACHER, 2010). Além de serem ativados por endovanilóides, os receptores TRPV1 também podem ser ativados pelo calor nocivo (>43°C), e pelas substâncias exógenas irritantes previamente citadas (capsaicina e resiniferatoxina). A ativação do TRPV1 presente nas fibras nociceptivas conduz a um aumento na permeabilidade aos íons Ca²⁺ e Na⁺, produzindo uma despolarização das fibras

sensoriais peptidérgicas. Este processo causa a liberação de neuropeptídeos como a substância P e o gene relatado da calcitonina (CGRP), os quais são responsáveis por mediar o processo de inflamação neurogênica, uma vez que conduzem a eventos como extravasamento plasmático, vasodilatação e recrutamento de leucócitos (SZALLASI et al., 2007; LOESER E TREEDE, 2008)

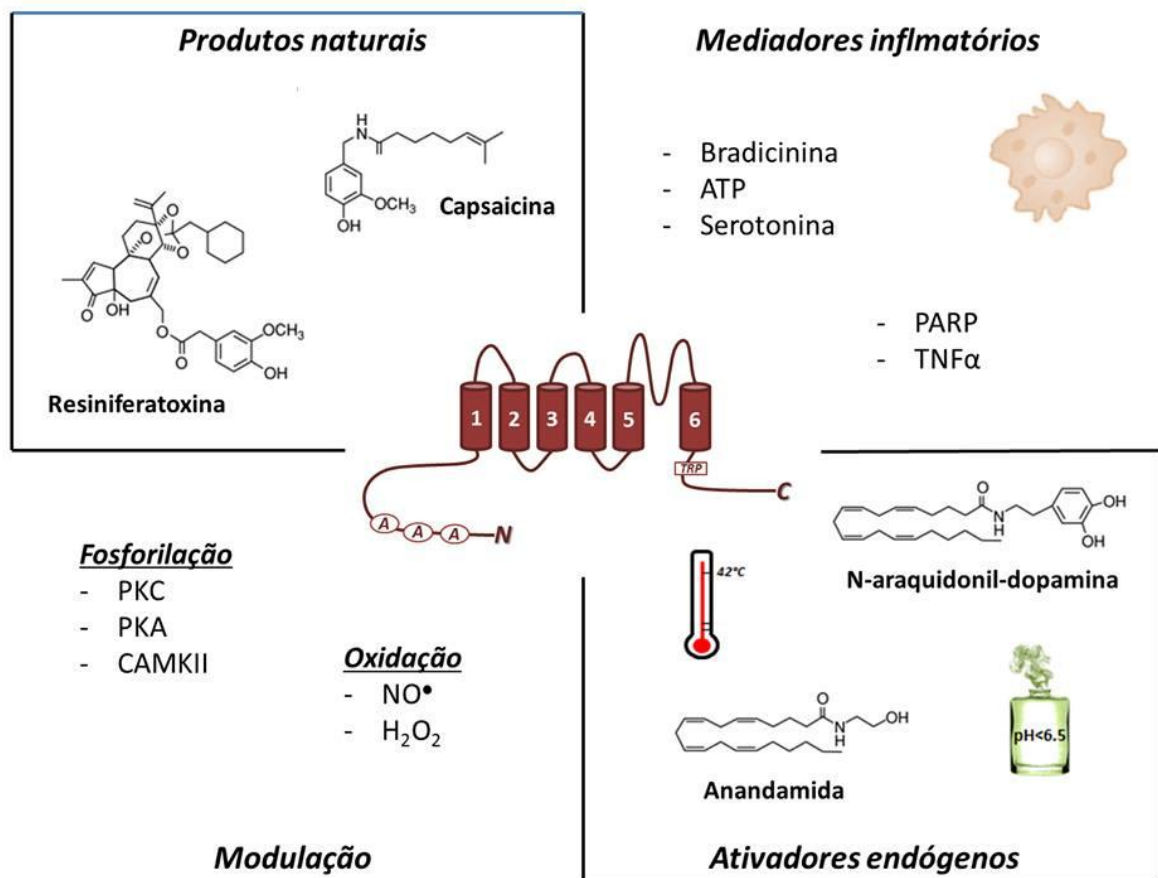


Figura 1. Ativadores do receptor TRPV1

Este canal é expresso em neurônios sensoriais formados por subtipos de fibras aferentes primárias peptidérgicas quase que exclusivamente do tipo C e um pequeno número de fibras do tipo A δ . O corpo celular de tais fibras localiza-se nos gânglios da raiz dorsal, trigeminal, nodoso e vagal. Além disso, o receptor TRPV1 também pode ser encontrado em diversos tecidos não neuronais como em queratinócitos, mastócitos, sinoviócitos e no sistema nervoso central (SZALLASI et al., 2007; SCHUMACHER, 2010; JARA-OSEGUERA et al., 2010).

Adicionalmente, relata-se o aumento da expressão do receptor TRPV1 em diversos modelos animais de inflamação associado ao desenvolvimento de hiperalgesia. Também descreve-se o aumento da imunoreatividade para TRPV1 em diversas doenças dolorosas em seres humanos como, síndrome do intestino irritável, vulvodínia e mastalgia (SZALLASI et al., 2007). A ablação gênica do receptor TRPV1 reduz não somente a sensibilidade à capsaicina, mas também a nocicepção (componente sensorial da dor avaliada em animais experimentais) relacionada a processos inflamatórios (CATERINA et al., 2000). Ao mesmo tempo, alguns agonistas do receptor TRPV1 causam analgesia por uma série de mecanismos propostos como desensibilização, disfunção do nociceptor, depleção de neuropeptídeos e destruição dos terminais sinápticos que expressam TRPV1 (SCHUMACHER et al., 2010). Assim, a aplicação repetida ou a administração de altas doses de capsaicina ou resiniferatoxina provoca desfuncionalização dos canais TRPV1 causando diminuição da nocicepção em modelos animais (SZALLASI E BLUMBERG, 1999) e em humanos (KNOTKOVA et al., 2008).

Dessa forma, ainda hoje, vários estudos mostram o uso de preparações tópicas de capsaicina para o alívio da dor em patologias como neuralgia pós-herpética, neuropatia associada à síndrome do complexo regional, câncer e alguns tipos de artrites. Porém, alguns fatores como a necessidade de várias aplicações de capsaicina e também a dor inicial causada por ela, limitam o tratamento, sendo necessárias alternativas como o uso de anestésicos locais e formulações de liberação prolongada de capsaicina para aumentar a adesão ao tratamento pelos pacientes (SCHUMACHER, 2010). A alternativa recente para este problema foi a descoberta de uma ferramenta farmacológica que permite silenciar rápida e seletivamente apenas as fibras TRPV1 positivas. Trata-se do bloqueador de canais de sódio dependentes da voltagem, QX-314. Quando aplicado em conjunto com o agonista seletivo do receptor TRPV1 (capsaicina) induz o bloqueio seletivo das fibras nervosas que expressam tal receptor (um canal iônico permeável a sódio) ao entrar pela abertura do poro (próprio TRPV1) e bloqueá-lo a partir de sua superfície interna (BRENNEIS et al., 2013).

Tabela 1 – Principais antagonistas do receptor TRPV1.

ANTAGONISTAS

SB 366791

AMG 9810

NGD 8243

AZD 1386

GRC 6211

ABT-102

DWP-05195

SB 705498

GRC 6211

JNJ-39439335

DWP-05195

PAC-14028

1.1.7.2. TRPV1 e Gota

Alguns dados sugerem uma relação entre o receptor TRPV1 e a artrite gotosa. O primeiro indício do envolvimento deste receptor na gota provém do fato de relatos antigos do uso medicinal do extrato de pimenta no tratamento da gota. Além disso, já se demonstrou que o contínuo tratamento tópico com capsaicina, o princípio ativo da pimenta vermelha, ativa o TRPV1 estimulando-o diretamente (causando algesia) ou desfuncionalizando (causando analgesia) os neurônios que expressam este receptor (fibras TRPV1 positivas), mostrou-se benéfico para o alívio da dor de pacientes com alguns tipos de artrites (DEAL et al., 1991; WALKER E MCCLEANE, 2002; MASON et al., 2004; SCHUMACHER, 2010). Adicionalmente, o receptor TRPV1 está envolvido na detecção de estímulos nocivos severos, incluindo calor nocivo, e interessante, descreve-se a dor da gota, durante as crises agudas, como “em queimação”.

De fato, estudos prévios deste grupo demonstraram que o receptor TRPV1 parece estar envolvido nas respostas nociceptiva e edematogênica no modelo de

gota induzido pela administração subcutânea de MSU em pata de ratos (HOFFMEISTER et al., 2011). Porém, se verificou que o MSU não ativa diretamente o TRPV1, e sim que esta estimulação depende amplamente da degranulação de mastócitos. Apesar de interessantes, estes dados podem não se relacionar totalmente com a clínica, pois diferente do tecido subcutâneo, a articulação possui uma constituição particular (por exemplo, proteínas do líquido sinovial e tipos de células residentes) e um número reduzido de mastócitos (BUSSO E SO, 2010; NIGROVIC E LEE, 2007) (Figura 2). Deste modo, estes dados devem ser comprovados em modelos de gota que sejam mais fidedignos ao que ocorre no ataque agudo de gota em seres humanos.

O modelo da administração de MSU na articulação tíbio-tarsal de ratos (CODERRE E WALL, 1988) permite a avaliação de parâmetros inflamatórios (edema, extravasamento plasmático, infiltração celular, atividade da enzima mieloperoxidase e liberação de IL-1 β) e nociceptivos (hiperalgesia mecânica e nocicepção espontânea) que são alguns dos mesmos parâmetros evidenciados em pacientes com artrite gotosa (SHUMACHER, 2010; DALBETH E LINDSAY, 2012). Dessa forma, o presente trabalho pretende investigar se o receptor TRPV1 está envolvido na nocicepção e na inflamação desenvolvidos em um modelo de administração articular de MSU. Também investigar-se-á uma possível relação de óxido nítrico com a ativação de receptores TRPV1 na nocicepção e na inflamação induzidas pela administração de cristais de MSU na articulação tíbio-tarsal de ratos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar o papel do TRPV1 no modelo agudo de gota induzido pela administração intra-articular de cristais de MSU na articulação tíbio-tarsal de ratos.

2.2 Objetivos Específicos

1. Reproduzir e caracterizar o desenvolvimento de novas respostas nociceptivas e inflamatórias induzidas neste modelo;
2. Verificar a participação do TRPV1 nas respostas nociceptivas e inflamatórias induzidas neste modelo;
3. Avaliar a participação das fibras sensoriais TRPV1-positivas nas respostas nociceptivas e inflamatórias induzidas neste modelo;
4. Verificar alterações da imunoreatividade do TRPV1 induzidas neste modelo;
5. Avaliar se os mediadores dos mastócitos estão relacionados com as respostas nociceptivas e inflamatórias induzidas neste modelo;
6. Elucidar a participação do óxido nítrico nas respostas nociceptivas e inflamatórias induzidas neste modelo;
7. Verificar uma possível relação entre o óxido nítrico, a ativação do TRPV1 e as respostas nociceptivas e inflamatórias induzidas neste modelo.

3. MANUSCRITOS

3.1 Artigo 1

Rheumatology Advance Access published October 31, 2013

RHEUMATOLOGY

266

Original article

doi:10.1093/rheumatology/ket352

Participation of the TRPV1 receptor in the development of acute gout attacks

Carin Hoffmeister¹, Mariane Arnoldi Silva², Mateus Fortes Rossato², Gabriela Trevisan², Sara Marchesan Oliveira², Gustavo Petri Guerra³, Cassia Regina Silva² and Juliano Ferreira^{1,2}

Abstract

Objective. The aim of the present study was to investigate the participation of TRPV1 in an acute gout attack model.

Methods. Experiments were conducted to evaluate the participation of TRPV1 in the nociceptive and inflammatory responses (oedema, plasma extravasation, leucocyte infiltration and also IL-1 β production) triggered by IA (ankle) administration of monosodium urate (MSU) in rats using selective antagonist TRPV1 receptor, defunctionalization of sensory fibres and increased immunoreactivity. We have also analysed the inflammatory response. The participation of mast cells in the MSU-induced nociception and inflammation was evaluated using a mast cell stabilizer and a mast cell degranulator compound.

Results. We observed that MSU (1.25 mg/site) injected into the rat ankle joint elicited ongoing pain-like behaviour, hyperalgesia, allodynia and articular oedema as well as plasma extravasation, leucocyte infiltration and IL-1 β production in lavage fluid. All of these events were inhibited by the co-administration of the selective TRPV1 receptor antagonist SB366791 (10 nmol/site). MSU crystals also increased the immunoreactivity of the TRPV1 receptor in the articular tissue of injected animals. Furthermore, the defunctionalization of TRPV1-positive sensory neurons also significantly reduced MSU-induced ongoing pain-like behaviour, hyperalgesia and oedema.

Conclusion. Thus we demonstrate that TRPV1 acts on sensory neurons and plays a relevant role in the nociception and inflammation induced by IA MSU, indicating it as a potential target to treat acute gout attacks.

Key words: arthritis, mast cell, sensory neuron, TRPV1 antagonist, vanilloid receptor.

Introduction

Gout is an inflammatory arthritis characterized by excruciatingly painful acute attacks, a consequence of deposits of monosodium urate (MSU) crystals in joints and peri-articular tissues [1]. In an acute flare of gout the affected joint is red, warm, swollen and painful, all of the hallmarks

of an acute inflammatory response, resulting from intense infiltration of the neutrophils followed by MSU crystal phagocytosis and subsequently by the release of proinflammatory mediators, including the cytokine IL-1 β into the synovial fluid [1–3]. An acute gout attack classically presents severe and debilitating pain affecting the quality of life of patients. Moreover, patients present mechanical allodynia, are unable to bear the weight of their own clothes or body and cannot endure being touched at the affected joint [4, 5].

The pain of the flares has been described as being like a fire in the joints and has been articulated as hot, burning and cooking [5]. The TRPV1 receptor (vanilloid receptor 1), a type of transient receptor potential (TRP), is an ion channel that is important for noxious heat sensation [6]. TRPV1 is activated by heat, protons and some inflammatory lipid mediators, and is the active ingredient in chilli peppers

¹Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, ²Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Bioquímica Toxicológica, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria and ³Núcleo de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Medianeira, Medianeira, PR, Brazil.

Submitted 4 March 2013; revised version accepted 6 September 2013.

Correspondence to: Juliano Ferreira, Department of Chemistry, Federal University of Santa Maria, Avenida Roraima, 1000, Camobi, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil. E-mail: ferreiraj99@gmail.com

Carin Hoffmeister *et al.*

(capsaicin). Regarding its role in rheumatic diseases, TRPV1 is expressed in a subset of sensory neurons, which form small-diameter primary afferent fibres, and in other cell types of articular tissue, including mast cells and synoviocytes [6, 7].

Several pre-clinical and clinical studies have shown that the TRPV1 receptor is involved in different types of arthritis [7–11]. However, the association between TRPV1-related pain and inflammation in acute gout has been poorly studied. Thus we investigated the role of TRPV1 in a model where the administration of MSU into the tibio-tarsal joint of the rat allows for the assessment of nociceptive and inflammatory parameters that are similar to the symptoms presented in acute gout attacks [12].

Materials and methods

Animals

A total of 200 adult male Wistar rats weighing 200–300 g were used in the experiments. Before the experiments the rats were acclimatized to the laboratory for at least 1 h. The experimental protocols were authorized by the Ethics Committee of the Federal University of Santa Maria (process number 108/2011) and were in accordance with current ethics guidelines for the investigation of experimental pain in conscious animals [13].

Drugs

Synthetic MSU crystals were prepared as previously described [14]. Otherwise, all of the reagents were obtained from Sigma (St Louis, MO, USA) except the IL-1 β enzyme immunoassay kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). The final concentrations of dimethyl sulfoxide and Tween 80 did not exceed 0.1%. The maximum dose of SB366791 achievable in a homogeneous suspension was 10 nmol/site.

Injection of urate crystals

Fifty microlitres of an MSU suspension (0.3–1.25 mg/site) was injected into the medial side of the tibio-tarsal joint (ankle) of isoflurane-anesthetized rats [12]. The control group received IA injection of the vehicle alone (PBS).

MSU-induced nociceptive responses

Mechanical allodynia

The mechanical threshold was determined before and after IA joint injection of MSU crystals with flexible nylon von Frey filaments in logarithmic increments of force (6–100 g) using the up-and-down paradigm. The 50% mechanical paw withdrawal threshold response (g) was assessed and its decrease was considered allodynia [15].

Heat hyperalgesia

To evaluate the hypersensitivity to heat stimulation (heat hyperalgesia), we used the Plantar Test apparatus (Ugo Basile, Varese, Italy), as previously described [15]. A radiant light beam generated by a 60-W lightbulb was

directed into the right hind paw in order to determine the paw withdrawal latency (the time spent to remove the paw from the stimulus) before and after IA MSU injection. Significant decreases in paw withdrawal latency in relation to baseline values were interpreted as indicative of heat hyperalgesia.

Ongoing pain-like behaviour

Ongoing pain-like behaviour was assessed using a standing paw pressure score of 0–3, as previously described [12]. The amount of weight the rat was willing to put on the hind paw of the injected limb was evaluated before and after IA MSU injection and categorized according to the following scale: 0, paw pressure equally distributed on both hind paws; 1, paw pressure slightly reduced; 2, paw pressure moderately reduced; 3, paw pressure severely reduced with the foot completely elevated.

MSU-induced inflammatory responses

Oedema

The diameter of the tibio-tarsal joint was measured using a digital calliper [9]. An increase in the joint diameter as compared with baseline values was used as an index of ankle oedema.

Plasma extravasation

Injected ankle synovial cavities were washed with 30 μ l of PBS (10 μ l, three times) to obtain the synovial lavage sample [9]. Afterwards the total protein content was measured colorimetrically by the method of Bradford (1976) using BSA as a standard.

Leucocyte infiltration

Samples of synovial fluid were diluted to a final volume of 200 μ l with Turk's solution and the total number of leucocytes was determined using a Neubauer chamber [16].

MPO activity

The presence of neutrophils in the synovial lavage fluid was evaluated through the measurement of MPO activity [15]. Synovial lavage fluid was mixed with acetate buffer (80 mM, pH 5.5) containing 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB) and 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB). The solution was incubated for 5 min at 37°C and its absorbance was verified with a spectrophotometer (630 nm). Values were expressed as optical density per millilitre of sample.

IL-1 β production

The synovial lavage sample was homogenized in 20 volumes of the appropriate buffer and then centrifuged at 16000 g at 4°C for 10 min and the supernatant was collected. The determination was performed using the IL-1 β enzyme immunoassay kit [16].

TRPV1 receptor involvement in nociceptive and oedematogenic responses induced by MSU

To investigate the possible involvement of TRP receptors in MSU-induced nociceptive and oedematogenic responses,

the selective TRPV1 receptor antagonist SB366791 (1–10 nmol/site) was co-injected intra-articularly with MSU (1.25 mg/site). These parameters were observed and recorded as described above. As a positive control we evaluated the effects of SB366791 on nociceptive and oedematogenic responses caused by capsaicin (10 nmol/site) [17].

Immunoreactivity of TRPV1 receptor

To evaluate the presence of the TRPV1 receptor in the MSU-injected joint (1.25 mg/site), articular tissue samples were collected 1 and 4 h after injection and analysed by western blotting [18]. Samples were homogenized in an appropriate buffer, denatured, separated on 12% SDS (SDS-PAGE) and transferred to polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes. Membranes incubated for 10 min with rabbit polyclonal IgG-specific anti-TRPV1 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) diluted 1:150. The membranes were washed followed by incubation with secondary antibody coupled to alkaline phosphatase (1:3000) for 10 min. Protein bands were developed with the BCIP/NBT system.

Role of TRPV1-positive neurons in MSU-induced nociceptive and oedematogenic responses

The animals anesthetized were treated with resiniferatoxin (120 µg/kg) to selectively defunctionalize the TRPV1-positive neurons, as previously described [19], with some modifications. After 7 days the animals were subjected to IA injection of MSU (1.25 mg/site), capsaicin (10 nmol/site, used as a positive control) or the vehicle (PBS, 50 µl/site) [17]. To confirm the defunctionalization of the TRPV1-positive sensory neurons, the number of eye-wiping movements induced by ocular application of a capsaicin solution (0.1%) was counted [19].

Moreover, TRPV1-positive neurons were silenced by introducing the membrane-impermeant sodium channel blocker QX-314 into these axons via the TRPV1 channel pore [20]. Groups of six rats were anesthetized with isoflurane and injected with 0.2 ml of 0.5% QX-314 or with its vehicle (saline) followed by 0.05% capsaicin or its vehicle (10% EtOH and 5% Tween 80) into the left sciatic notch behind the hip bone. After 1 h the animals were subjected to IA injection of MSU (1.25 mg/site), capsaicin (10 nmol/site, used as a positive control) or vehicle (PBS, 50 µl/site).

Statistical analysis

All of the values are expressed as mean (S.E.M.). The percentages of inhibition were calculated using the maximum responses obtained after injection of MSU when compared with the vehicle-treated animals. The statistical significance between the groups was assessed by the Student's *t*-test or one- or two-way analysis of variance (ANOVA) when appropriate. Post-hoc tests (Dunnett's test for one-way ANOVA or Bonferroni test for two-way ANOVA) were conducted when appropriate. *P*-values <0.05 were considered to be significant. To meet the

ANOVA assumptions, the mechanical allodynia data were subjected to log transformation. The statistical analysis was performed using GraphPad software version 5.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA).

Results

MSU crystal-induced nociceptive responses

The IA injection of MSU crystals (1.25 mg/site) induced a slow onset of ongoing pain-like behaviour that started 2 h after administration, reached the highest values between 4 and 24 h and disappeared altogether 48 h after MSU injection. The treatment also induced heat hyperalgesia that began 2 h after MSU injection, remained largely elevated for the next 4 h and vanished 12 h after MSU administration. The MSU injection also caused a slow onset of mechanical allodynia that started 2 h after injection, remained significant between 4 and 12 h and disappeared altogether 24 h after MSU injection (Fig. 1A, C and E, respectively).

Based on these findings, further experiments of the rats' nociceptive responses were conducted 4 h after injection. At this time the injection of MSU led to nociceptive effects only at the higher dose tested (1.25 mg/site), which induced a 5-fold increase in the ongoing pain-like behaviour score, a reduction of 55% (S.E.M. 7%) of the thermal latency and a decrease of 68% (S.E.M. 13%) of the mechanical threshold compared to the vehicle group (Fig. 1B, D and F, respectively).

MSU crystal-induced inflammatory responses

The IA injection of MSU crystals also induced inflammatory responses in the ankle joint. Oedema formation (evaluated as an increase in ankle joint thickness) began 1 h after MSU injection, remained largely elevated up to 48 h and decreased 72 h after MSU administration. The dose-response curve was measured 4 h after IA injection of MSU, when the MSU produced oedema at the 0.6 and 1.25 mg/site doses. The maximal oedematogenic effect was elicited by a dose of 1.25 mg/site, which induced a 7-fold increase in ankle joint thickness (Fig. 2A and B, respectively).

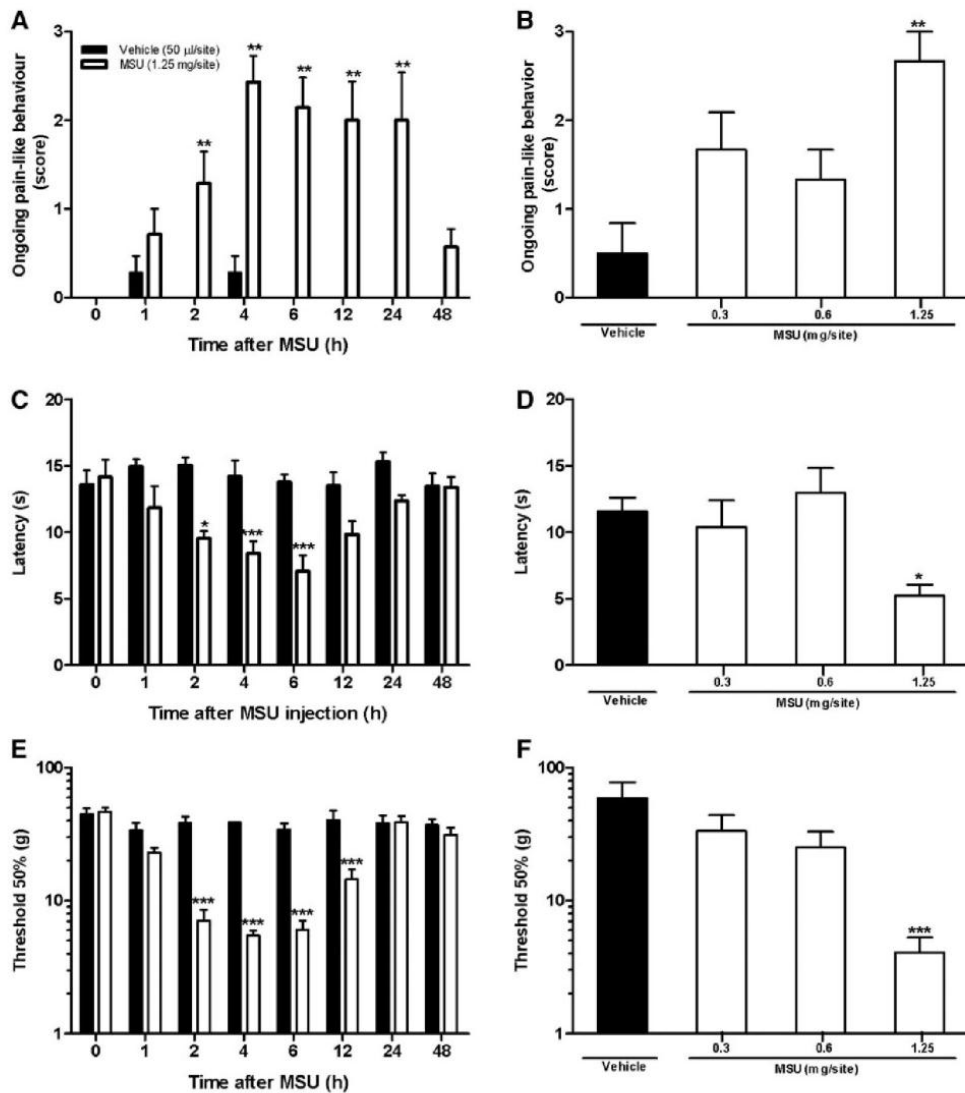
In addition to oedema, MSU (1.25 mg/site) also elicited a 2-fold increase in the plasma extravasation (measured as the protein content in the joint lavage fluid) 1–24 h after its injection (Fig. 2C). Also, 2 and 4 h after MSU injection we detected an increase in the number of total leucocytes and in the MPO activity [5-fold and 62% (S.E.M. 6%) at 4 h, respectively] (Fig. 2D and E). Finally, 1–6 h after MSU injection we also detected an increase in the IL-1 β production (3-fold at 4 h) in the joint lavage fluid (Fig. 2F).

Participation of the TRPV1 receptors in MSU-induced nociceptive responses

The IA co-administration of the selective TRPV1 antagonist SB366791 was able to reduce MSU-induced ongoing pain-like behaviour, heat hyperalgesia and mechanical allodynia. The SB366791 injection (10 nmol/site) led to

Carin Hoffmeister *et al.*

Fig. 1 MSU crystal-induced nociception.



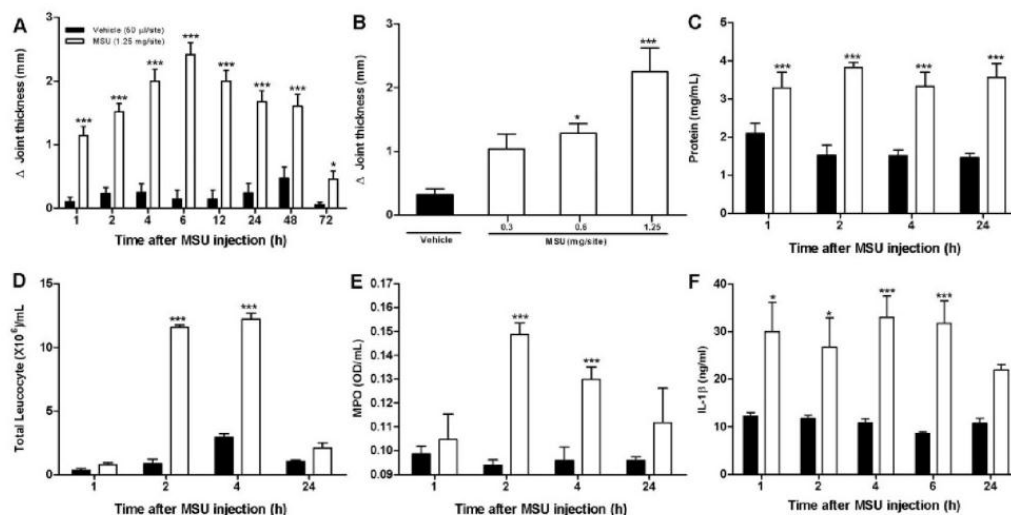
Time courses for ongoing pain-like behaviour (A), heat hyperalgesia (C) and mechanical allodynia (E) caused by IA injection of MSU (1.25 mg/site). Dose-responses for ongoing pain-like behaviour (B), heat hyperalgesia (D) and mechanical allodynia (F) caused by IA injection of MSU (0.3–1.25 mg/site). Each point on the curve represents the mean (S.E.M.) of seven to eight rats. The asterisks denote significance levels: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Two-way ANOVA followed by Bonferroni's post-hoc test (A, C and E) and one-way ANOVA followed by Dunnett's test (B, D and F).

anti-nociceptive effects on the various symptoms studied. The ongoing pain-like behaviour was reduced for only 4 h. The reduction in heat hyperalgesia started 2 h after the injection and lasted up to 4 h. The reduction in mechanical allodynia started 2 h after the injection and lasted up to 6 h (Fig. 3A, C and E, respectively). The 10 nmol/site dose of SB366791 (but not the 1 nmol/site dose) partially decreased the ongoing pain-like behaviour, heat hyperalgesia and mechanical allodynia, with inhibitions of

82% (S.E.M. 9%), 70% (S.E.M. 16%) and 100%, respectively (Fig. 3B, D and F).

IA injection of the TRPV1 receptor agonist capsaicin (10 nmol/site) into the ankle joint also produced intense ongoing pain-like behaviour (6.5-fold greater), heat hyperalgesia [59% (S.E.M. 5%) increase] and mechanical allodynia [42% (S.E.M. 6%) increase] 4 h after injection. Demonstrating the efficacy of the 10 nmol/site dose, the co-administration of SB366791 (10 nmol/site) almost

Fig. 2 MSU crystal-induced inflammation.



Time course and dose-response (0.3–1.25 mg/site) for oedema (A and B) and time responses for plasma extravasation (C), total leucocyte infiltration (D), myeloperoxidase activity (E) and IL-1 β production (F) induced by IA injection of MSU (1.25 mg/site). Each point on the curve represents the mean (S.E.M.) of five to seven rats. The asterisks denote significance levels: * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$. Two-way ANOVA followed by Bonferroni's post-hoc test (A, C, D and E) and one-way ANOVA followed by Dunnett's test (B).

abolished capsaicin-induced nociception [inhibitions of 95% (S.E.M. 12%), 72% (S.E.M. 15%) and 100% (S.E.M. 10%) for ongoing pain-like behaviour, heat hyperalgesia and mechanical allodynia, respectively] (supplementary Table S1, available as supplementary data at *Rheumatology* Online).

Participation of TRPV1 receptors in MSU-induced inflammation

The co-administration of SB366791 was also able to reduce MSU-induced ankle oedema, plasma extravasation, leucocyte infiltration, MPO activity and IL-1 β production. The anti-oedematogenic effect of SB366791 (10 nmol/site, intra-articularly) lasted longer than its antinociceptive effect; it began at 2 h and was still present up to 12 h later (Fig. 4A). Moreover, SB366791 was more potent in the reduction of MSU-induced oedema because it was effective not only at 10 nmol/site, but also at the 1 nmol/site dose [25% (S.E.M. 11%) and 44% (S.E.M. 11%) inhibition, respectively] (Fig. 4B). In addition to oedema, SB366791 (10 nmol/site, intra-articularly) co-injected with MSU (1.25 mg/site, intra-articularly) also largely reduced plasma extravasation, the total leucocyte infiltration, MPO activity and IL-1 β production in the joint lavage fluid, with inhibitions of 74% (S.E.M. 8%), 98% (S.E.M. 3%), 49% (S.E.M. 7%) and 78% (S.E.M. 24%), respectively (Fig. 4C–F). However, we demonstrated that the co-administration of SB366791 was not as effective in reducing oedema [49% (S.E.M. 12%)] as it was in reducing the nociceptive responses induced by capsaicin

(supplementary Table S1, available as supplementary data at *Rheumatology* Online).

Immunoreactivity of TRPV1 receptor

To evaluate the presence of the TRPV1 receptor in the ankle joint and its alteration by MSU, we conducted western blot analysis of the injected articular tissue. TRPV1 immunoreactivity was detected in the ankle joint of the vehicle-treated rats and increased by 60% (S.E.M. 4%) in the MSU-injected joint 4 h after its administration (Fig. 5).

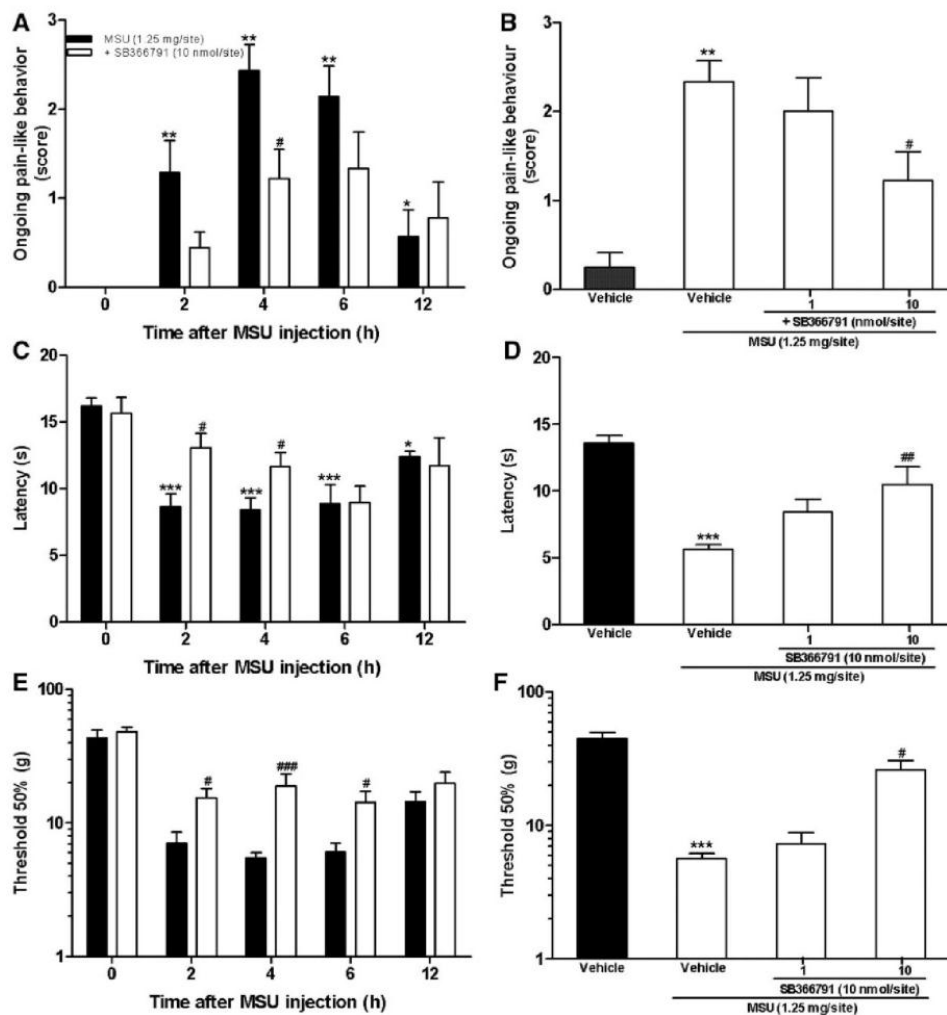
Participation of TRPV1-positive sensory neurons in MSU-induced nociception and inflammation

To investigate the role of TRPV1-positive sensory neurons on MSU-induced nociception and inflammation, we defunctionalized the neurons by systemic treatment with resiniferatoxin. Confirming the defunctionalization, the number of eye wipes induced by capsaicin (0.1%) of the resiniferatoxin-treated rats decreased when compared with the vehicle-treated rats [0.2 (S.E.M. 0.1) vs 11.0 (S.E.M. 1.0) wipes, respectively, * $P < 0.0001$, Student's *t*-test, $n = 7$]. Resiniferatoxin treatment effectively reduced ongoing pain-like behaviour, heat hyperalgesia, mechanical allodynia and oedema 4 h after MSU injection (1.25 mg/site) 68% (S.E.M. 15%), 65% (S.E.M. 16%), 97% (S.E.M. 19%) and 60% (S.E.M. 7%), respectively (Fig. 6).

Similar to MSU, capsaicin-induced ongoing pain-like behaviour, heat hyperalgesia, mechanical allodynia and

Carin Hoffmeister *et al.*

Fig. 3 Effect of the selective TRPV1 receptor antagonist SB366791 (10 nmol/site) on MSU crystal-induced nociception.



Time course or dose-response curves for ongoing pain-like behaviour (A, B), heat hyperalgesia (C, D) and mechanical allodynia (E, F) induced by IA injection of MSU. Each point on the curve represents the mean (S.E.M.) of seven to nine rats. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ in comparison with baseline values (time 0), and # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ in comparison with MSU plus the vehicle injection. Two-way ANOVA followed by Bonferroni's post-hoc test (A, C and E) and one-way ANOVA followed by Dunnett's test (B, D and F).

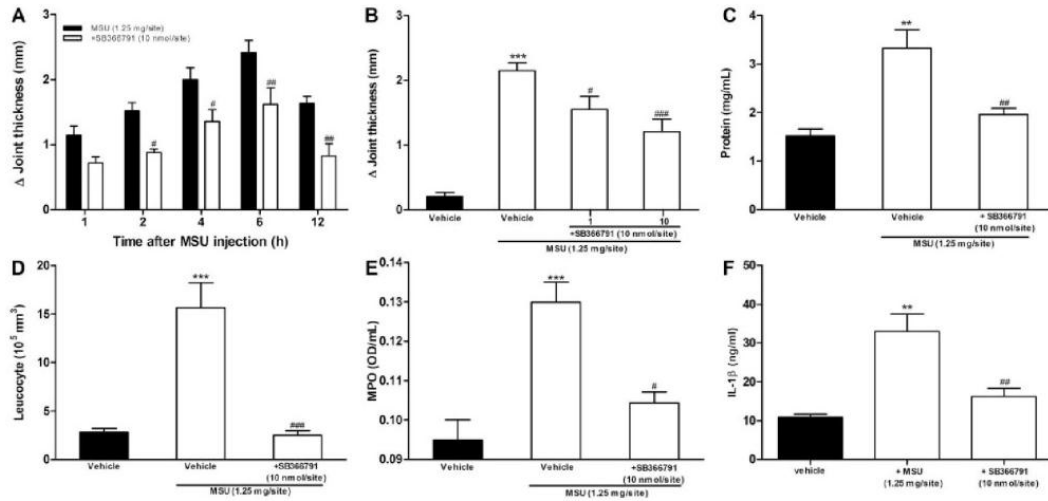
oedema were largely reduced by pre-treatment with resinerferatoxin, with inhibitions of 96% (S.E.M. 24%), 100% (S.E.M. 5%), 93% (S.E.M. 17%) and 66% (S.E.M. 7%), respectively (supplementary Table S2, available as supplementary data at *Rheumatology Online*).

To confirm this result, TRPV1-positive neurons were selectively silenced by perisciatic injection of QX-314 plus capsaicin. TRPV1-positive neurons silencing also largely reduced nociceptive and oedematogenic responses elicited by MSU or capsaicin (supplementary Table S3, available as supplementary data at *Rheumatology Online*).

Discussion

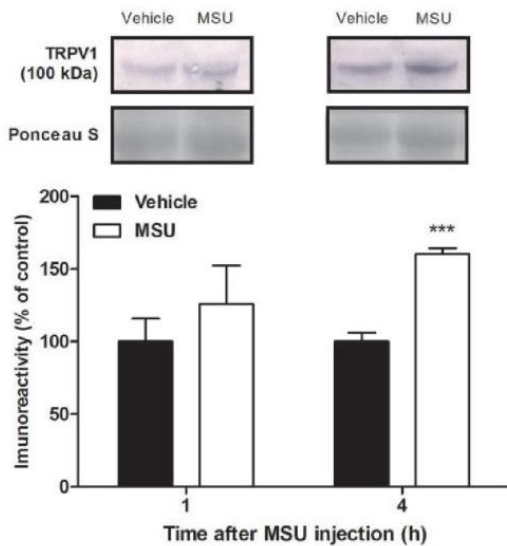
We investigated the participation of TRPV1 in acute attacks of gout using the preclinical model of MSU injection into the ankle joint because gout typically affects the distal joints [12]. The MSU elicited nociception, exhibited as ongoing pain-like behaviour, mechanical allodynia and heat hyperalgesia, and inflammatory responses associated with articular oedema, plasma extravasation, cell infiltration and IL-1 β production. All of these events were reduced by local treatment with a selective TRPV1 receptor antagonist and by

Fig. 4 Effect of the selective TRPV1 receptor antagonist SB366791 on MSU crystal-induced inflammation.



Time and dose-response curves for SB366791 (1–10 nmol/site) on oedema (A and B, respectively). Effect of SB366791 on MSU-induced plasma extravasation (C), leucocyte infiltration (D), myeloperoxidase activity (E) and IL-1 β production (F). Each column represents the mean (s.e.m.) of seven to nine rats. $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ in comparison with the vehicle-injected group. $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$, $^{\#\#\#}P < 0.001$ in comparison with the MSU plus vehicle-injected group Two-way ANOVA followed by Bonferroni's post-hoc test (A) and one-way ANOVA followed by Dunnett's test (B–F).

Fig. 5 MSU IA injection enhanced TRPV1 immunoreactivity.



Effect of the vehicle or MSU (1.25 mg/site) IA injection on the immunoreactivity of TRPV1 in the articular tissue of the ankle joint 4 h after treatment. To demonstrate equal loading, representative Ponceau-stained protein bands are shown. Data are expressed as the mean (s.e.m.) from four rats. $^{***}P < 0.0001$ when compared with the vehicle group, Student's *t*-test.

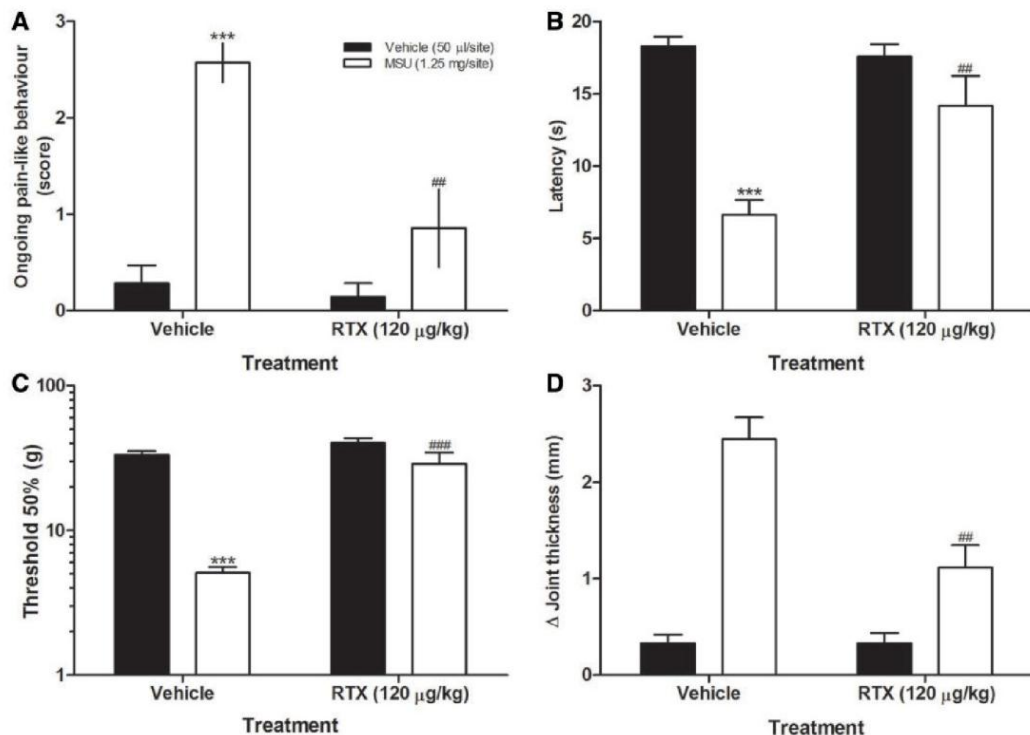
TRPV1-positive neurons defunctionalization. We also observed an increase in the immunoreactivity of the TRPV1 protein in the rat articular tissue after IA MSU injection. Altogether, these results indicate the relevant role of TRPV1 in the development of acute gout attacks.

Similar to previously reported results [12], we observed that intra-articularly MSU-injected rats presented slow and long-lasting nociceptive behaviours. Our data are in accordance with the clinical findings, where acute flares of gout are characterized by the development of severe ongoing pain-like behaviour [4, 5, 22]. Another symptom of gout is an initial warm sensation in the affected joint in humans [22]. This symptom was consistent with our findings because MSU-injected animals presented long-term heat hyperalgesia, an effect that is related to TRPV1 stimulation in inflammatory settings [9, 23]. Additionally, during acute attacks, gout patients are usually unable to bear the weight of their own clothes or body or to touch the affected joint, a nociceptive hypersensitivity called mechanical allodynia [24]. Here, all of these nociceptive behaviours were observed in the animals after MSU injection and remained intense for several hours, mimicking an acute gout attack [22, 25].

TRPV1 has been shown to be involved in several painful inflammatory conditions, including some forms of arthritis [7, 11, 26]. Data show that IA capsaicin injection produces nociceptive responses in rats [17]. We investigated the participation of TRPV1 in nociception induced by MSU crystals in rat ankle joints. We found that treatment with the selective TRPV1 antagonist SB366791, in an

Carin Hoffmeister *et al.*

Fig. 6 Role of TRPV1-positive sensory fibres on MSU crystal-induced nociception and oedema.



Systemic pre-treatment with resiniferatoxin (RTX) (120 µg/kg, 7 days prior to MSU injection) on the ongoing pain-like behaviour (A), heat hyperalgesia (B), mechanical allodynia (C) and oedema (D) induced 4 h after IA injection of MSU (1.25 mg/site). Each column represents the mean (S.E.M.) of seven rats. *** $P < 0.001$ in comparison with the vehicle plus the vehicle-injected group. ## $P < 0.01$ and ### $P < 0.001$ in comparison with the vehicle plus the MSU group. Two-way ANOVA followed by Bonferroni's post test (A–D).

effective dose that largely prevented capsaicin-induced articular nociception and oedema, produced a significant reduction of nociceptive responses triggered by IA MSU injection. Accordingly, TRPV1 antagonists reduced nociception caused by MSU administered into the subcutaneous tissue of rats [14] or in the stifle joints of dogs [27]. Although systemic administration of a TRPV1 antagonist in dogs produced anti-nociception, it caused hyperthermia, a common side effect of selective TRPV1 receptor antagonists [27, 28]. Here, IA treatment with SB366791 did not induce changes in the body temperature of the animals (data not shown). This finding suggests that local administration of selective TRPV1 antagonists may be an alternative way to produce analgesia and avoid hyperthermia caused by systemic administration because IA medications are already used to treat certain cases of gout [29, 30].

Beyond the pain, gout attacks present other signs of inflammation. In agreement with preclinical and clinical studies [1, 8, 30, 31] we observed that MSU injection induced plasma extravasation and oedema formation, leucocytosis, an increase in MPO activity and IL-1 β production. In accordance with previous studies [2, 25], MSU

injection-induced leucocyte infiltration was observed in parallel with the increase in MPO activity, indicating that leucocyte infiltration in the synovial fluid of MSU-injected rats was composed mostly of neutrophils. Data show that IL-1 β inhibition prevented pain and ankle joint inflammation in response to IA MSU crystals in mice and gout attacks in humans [32, 33]. Additionally, pharmacological blockade of the IL-1 β pathway reduces neutrophil influx in response to MSU [34]. Accordingly, we observed that MSU injection increased IL-1 β at the injection site, reinforcing the hypothesis that IL-1 β signalling plays a relevant role in MSU-induced joint pain and inflammation in gout.

The administration of SB366791 also prevented oedema formation, plasma extravasation, leucocyte infiltration, the increase in the MPO activity and the IL-1 β production caused by IA MSU. Accordingly, TRPV1-mediated inflammation in rodent models contributes to vascular permeability alteration and oedema formation, and therefore IL-1 β production [9, 35, 36]. Also, the activation of TRPV1 has been shown to be crucial in mediating increased leucocyte rolling in the joint [37]. It is well known that TRPV1 activation elicits plasma

extravasation, oedema and leucocyte accumulation by the stimulation of sensory neurons (a process called neurogenic inflammation) [38]. These findings suggest a relevant role for neuronal TRPV1 channels not only in pain, but also in other signs of the inflammatory process triggered by MSU.

TRPV1 agonists (as capsaicin and resiniferatoxin) cause nociception and inflammation that last minutes to hours after their injection. In addition, these agonists may also defunctionalize TRPV1-positive neurons and produce analgesia several days after injection [6, 19]. Thus the defunctionalization of TRPV1-positive neurons is used clinically for treating some types of arthritis pain [26, 39–41]. In fact, we have shown that systemic treatment with resiniferatoxin significantly reduces MSU-mediated nociceptive and oedematogenic responses. To confirm the participation of neuronal TRPV1-positive cells in these responses, these were selectively silenced by perisciatic injection of QX-314 plus capsaicin [20]. This silencing reduced nociception and oedema. Thus we can infer that TRPV1 receptors found in neuronal cells exert an important role in the development of acute gout attacks, and TRPV1 receptors found in other cells cannot be excluded.

We previously demonstrated that mast cell degranulation leads to TRPV1 sensitization, pain and inflammation after subcutaneous administration of MSU in rats [14]. However, we observed that the mast cell membrane stabilizer cromolyn was only able to prevent the nociceptive and oedematogenic responses induced by the IA compound 48/80 (a mast cell degranulator), but not by MSU [21, 42, 43] (supplementary Table S4, available at *Rheumatology* Online). These findings suggest that mast cell degranulation may cause nociception and inflammations in articular tissue, but this is not essential to the development of acute gout attacks.

Finally, we demonstrated that MSU crystals caused an increase in the immunoreactivity of the TRPV1 channel in the articular tissue 4 h after MSU injection, corresponding with the peak of both nociception and inflammation responses. Thus a greater amount of TRPV1 may be activated or sensitized by several stimuli during acute gout attacks. Some stimuli that directly or indirectly stimulate TRPV1 are present in the articular tissue during acute gout attacks, such as low pH, high temperature, leucotrienes and inflammatory cytokines [8, 22, 25, 44].

In conclusion, our findings reveal that TRPV1 activation plays a relevant role in the development of pain and inflammation induced by articular MSU. Thus TRPV1 may be a potential target for the development of new therapies to treat acute gout attacks.

Rheumatology key messages

- TRPV1 receptor inhibition reduces pain and inflammation in a rodent model of acute gout attacks.
- TRPV1 is a potential target for new therapies to treat acute attacks in gouty patients.

Acknowledgements

The authors thank the fellowships from CNPq and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (Brazil).

Funding: This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) (Brazil) to J.F.

Disclosure statement: The authors have declared no conflicts of interest.

Supplementary data

Supplementary data are available at *Rheumatology* Online.

References

- 1 Neogi T. Clinical practice. Gout. *N Engl J Med* 2011;364: 443–52.
- 2 Dalbeth N, Haskard DO. Mechanisms of inflammation in gout. *Rheumatology* 2005;44:1090–6.
- 3 Martinon F, Pétrilli V, Mayor A *et al.* Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* 2006;440:237–41.
- 4 Keith MP, Gilliland WR. Updates in the management of gout. *Am J Med* 2007;120:221–4.
- 5 Lindsay K, Gow P, Vanderpyl J *et al.* The experience and impact of living with gout: a study of men with chronic gout using a qualitative grounded theory approach. *J Clin Rheumatol* 2011;17:1–6.
- 6 Ferreira J, da Silva GL, Calixto JB. Contribution of vanilloid receptors to the overt nociception induced by B2 kinin receptor activation in mice. *Br J Pharmacol* 2004;141: 787–94.
- 7 Engler A, Aeschlimann A, Simmen BR *et al.* Expression of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) in synovial fibroblasts from patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;359:884–8.
- 8 Matsukawa A, Yoshimura T, Maeda T *et al.* 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;78:559–69.
- 9 Keeble J, Russell F, Curtis B *et al.* Involvement of transient receptor potential vanilloid 1 in the vascular and hyperalgesic components of joint inflammation. *Arthritis Rheum* 2005;52:3248–56.
- 10 Barton NJ, McQueen DS, Thomson D *et al.* Attenuation of experimental arthritis in TRPV1R knockout mice. *Exp Mol Pathol* 2006;81:166–70.
- 11 Valdes AM, De Wilde G, Doherty SA *et al.* The Ile585Val TRPV1 variant is involved in risk of painful knee osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 2011;70: 1556–61.
- 12 Coderre TJ, Wall PD. Ankle joint urate arthritis in rats provides a useful tool for the evaluation of analgesic and anti-arthritic agents. *Pharmacol Biochem Behav* 1988; 29:461–6.

Carin Hoffmeister *et al.*

- 13 Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 1983;16: 109–10.
- 14 Hoffmeister C, Trevisan G, Rossato MF *et al.* Role of TRPV1 in nociception and edema induced by monosodium urate crystals in rats. *Pain* 2011;152:1777–88.
- 15 Silva MA, Trevisan G, Klafke JZ *et al.* Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Aloe saponaria* Haw on thermal injury in rats. *J Ethnopharmacol* 2013;146: 393–401.
- 16 Pinto LG, Cunha TM, Vieira SM *et al.* IL-17 mediates articular hypernociception in antigen-induced arthritis in mice. *Pain* 2010;148:247–56.
- 17 Davis AJ, Perkins MN. Substance P and capsaicin-induced mechanical hyperalgesia in the rat knee joint; the involvement of bradykinin B1 and B2 receptors. *Br J Pharmacol* 1996;118:2206–12.
- 18 Gewehr C, da Silva MA, dos Santos GT *et al.* Contribution of peripheral vanilloid receptor to the nociception induced by injection of spermine in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 2011;99:775–81.
- 19 Steiner AA, Turek VF, Almeida MC *et al.* Nonthermal activation of TRPV1-expressing sensory neurons by targeted axonal silencing. *J Neurosci* 2013;33:315–26.
- 20 Lam FY, Ferrell WR. Neurogenic component of different models of acute inflammation in the rat knee joint. *Ann Rheum Dis* 1991;50:747–51.
- 21 Faires JS, McCarty DJ Jr. Acute arthritis in man and dog after intrasynovial injection of sodium urate crystals. *Lancet* 1962;2:682–5.
- 22 Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB *et al.* Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 2000;288:306–13.
- 23 Nuki G, Simkin PA. A concise history of gout and hyperuricemia and their treatment. *Arthritis Res Ther* 2006; 8(Suppl 1):S1.
- 24 Schumacher HR, Phelps P, Agudelo CA. Urate crystal induced inflammation in dog joints: sequence of synovial changes. *J Rheumatol* 1974;1:102–13.
- 25 Deal CL, Schnitzer TJ, Lipstein E *et al.* Treatment of arthritis with topical capsaicin: a double-blind trial. *Clin Ther* 1991;13:383–95.
- 26 Cathcart CJ, Johnston SA, Reynolds LR *et al.* Efficacy of ABT-116, an antagonist of transient receptor potential vanilloid type 1, in providing analgesia for dogs with chemically induced synovitis. *Am J Vet Res* 2012;73: 19–26.
- 27 Gavva NR, Treanor JJ, Garami A *et al.* Pharmacological blockade of the vanilloid receptor TRPV1 elicits marked hyperthermia in humans. *Pain* 2008;136:202–10.
- 28 Terkeltaub R. Update on gout: new therapeutic strategies and options. *Nat Rev Rheumatol* 2010;6:30–8.
- 29 Szallasi A, Cortright DN, Blum CA *et al.* The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept. *Nat Rev Drug Discov* 2007;6: 357–72.
- 30 VanItallie TB. Gout: epitome of painful arthritis. *Metabolism* 2010;59:S32–6.
- 31 Cronstein BN, Sunkureddi P. Mechanistic aspects of inflammation and clinical management of inflammation in acute gouty arthritis. *J Clin Rheumatol* 2013;19:19–29.
- 32 Torres R, Macdonald L, Croll SD *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;68:1602–8.
- 33 So A, De Smedt T, Revaz S *et al.* A pilot study of IL-1 inhibition by anakinra in acute gout. *Arthritis Res Ther* 2007;9:R28.
- 34 Lee YM, Kang SM, Lee SR *et al.* Inhibitory effects of TRPV1 blocker on UV-induced responses in the hairless mice. *Arch Dermatol Res* 2011;303:727–36.
- 35 Bolcskei K, Helyes Z, Szabo A *et al.* Investigation of the role of TRPV1 receptors in acute and chronic nociceptive processes using gene-deficient mice. *Pain* 2005;117: 368–76.
- 36 Russell FA, Schuelert N, Veldhoen VE *et al.* Activation of PAR(2) receptors sensitizes primary afferents and causes leukocyte rolling and adherence in the rat knee joint. *Br J Pharmacol* 2012;167:1665–78.
- 37 Cao T, Pinter E, Al RS *et al.* Neurokinin-1 receptor agonists are involved in mediating neutrophil accumulation in the inflamed, but not normal, cutaneous microvasculature: an in vivo study using neurokinin-1 receptor knockout mice. *J Immunol* 2000;164:5424–9.
- 38 Knotkova H, Pappagallo M, Szallasi A. Capsaicin (TRPV1 agonist) therapy for pain relief: farewell or revival? *Clin J Pain* 2008;24:142–54.
- 39 Hsieh YL, Chiang H, Tseng TJ *et al.* Enhancement of cutaneous nerve regeneration by 4-methylcatechol in resiniferatoxin-induced neuropathy. *J Neuropathol Exp Neurol* 2008;67:93–104.
- 40 Kobayashi K, Fukuoka T, Obata K *et al.* Distinct expression of TRPM8, TRPA1 and TRPV1 mRNAs in rat primary afferent neurons with delta/c-fibers and colocalization with trk receptors. *J Comp Neurol* 2005; 493:596–606.
- 41 Nigrovic PA, Lee DM. Synovial mast cells: role in acute and chronic arthritis. *Immunol Rev* 2007;217:19–37.
- 42 Davis JB, Gray J, Gunthorpe MJ *et al.* Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature* 2000;405:183–7.
- 43 Amaral FA, Costa VV, Tavares LD *et al.* NLRP3 inflammasome-mediated neutrophil recruitment and hypernociception depend on leukotriene B(4) in a murine model of gout. *Arthritis Rheum* 2012;64:474–84.

Supplementary Table 1: Effects of selective receptor TRPV1 antagonist SB 366791 on the i.a. capsaicin-induced nociceptive and oedematogenic responses in rats.

Treatment	Ongoing pain (score)	Thermal Latency (s)	Mechanical threshold 50% (g)	Δ Joint thickness (mm)
Vehicle	0.5±0.2	16±1	32±1	0.3±0.1
Capsaicin (10 nmol/site)	2.8±0.4 ^{***}	7±1 ^{***}	7±1 ^{***}	1.2±0.2 [*]
Capsaicin + SB 366791 (10 nmol/site)	0.5±0.3 ^{###}	13±1 [#]	35±5 ^{###}	0.6±0.1 [#]

Data are presented as the mean ± SEM. * $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$ compared with the vehicle or # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ and ### $P < 0.001$ compared with the SB 366791 (#) group. One-way analysis of variance followed by Dunnett's test.

Supplementary Table 2: Effects of pre-treatment with RTX on the nociceptive and oedematogenic responses induced by i.a. capsaicin in rats.

Treatment	Ongoing pain (score)	Thermal Latency (s)	Mechanical threshold 50% (g)	Δ Joint thickness (mm)
Vehicle + Vehicle	0.2±0.2	18±1	12±2	0.3±0.1
Vehicle + Capsaicin	2.4±0.2 [*]	8±2 [*]	32±5 [*]	1.5±0.5 [*]
RTX + Vehicle	0.0±0.0	17±1	37±5	0.3±0.1
RTX + Capsaicin	0.2±0.2 [#]	20±6 [#]	28±6 [#]	0.9±0.1 [#]

Data are presented as the mean ± SEM. * $P < 0.05$ in comparison to the vehicle plus the vehicle-injected group (*) or # $P < 0.05$, in comparison to the vehicle plus the capsaicin group (#). Two-way ANOVA followed by Bonferroni's post-test.

Supplementary Table 3: Effects of the peri-sciatic pre-treatment of QX-314 plus capsaicin on the nociceptive and oedematogenic responses induced by i.a. capsaicin in rats.

Pre-treatment	Articular Treatment	Ongoing pain (score)	Thermal latency (s)	Mechanical threshold 50% (g)	Δ Joint thickness (mm)
Saline + Vehicle	Vehicle (50 µl/site)	0.2±0.2	15±1	50±10	0.1±0.1
Saline+ Vehicle	Capsaicin (10 nmol/site)	2.2±0.2 ^{***}	9±2 ^{**}	9±1 ^{***}	1.8±0.1 ^{***}
QX314 + Capsaicin	Capsaicin (10 nmol/site)	0.2±0.2 ^{###} (100%) [†]	17±1 ^{###} (100%) [†]	35±1 [#] (82±3%) [†]	0.3±0.1 ^{###} (100%) [†]
Saline + Vehicle	MSU (1.25 mg/site)	2.6±0.2 ^{***}	9±1 ^{***}	7±1 ^{***}	1.7±0.3 ^{***}
QX314 + Capsaicin	MSU (1.25 mg/site)	0.5±0.3 ^{###} (81±13%) [‡]	16±1 ^{###} (78±12%) [‡]	22±5 [#] (55±15%) [‡]	1.1±0.2 ^{###} (52±11%) [‡]

Data are presented as the mean ± SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ in comparison to vehicle group (articular treatment); # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$ and ### $P < 0.001$ in comparison to saline+vehicle (pre-treatment) plus MSU (i.a.) or capsaicin (i.a.) groups. Two-way ANOVA followed by Bonferroni's post-test.

()[†] Percentage of inhibition in comparison to saline+vehicle (pre-treatment) plus capsaicin (i.a.) group ()[‡] Percentage of inhibition in comparison to saline+vehicle (pre-treatment) plus MSU (i.a.) group.

Supplementary Table 4: Effect of the mast cell stabiliser cromolyn on nociception and oedema observed 4 hours after i.a. injection of compound 48/80 or MSU in rats.

Treatment	Ongoing pain (score)	Thermal latency (s)	Mechanical threshold 50% (g)	Δ joint Thickness (mm)
Vehicle	0.4±0.2	13.5±1.2	31.4±2.8	0.3±0.1
Compound 48/80 (0.5 mg/site)	1.6±0.2** (4.5) [•]	10.2±1.9	14.1±4.8** (67±8) [†]	2.5±0.3*** (8) [•]
+ Cromolyn (3 nmol/site)	0.6±0.1# (71±8%) [†]	13.0±1.1	30.9±2.5## (81±5%) [†]	1.3±0.1## (55±7%) [†]
MSU (1.25 mg/site)	1.7±0.4*	7±1**	8±1***	2.2±0.6***
+ Cromolyn (3 nmol/site)	1.2±0.5	10±1	14±3	1.4±0.1

Data are presented as mean ± SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$, compared with the vehicle (*) or # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ compared with the Cromolyn (#) group. One-way analysis of variance followed by Dunnett's test.

()[†]Percentage of inhibition in comparison to the compound 48/80 group.

()[†] Percentage of increase in comparison to the vehicle group.

()[•] Fold of increase in comparison to the vehicle group.

3.2 Artigo 2

Nitric oxide involvement in an articular acute gouty arthritis model

**Carin Hoffmeister¹, Mariane Arnoldi Silva², Mateus Fortes Rossato²,
Gabriela Trevisan², Sara Marchesan Oliveira², Cassia Regina Silva²,
Juliano Ferreira^{1,2,3*}**

¹Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil; ²Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil; ³Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, SC, Brasil;

Corresponding author: Juliano Ferreira, Departamento de Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciência Biológicas, Bloco D; Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima, 88040-900, Santa Catarina, SC, Brasil, Phone: (55) 483 9491, email: ferreiraj99@gmail.com

ABSTRACT

Nitric oxide (NO) has been reported as a pain and inflammation mediator in some types of arthritis. The aim of the present study was to investigate the participation of NO in an acute gouty arthritis model in rats. Experiments were conducted to evaluate the participation of NO in either the nociceptive (ongoing nociception, mechanical allodynia and heat hyperalgesia) or inflammatory responses (edema, plasma extravasation, and leukocyte infiltration) induced by the intra-articular (i.a., ankle joint) injection of monosodium urate (MSU) crystals in rats. Initially, we observed that the i.a. injection of MSU crystals (1.25 mg/site) induced the release of NO stable metabolites nitrite/nitrate (NO_x) in the articular exudates. Moreover, the NOS inhibitor L-NAME (3 µg/site, i.a.) was able to prevent ongoing pain and mechanical allodynia but was not as effective in altering heat hyperalgesia caused by MSU i.a. injection. L-NAME also prevented the ankle edema response, as well as plasma extravasation, leukocyte infiltration and NO_x release in articular exudates induced by MSU. Moreover, the administration of an NO donor (SIN-1) induced ongoing pain, heat hyperalgesia, and edema but was not able to cause mechanical allodynia. In addition, the administration of L-arginine induced ongoing nociception, heat hyperalgesia, mechanical allodynia and edema. Because we already demonstrated that TRPV1 is able to mediate the MSU response and NO may activate TRPV1, we tested whether MSU responses were dependent on TRPV1 modulation by NO. We observed that co-treatment with a TRPV1 antagonist (SB366791) was able to prevent ankle edema formation but was not able to prevent the ongoing nociception and heat hyperalgesia induced by SIN-1. Also, this same treatment was able to prevent, mechanical allodynia and ankle

edema formation but was not able to prevent the ongoing nociception and heat hyperalgesia. These results indicated that NO plays a critical role in the development and maintenance of nociceptive and inflammatory responses in a gouty arthritis model; however, only edematogenic responses appear to be mediated by TRPV1 activation.

Key words: L-NAME; MSU; edema; SIN-1; TRPV1; SB-366791.

1. INTRODUCTION

Gouty arthritis is a prevalent and debilitating variety of painful inflammatory arthritis. This arthropathy results from the precipitation of monosodium urate (MSU) crystals in the joint cavities, causing considerable inflammatory damage to the tissue (Matsukawa et al., 1998; Dalbeth and Haskard, 2005). This form of arthritis causes episodes of sudden and severe pain, tenderness, redness, warmth and swelling in affected joints (Neogi, 2011). Studies have reported that NO could have a pathogenic role in arthritis in humans and experimental research animals (Farrell et al., 1992; McInnes et al., 1996; Aley et al., 1998; McCartney-Francis et al., 2001; da Rocha et al., 2002). However, the relationship between NO pro-inflammatory activity and gout requires further investigation.

Little is known about the exact mechanism of NO action in pain development in arthropathies. Interestingly, Miyamoto and colleagues (2009) demonstrated that NO activates, *in vitro*, the transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) ion channel. Furthermore, our group demonstrated that the TRPV1 receptor seems to be involved in nociceptive and inflammatory responses in an acute gouty arthritis model in rodents (Hoffmeister et al., 2011). The TRPV1 receptor is an ion channel and is considered to be an important pain integrator and a target for the treatment of pain-related behaviours. Considering this, we aim to investigate the relationship between NO and the activation of TRPV1 receptors in nociception and inflammation induced by the administration of MSU crystals in the tibio-tarsal joint in rats.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Animals

Adult male Wistar rats weighing 200–300 g were used in the experiments. Animals were housed at a controlled temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) with a 12 h light/12 h dark cycle with standard lab chow and tap water *ad libitum*. The animals were habituated to the experimental room for at least 1 h before the experiments. Each animal was used only once. The experimental protocols were authorised by the Ethics Committee of the Federal University of Santa Maria (process number: 108/2011) and are in accordance with current ethical guidelines for the investigation of experimental pain in conscious animals (Zimmermann, 1983).

2.2. Drugs

The following reagents were purchased from Sigma (St Louis, USA): N_ω -nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME), SB366791, sulphanilamide, N-(1-Naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride (NEED), vanadium chloride, 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), ethylenediamine tetra acetic acid (EDTA), phenylmethanesulphonyl fluoride (PMSF), sodium dodecyl sulphate (SDS), 3-morpholinosydnonimine hydrochloride (SIN-1), streptavidin–agarose, S-methyl methanethiosulphonate (MMTS).

Synthetic MSU crystals were prepared as described previously (Hoffmeister et al., 2011). Briefly, 4 g of uric acid (Vetec, Brazil) was dissolved and heated in 800 ml of H_2O , adjusted to pH 8.9 with NaOH (9 ml, 0.5 N) at 60°C , cooled overnight in a cold room and then washed and dried. Needle-like

crystals were recovered and then suspended in phosphate-buffered solution (PBS: K₂HPO₄ 10.8 mM, NaH₂PO₄ 6.8 mM, NaCl 120,4 mM; pH 7.4). Polarised light microscopic examination showed the crystals to be rod-shaped and varying in length (12±2 µm). The preparation was free of endotoxins as determined by the amebocyte cell lysate assay (Sigma, St Louis, USA).

2.3. MSU-induced acute gouty arthritis

The goal of this study was to investigate the participation of NO in a model of acute gouty arthritis model, as described previously (Coderre and Wall, 1988; Hoffmeister et al., 2013). During isoflurane anaesthesia, 50 µL of MSU crystal suspension (1.25 mg/site) was injected into the medial side of the tibio-tarsal joint (ankle) rats. The control group received i.a. injection of the vehicle alone (PBS). Behavioural measurements or samples were collected 1 - 24 hours after injection.

2.4. Nociceptive behavioural evaluation

Ongoing nociception: Ongoing pain was assessed using a standing paw pressure score from 0 until 3, as previously described (Hoffmeister et al., 2013). The amount of weight the rat was willing to put on the hind paw of the injected limb was evaluated before and after i.a. injection and categorised according to the following scale: 0 - paw pressure equally distributed on both hind-paws; 1- paw pressure slightly reduced; 2 - paw pressure moderately reduced and 3 - paw pressure severely reduced with the foot completely elevated.

Mechanical allodynia: The mechanical threshold was determined before and after i.a. injection using flexible nylon von Frey filaments in logarithmic

increments of force (6-100 g) using the “Up-and-Down” paradigm as previously described (Chaplan et al., 1994; Dixon, 1980). The 50% mechanical paw withdrawal threshold response (g) was assessed and its decrease was considered allodynia.

Heat hyperalgesia: To evaluate the hypersensitivity to heat stimulation (heat hyperalgesia), we used the plantar test apparatus (Ugo Basile, Varese, Italy), as previously described (Hargreaves et al., 1988). A radiant light beam generated by a 60 W light bulb was directed into to the left hind paw to determine the paw withdrawal latency (the time between the stimulus and paw removal) before and after i.a. injection. Significant decreases in paw withdrawal latency in relation to the baseline values were interpreted as heat hyperalgesia.

2.5. Inflammatory response evaluation

Edema: The diameter of the tibio-tarsal joint was measured using a digital calliper as previously described (Keeble et al., 2005; Hoffmeister et al., 2013). An increase in the ankle joint thickness compared with the baseline values was used as an index of ankle joint edema.

Plasma extravasation: Injected ankle synovial cavities were washed with 30 μ L of PBS (10 μ L, three times) to obtain the synovial exudates (Keeble et al., 2005). Afterwards, total protein content was measured colorimetrically by the method of Bradford (1976) using bovine serum albumin as the standard.

Leukocyte infiltration: Samples of articular exudates were diluted to a final volume of 200 μ L with Turk’s solution, and the total number of leukocytes was

determined using a Neubauer chamber (Pintor et al., 2010; Hoffmeister et al., 2013).

2.6 Determination of NO production

To evaluate the production of NO, we quantified its stable metabolites nitrite/nitrate ($\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$) (NOx), according to Miranda et al., 2001, with minor modifications. Briefly, animals were sacrificed and the articular exudate was homogenised in 300 μL of PBS (50 mM, pH 7.4), deproteinised by adding 50 μL of acetonitrile and 50 μL of ZnSO_4 (200 mM) and centrifuged at 16000 x g for 20 min at 4°C. Afterward, 75 μL supernatant was added to 25 μL of Griess reagent (sulphanilamide 2% and NEED 0.16%; 1:1) and 25 μL vanadium chloride (dissolved in 5% HCl) and incubated for 60 min at 37°C. The developed colour was evaluated at 540 nm. Nitrite and nitrate were used as standards and the values were corrected for the amount of protein in the samples (Bradford, 1976).

2.6. NO involvement in the MSU-induced nociception and inflammation

To investigate the possible involvement of NO in MSU-induced nociceptive and inflammatory acute responses, the NOS inhibitor L-NAME (1-10 $\mu\text{g}/\text{site}$) was co-injected i.a. with MSU (1.25 mg/site) (da Rocha et al., 2002; Hoffmeister et al., 2011).

2.7. TRPV1 involvement in NO-induced nociceptive and inflammation

To evaluate the participation of TRPV1 in the nociception and edema caused by NO, animals were co-administered with SIN-1 (1 $\mu\text{g}/\text{site}$) plus the

TRPV1 selective receptor antagonist SB366791 (10 nmol/site) (Hoffmeister et al. 2011).

2.8. Statistical analysis

All of the values were expressed as the mean \pm SEM. The percentages of inhibition were calculated using the maximum responses obtained after injection of MSU compared to the vehicle-treated animals. The statistical significance between the groups was assessed using one- or two-way analysis of variance (ANOVA) when appropriate. Post hoc tests (Dunnett's test for one-way ANOVA or Bonferroni's test for two-way ANOVA) were conducted when appropriate. *P* values lower than 0.05 ($P < 0.05$) were considered to be significant. To meet the ANOVA assumptions, the mechanical allodynia data were subjected to log transformation. The statistical analysis was performed using Graph Pad Software version 5.0 (Graph Pad Software Inc., La Jolla, CA, USA).

3. RESULTS

3.1. MSU-crystal-induced release of NO_x in ankle joint

The i.a. injection of MSU crystals (1.25 mg/site) induced the release of NO in the rat joint exudates. Release of nitrite/nitrate, the stable metabolites of NO, began 4 hours after MSU i.a. administration, reached the maximum value at 6 hours and ceased 24 hours after MSU crystal injection (Figure 1). In rats receiving only with the i.a. vehicle (PBS), the nitrite concentrations in the articular exudates were low and remained at these low levels for the duration of the experiment.

3.2. Effect of the NOS inhibitor in MSU-induced nociceptive responses

The i.a. co-administration of the NOS inhibitor L-NAME (1-10 µg/site) prevented MSU-induced nociceptive responses (Figure 2B, 2D and 2F), though the response was not dose-dependent. L-NAME (3 µg/site) significantly decreased the ongoing nociceptive behaviour from 4 to 6 hours after the injection. The prevention of mechanical allodynia was also significant, beginning 2 hours after the injection and lasting until 4 hours post-injection. However, the co-administration of L-NAME was not effective in altering heat hyperalgesia (Figures 2A, 2C and 2E, respectively). Based on these findings, different L-NAME doses were evaluated 4 hours after MSU-injection. The same dose of L-NAME (3 µg/site) partially prevented the ongoing nociception with an inhibition of 55±8% (Figure 2B) and also the mechanical allodynia by 58±10%. The 10 µg/site dose prevented the mechanical allodynia by 55±12% (Figure 2D). But,

none of the tested doses (1-10 $\mu\text{g}/\text{site}$) were effective in preventing the heat hyperalgesia caused by MSU i.a. injection (Figure 2F).

3.3. Effect of the NOS inhibitor in MSU-induced inflammatory responses

The i.a. co-administration of the NOS inhibitor L-NAME prevented MSU-induced ankle edema formation. The anti-edematogenic effect started at 2 hours and lasted until 4 hours post-injection (Figure 3A). Based on these findings, different L-NAME doses were evaluated in inflammatory responses at 4 hours after MSU injection. Only the 3 $\mu\text{g}/\text{site}$ dose induced a significant edema inhibition ($27\pm 2\%$) (Figure 3B). At the same time, this dose prevented MSU-induced NO_x production, ankle plasma extravasation and leukocyte infiltration in the joint exudate (75 ± 12 , 49 ± 12 and $90\pm 4\%$ inhibition, respectively) (Figure 4A, 4B and 4C, respectively).

3.4. The NOS substrate L-Arginine and NO donor SIN-1-induced nociceptive and edematogenic responses

We administered the NOS substrate L-Arginine and NO donor 3-morpholinosydnonimine (SIN-1) into the tibio-tarsal joint. The i.a. injection of SIN-1 (1 and 10 $\mu\text{g}/\text{site}$) led to the development of slow-onset ongoing nociception and heat hyperalgesia, which started at 2 hours post-injection and remained elevated for the next 6 hours (Figure 5A and 5C, respectively). However, we observed that i.a. administration of SIN-1 (1-10 $\mu\text{g}/\text{site}$) was not as effective at inducing mechanical allodynia (Figure 5E). In addition to the nociceptive responses, the i.a. injection of SIN-1 also induced edema formation

in the ankle joint. The edema began 2 hours after SIN-1 injection, remained elevated at 4 hours, and decreased by 6 hours after injection (Figure 5G).

Based on this time course, we evaluated the nociceptive responses as well as the edematogenic response 4 hours after the intra-articular injection of different doses of this NO donor. The SIN-1 doses tested induced an increase in continuous ongoing nociception, with a 10-fold-increase for the 1 µg/site dose and a 6-fold-increase for the 10 µg/site dose (Figure 5B). The SIN-1 also induced a reduction in the thermal latency of $44\pm 7\%$ (1 µg/site dose) and $44\pm 2\%$ (10 µg/site dose), compared to the vehicle injected-group (Figure 5D). However, we observed that none of the tested doses were effective in inducing mechanical allodynia (Figure 5F). Both tested doses induced an increase in edema formation 4 hours after injection (6- and 5-fold increase, respectively) (Figure 5H).

3.5. TRPV1 receptor involvement in the nociceptive and edematogenic responses induced by the NO donor SIN-1

To assess the role of NO in association with TRPV1 in the MSU articular model, we co-administered the selective TRPV1 receptor antagonist SB366791 (10 nmol/site) plus the NO donor 3-morpholinosydnonimine (SIN-1, 1 µg/site) into the tibio-tarsal joint. The SB366791 treatment was not able to prevent SIN-1-induced heat hyperalgesia and mechanical allodynia. However, the selective TRPV1 receptor antagonist partially prevented the ongoing pain and edema formation 4 hours after the injection with inhibition of 40 ± 17 and $52\pm 9\%$, respectively (Figure 6A and 6D).

4. DISCUSSION

First, we observed that the acute gouty arthritis model induced by i.a. injection of MSU crystals produced similar symptoms to those presented in acute gouty arthritis patients (Hoffmeister et al., 2013). Relevant to this finding, we decided to investigate the participation of NO in this experimental model. Initially we observed the release of NO (quantified by the dosage of the stable NO metabolites nitrite/nitrate) into the joint exudate of rats after MSU-induced acute gouty arthritis. Following the NO release, we determined that the NOS inhibitor L-NAME was able to partially reduce some of the nociceptive and inflammatory responses. Additionally, a NO donor (SIN-1) elicited nociception, exhibited as ongoing pain and heat hyperalgesia, and articular edema. However, local treatment with a selective TRPV1 receptor antagonist SB 366791 partially prevented the ongoing nociception and edema induced by NO. Together, these results support the notion that the NO plays a relevant role in the development and maintenance of nociceptive and inflammatory responses in a gouty arthritis model; however, only the edematogenic response appears to be mediated by TRPV1 activation.

Researchers have identified NO as one of the pro-inflammatory mediators of different types of arthritis, including gout (Chen et al. 2004). Accordingly, we observed the release of increased concentrations of nitrite, the stable metabolite of NO, in the articular exudate of the ankle joint of rats submitted to i.a. MSU-injection. Interestingly, the NO release also reached a maximal value at approximately 4 hours, the same time that the nociceptive and inflammatory responses induced by MSU crystal injection were maximal, as shown in our previous paper (Hoffmeister et al., 2013). In agreement with our

findings, increased NO production has been observed in the synovial fluid of patients with other types of arthritis conditions, such as rheumatoid arthritis and osteoarthritis (Grabowski et al., 1996; McInnes et al., 1996; McCartney-Francis et al., 2001). The relevance of NO in gout is emphasised by reports showing that NOS expression is increased in synovial tissues of patients with gout (Chen et al., 2004). Several researchers have shown that MSU may increase the expression of NOS in cells such as macrophages, chondrocytes, fibroblasts and osteoblasts *in vitro*, as well as in the plantar tissue of mice (Chen et al., 2004, Liu et al., 2004; Ju et al., 2011).

Evidence supports a role for peripheral NO as a pro-nociceptive mediator (Robbins and Grisham, 1997; Aley et al., 1998). Remarkably, little is known about the role NO involvement in gouty arthritis pain. Thus, we next sought to investigate the relationship between NO and nociceptive responses in an articular acute gout pre-clinical model. Similarly, we observed that the NOS inhibitor, L-NAME, partially prevented nociceptive responses (ongoing pain and mechanical allodynia). Nevertheless, we observed in our study that L-NAME did not significantly prevent heat hyperalgesia induced by MSU crystals. This result is in the opposite direction relative to the work of Lawand and colleagues (1997), who found that local administration of L-NAME prevented radiant heat hyperalgesia in rats. This discrepancy is potentially explained by the fact that they utilised an articular pre-clinical model of arthritis induced by carrageenan and not by MSU crystal injection into joints. This discrepancy may also be explained by a greater affinity of L-NAME for constitutive isoforms of NOS and its poor affinity for the iNOS isozyme, despite it being a non-selective NOS inhibitor (Tanaka et al., 1998; Boer et al., 2000).

We next performed experiments to test whether administration of a NO donor could induce the development of ankle joint nociception. Indeed, intra-articular treatment with SIN-1 evoked ongoing pain and heat hyperalgesia but not mechanical allodynia. Controversies have also arisen concerning the contribution of NO donors, as there are several reports that NO donors may produce either hyperalgesia or anti-nociception depending on the pain/inflammatory model (Souza & Prado, 2001). Our findings are in agreement with Miyamoto and colleagues (2009), who demonstrated that intraplantar administration of a NO donor only caused the development of thermal but not mechanical hyperalgesia. Based on these data, we conclude that only the ongoing pain and heat hyperalgesia in our pre-clinical model may be associated with the production of NO. However, this mechanism does not apply to the nociceptive behaviour of mechanical allodynia.

Another characteristic of arthritis is inflammation caused by precipitation of MSU in articular tissue. Indeed, it has been demonstrated that MSU crystals stimulate local connective tissue cells, macrophages, and neutrophils to produce a variety of pro-inflammatory mediators. Thus, NO might play a role in many cellular events of the MSU-induced inflammatory response, including increases in vascular flow, alterations in endothelium and the emigration of leukocytes from the circulation to the site of injury (Lyons, 1995). In this study, we show that i.a. treatment with L-NAME in combination with MSU injection prevented inflammatory responses, including ankle edema formation, increased NO_x, increased total protein content and increased total leukocyte number in the synovial exudates.

In the current study, intra-articular injection of L-NAME, a competitive inhibitor of both the constitutive and inducible isoforms of NOS, prevented the edematogenic response induced by MSU. Consistent with our results, a previous study showed that administration of a non-selective NOS inhibitor changed the acute inflammatory response, evaluated as prevention of intra-articular leukocyte accumulation, joint swelling, and bone erosion in streptococcal cell wall¹-induced arthritis in rats (McCartney-Francis et al., 2001). Moreover, the suppression of MSU-induced iNOS expression resulted in attenuated edema after MSU subcutaneous paw injection (Ju et al., 2011). In addition, we observed that L-NAME also prevented plasma extravasation and decreased total leukocyte infiltration, as evaluated in joint exudates after MSU i.a. injection. Previous research has shown that L-NAME was effective in reducing capsaicin-evoked trachea plasma extravasation (Li et al., 2005). *In vivo* and *in vitro* studies have demonstrated that methylguanidine, another inhibitor of NOS, is also able to reduce leukocyte infiltration induced by subcutaneous paw carrageenan injection (Marzocco et al., 2004). Presumably, these properties of NO have been linked to local microcirculatory alterations.

In view of this, our previous findings reveal that TRPV1 activation plays a relevant role in the development of pain and inflammation induced by articular MSU (Hoffmeister et al., 2013). In addition, it has been shown that endogenous levels of NO are capable of directly activating members of the TRP channels, including TRPV1 and TRP ankyrin 1 (TRPA1), to induce nociception (Miyamoto et al., 2009). We previously demonstrated that intra-articular treatment with the selective TRPV1 antagonist SB366791 prevented nociception and inflammation caused by MSU when administered into the tibio-tarsal joint of rats (Hoffmeister

et al., 2013). Therefore, we next tested the possible connection between NO and the activation of TRPV1 receptors in nociceptive and edematogenic responses induced by MSU injection in the tibio-tarsal joint of the rat. Intra-articular treatment with SB 366791 prevented the induction of ongoing pain and edema, although it was not possible to assess the activity of the antagonist in the other nociceptive parameters evaluated (heat hyperalgesia, but not mechanical allodynia) due to the inability of the NO donor to initiate such responses. Accordingly, intra-articular injection of the NO donor SIN-1 evoked an edematogenic response, which was significantly prevented by a TRPV1 antagonist.

The current results support the notion that NO plays a relevant role in the development and maintenance of nociceptive and inflammatory response in a gouty arthritis model in rats. However, only the edematogenic response appears to be mediated by TRPV1 activation in response to NO.

Acknowledgements

The authors thank the fellowships from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal de Nível Superior (CAPES).

Conflict of interest statement

The authors declare no conflict of interest.

Figures

Figure 1.

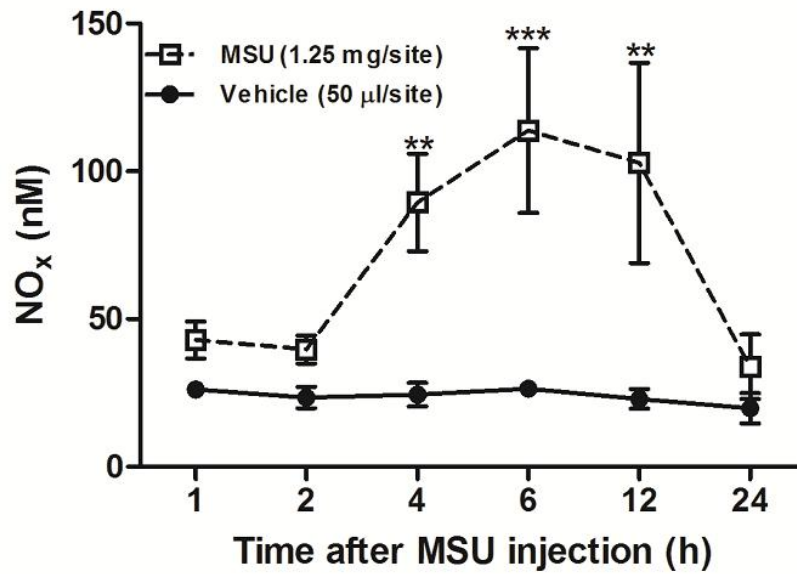


Figure 1. Time course of the release of NO into the joint exudate of rats with MSU-induced acute gouty arthritis. MSU was injected intra-articularly and the NO release in a synovial lavage sample (as $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$) was measured at different times after MSU (1.25 mg/site) (\square). The control group received only PBS (50 μl) (\bullet) i.a. Each point on the curve represents the mean \pm SEM of 6-8 rats. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ when compared to the control group; two-way ANOVA followed by Bonferroni's post-hoc test.

Figure 2.

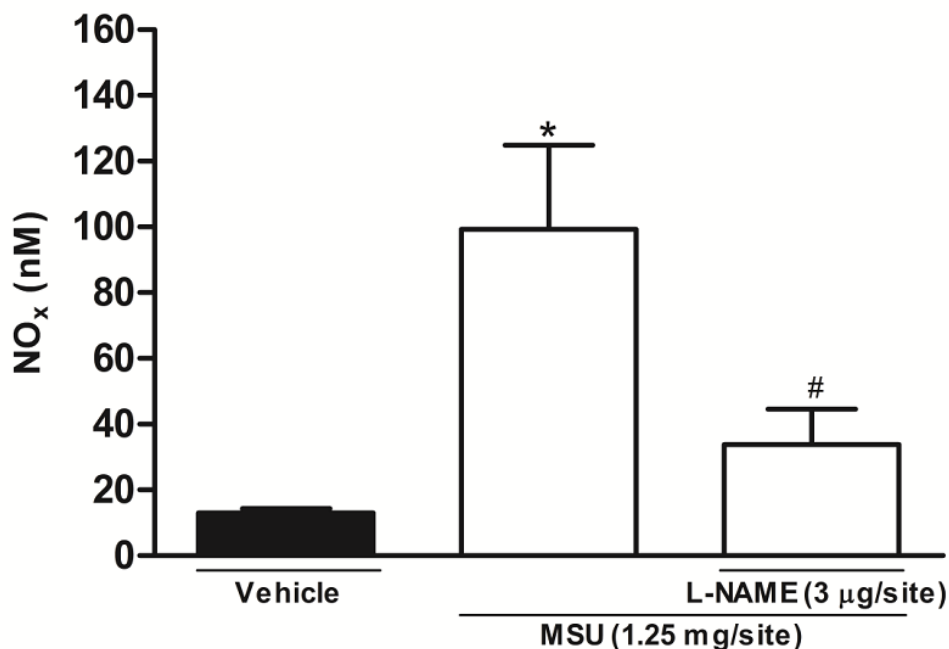


Figure 2. Effect of the non-selective NOS inhibitor L-NAME on MSU crystal-induced nociceptive responses. Time course (A, B and C) and dose-response curves (D, E and F) for ongoing nociception, heat hyperalgesia and mechanical allodynia. In the time course curves: the treated group (\blacktriangle) received co-administration of L-NAME (3 $\mu\text{g}/\text{site}$) plus MSU (1.25 mg/site), the non-treated group (\square) received only MSU i.a. (1.25 mg/site) and the control group (\bullet) received only PBS i.a. (50 $\mu\text{l}/\text{site}$). In the dose-response curves: L-NAME (1-10 $\mu\text{g}/\text{site}$) was intra-articularly co-administered with MSU (1.25 mg/site), the non-treated group received only MSU i.a. (1.25 mg/site) and the control group received only PBS i.a. (50 $\mu\text{l}/\text{site}$). Each point on the curve represents the mean \pm SEM of 6-7 rats. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ in comparison to the control group and

#P< 0.05, ##P< 0.01, ###P<0.001 when compared to the treated group. Two-way ANOVA followed by Bonferroni's post-hoc test.

Figure 3.

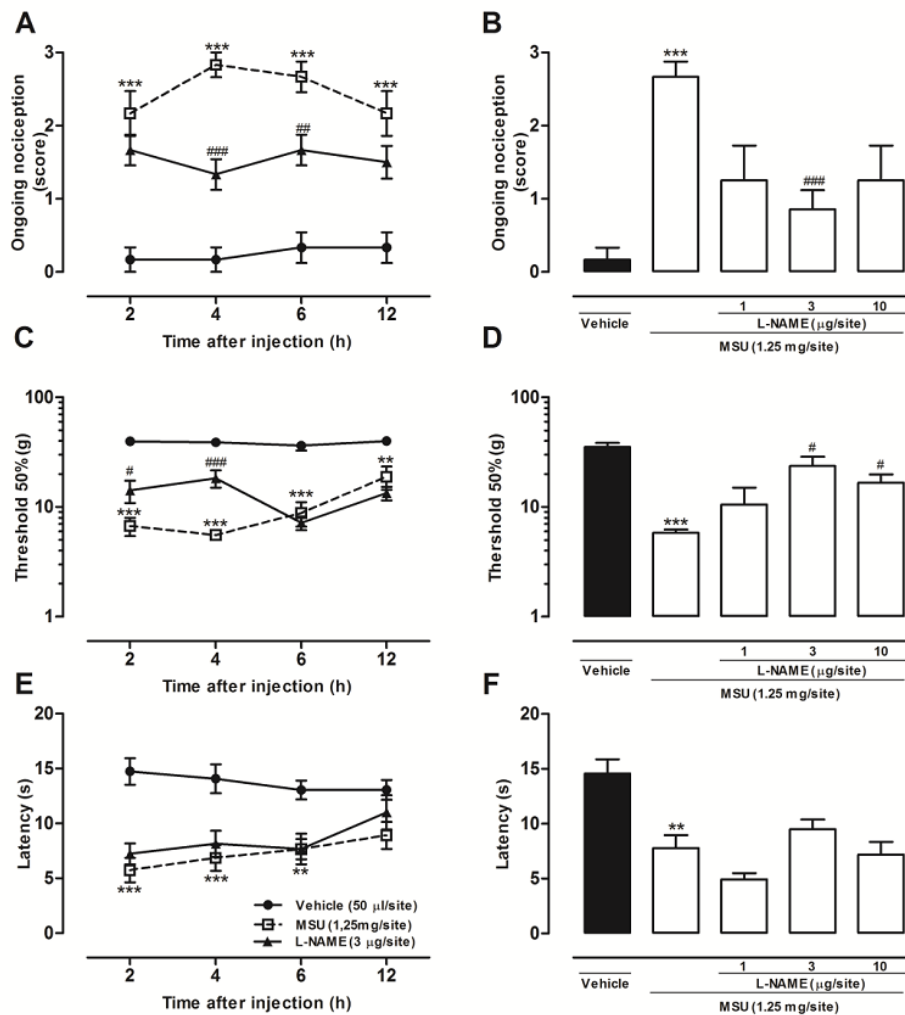


Figure 3. . Effect of the non-selective NOS inhibitor L-NAME on MSU crystal-induced edematogenic responses. Time course curves and dose-response curve for ankle edema (A and B, respectively). In the time course curve: the treated group (▲) received co-administration of L-NAME (3 μg/site) plus MSU (1.25 mg/site), the non-treated group (□) received only MSU i.a. (1.25 mg/site) and the control group (●) received only PBS i.a. (50 μl/site). In the dose-response curve: L-NAME (1-10 μg/site) was intra-articularly co-administered

with MSU (1.25 mg/site), the non-treated group received only MSU i.a. (1.25 mg/site) and the control group received only PBS i.a. (50 µl/site). Each point on the curve represents the mean \pm SEM of 5-7 rats. *** $P < 0.001$ in comparison to control group and # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ when compared to the treated group. Two-way ANOVA followed by Bonferroni's post-hoc test.

Figure 4.

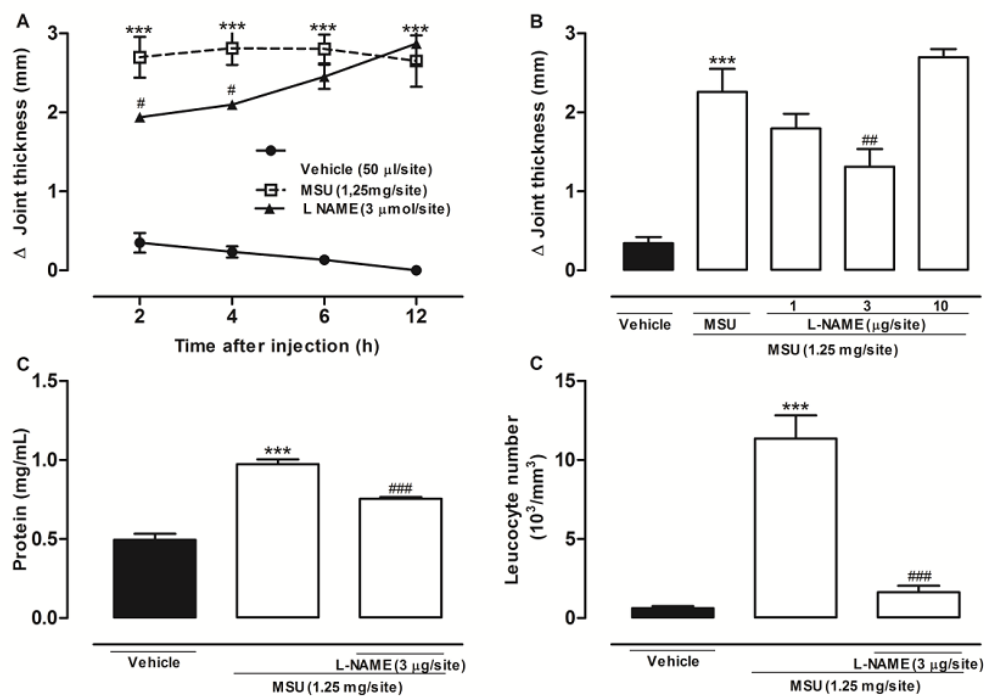


Figure 4. Effect of the non-selective NOS inhibitor L-NAME on MSU-crystal-induced inflammatory responses 4 hours after treatment. After intra-articular treatment, the edema (A and B), plasma extravasation (C) and total leukocyte infiltration (D) were evaluated. Each point on the curve represents the mean \pm SEM of 4 rats. * $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$ in comparison to the control group and # $P < 0.05$ and ### $P < 0.001$ when compared to the treated group. One-way ANOVA followed by Newman-Keuls multiple comparison test.

Figure 5.

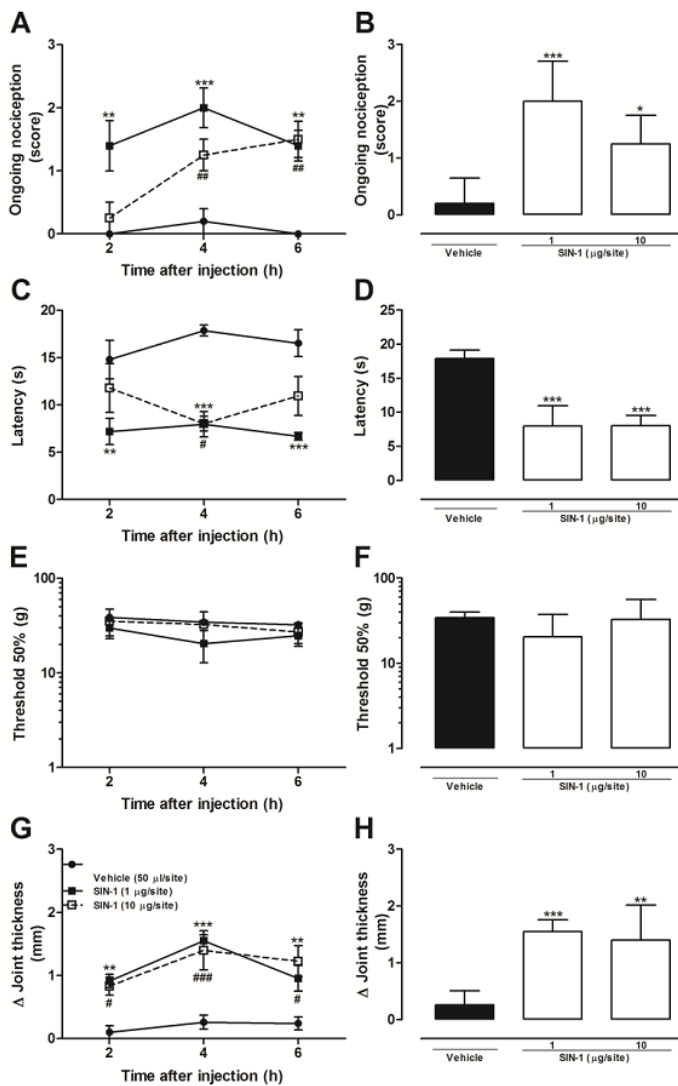


Figure 5. Effect of the NO donor SIN-1-induced nociceptive and edematogenic responses. Time course and dose-response curves for ongoing nociception (A and B), heat hyperalgesia (C and D), mechanical allodynia (E and F) and edema (G and H). In the time course curve: group (■) received i.a. SIN-1 injection of 1 µg/site, group (□) received SIN-1 injection of 10 µg/site and the control group (●) received only PBS i.a. injection (50 µl/site). In the dose-

response curve, the values for nociception and ankle edema were obtained 4 h after SIN-1 (1-10 µg/site) and control injection only (PBS, 50 µl/site). Each point on the curve represents the mean ± SEM of 4-5 rats. *P<0.05 **P<0.01, ***P<0.001 in comparison to the vehicle group and #P< 0.05, ##P< 0.01 and ###P<0.001 when compared to the SIN-1 group; Two-way ANOVA followed by Bonferroni's post-hoc test (A, C, E and G) and one-way ANOVA followed by Newman-Keuls multiple comparison test (B, D F and H).

Figure 6.

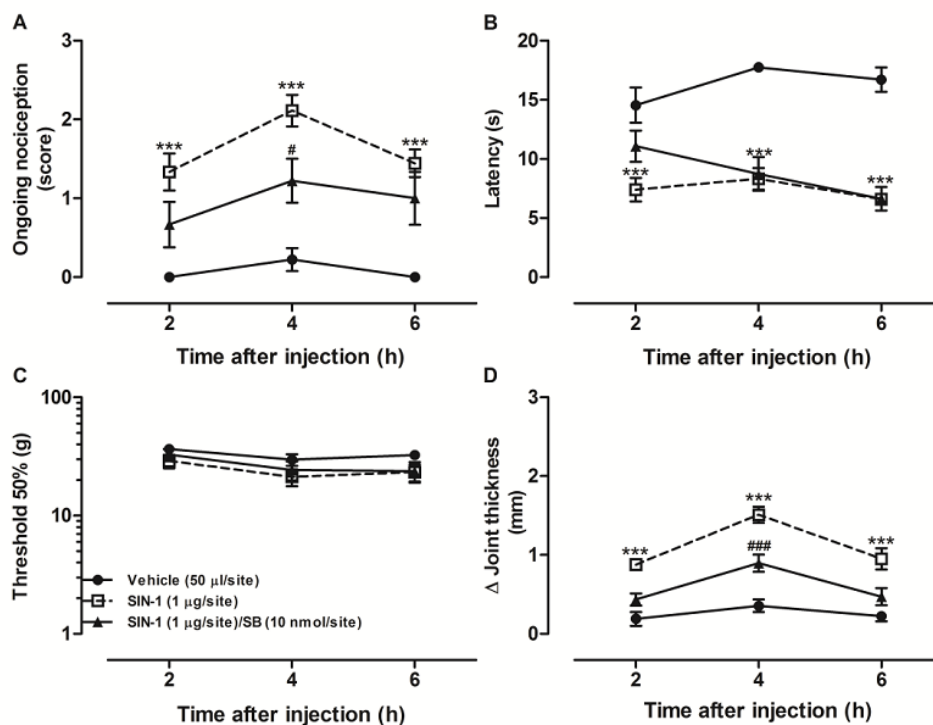


Figure 6. Effect of the selective TRPV1 receptor antagonist SB 366791 on NO donor 3-morpholinosydnonimine (SIN-1)-induced nociceptive and edematogenic responses. The time course for ongoing nociception (A) heat hyperalgesia (B), mechanical allodynia (C) and edema (D). SB 366791 (10 nmol/site) was intra-articularly co-administered with SIN-1 (1 µg/site) (▲). The non-treated (NT) group received only SIN-1 i.a. (1 µg/site) (□). The control group received only PBS i.a. (50 µl/site) (●). Each point on the curve represents the mean ± SEM of 9 rats. *** $P < 0.001$ in comparison to the control group and # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$ in comparison to the NT group. Two-way ANOVA followed by Bonferroni's post-hoc test.

REFERENCES

- Aley KO, McCarter G, Levine JD. Nitric oxide signaling in pain and nociceptor sensitization in the rat. *J Neurosci.* 18:7008-14, 1998.
- Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem* 72:248–254, 1987.
- Chen L, Hsieh MS, Ho HC, Liu YH, Chou DT, Tsai SH. Stimulation of inducible nitric oxide synthase by monosodium urate crystals in macrophages and expression of iNOS in gouty arthritis. *Nitric Oxide.* 11:228-236, 2004.
- Choi H, Mount D, Reginato A. Pathogenesis of gout. *Ann Intern Med.* 143: 499-516, 2005.
- Coderre TJ and Wall PD. Ankle joint urate arthritis in rats provides a useful tool for the evaluation of analgesic and anti-arthritic agents. *Pharmacol Biochem Behav.* 29:461-466, 1988.
- Dalbeth N, Haskard DO. Mechanisms of inflammation in gout. *Rheumatol.* 44:1090–1096, 2005.
- da Rocha JCS, Peixoto ME, Jancar S, Cunha FdeQ, Ribeiro de AR, da Rocha FA. Dual effect of nitric oxide in articular inflammatory pain in zymosan-induced arthritis in rats. *Br J Pharmacol.* 136:588-596, 2002.
- Dixon W.J. Efficient analysis of experimental observations. *Ann Rev Pharmacol Toxicol.* 20:441-462, 1982.
- Farrell AJ, Blake DR, Palmer RMJ, Moncada S. Increased concentrations of nitrite in synovial fluid and serum samples suggest increased nitric oxide synthesis in rheumatic diseases. *Ann. Rheum. Dis.* 51:1219–1222, 1992.
- Grabowski PS, Macpherson H, Ralston SH. Nitric oxide production in cells derived from the human joint. *Br. J. Rheumatol.* 35:207–212, 1996.
- Hargreaves KM, Troullos ES, Dionne RA, Schmidt EA, Schafer SC, Joris JL. Bradykinin is increased during acute and chronic inflammation: therapeutic implications. *Clin Pharmacol Ther.* 44:613-21, 1988.
- Hoffmeister C, Trevisan G, Rossato MF, de Oliveira SM, Gomez MV, Ferreira J. Role of TRPV1 in nociception and edema induced by monosodium urate crystals in rats. *Pain.* 152:1777-1788, 2011.
- Hoffmeister C, Silva MA, Rossato MF, Trevisan G, de Oliveira SM, Silva CR, Guerra GP, Ferreira J. Participation of the TRPV1 receptor on the development of acute gout attacks. *Rheumatology.* 53:240-249, 2013.

Ju TJ, Dan JM, Cho YJ, Park SY. Inhibition of Inducible Nitric Oxide Synthase Attenuates Monosodium Urate-induced Inflammation in Mice. *Korean J Physiol Pharmacol.* 15:363-369, 2011.

Keeble J, Russell F, Curtis B, Starr A, Pinter E, Brain S D. Involvement of transient receptor potential vanilloid 1 in the vascular and hyperalgesic components of joint inflammation. *Arthritis Rheum.* 52:3248–3256, 2005.

Keith MP, Gilliland WR. Updates in the Management of Gout. *Am. J. Med.* 120:221-224, 2007.

Lawand NB, Willis WD, Westlund KN. Blockade of joint inflammation and secondary hyperalgesia by L-NAME, a nitric oxide synthase inhibitor. *Neuroreport.* 8:895-899, 1997.

Liu R, Lioté F, Rose DM, Merz D, Terkeltaub R. Proline-rich tyrosine kinase 2 and Src kinase signaling transduce monosodium urate crystal-induced nitric oxide production and matrix metalloproteinase 3 expression in chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 50:247-258, 2004.

Lyons, C. R. The role of nitric oxide in inflammation. *Adv. Immunol.*60:323–371; 1995.

Matsukawa A. et al., 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* 78:559–569, 1998.

McCartney-Francis NL, Song X, Mizel DE, Wahl SM. Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase exacerbates erosive joint disease. *J Immunol.* 166:2734-2740, 2001.

Miranda KM, Espey MG, Wink DA. A Rapid, Simple Spectrophotometric Method for Simultaneous Detection of Nitrate and Nitrite. *NITRIC OXIDE: Biology and Chemistry* Vol. 5, No. 1, pp. 62–71, 2001.

Miyamoto T, Dubin AE, Petrus MJ, Patapoutian A. TRPV1 and TRPA1 mediate peripheral nitric oxide-induced nociception in mice. *PLoS One.* 4:e7596, 2009.

Murrell GAC, Dolan MM, Jang D, Szabo C, Warren RF, Hannafin JA. Nitric oxide: An important articular free radical. *J. Bone Joint Surg.* 78:265–274, 1996.

Neogi, T. Clinical practice. Gout. *N Engl J Med.* 364:443-452, 2011.

Pinto L G, Cunha T M, Vieira S M, et al., IL-17 mediates articular hypernociception in antigen-induced arthritis in mice. *Pain.*148:247-256, 2010.

Robbins RA, Grisham MB Nitric oxide. *Int J Biochem Cell Biol* 29:857– 860, 1997.

Sousa AM & Prado WA. The dual effect of a nitric oxide donor in nociception. Brain Res. 897:9-19, 2001.

Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. Pain. 16:109–110, 1983.

4. DISCUSSÃO

As doenças artríticas como a gota estão entre as doenças inflamatórias que mais frequentemente afetam a população mundial. Possuem um forte impacto na qualidade de vida, no uso de recursos e de cuidados médicos e na economia de um país. (RICHETTE E BARDIN, 2010; TERKELTAUB, 2010). De fato, o arsenal farmacológico disponível para as crises agudas de gota ainda oferecem limitações, tanto pelos efeitos adversos associados, quanto pela reduzida eficácia na redução da resposta dolorosa. Em vista disso, mesmo essa artropatia apresentando uma descrição antiga e muitos estudos na área, justifica-se uma contínua investigação sobre os mecanismos envolvidos na dor e inflamação desencadeadas durante as crises agudas, visto que estes ainda não foram completamente esclarecidos (RICHETTE E BARDIN, 2010; TERKELTAUB, 2010).

Vários estudos pré-clínicos e clínicos demonstram o envolvimento do TRPV1 em diferentes tipos de artrite (MCCARTHY E MCCARTHY, 1992, CRUWYS et al., 1995; ENGLER et al., 2007; DOHERTY et al., 2011). No entanto, há poucos estudos sobre a relação entre TRPV1, dor e inflamação desenvolvidas durante as crises agudas de gota. Recentemente, este grupo de pesquisa demonstrou o envolvimento do receptor TRPV1 em respostas nociceptivas e edematogênicas induzidas pela administração subcutânea de MSU na pata de ratos (HOFFMEISTER et al., 2011). Além disso, esse modelo de administração subcutânea de MSU caracterizou apenas respostas nociceptivas e edematogênica transitórias e não revelou a participação de leucócitos, que tem sido demonstrada por desempenhar um papel essencial na patofisiologia da gota. Assim, confirmou-se e ampliou-se a investigação do papel do TRPV1 na crise aguda de gota utilizando um modelo em que a administração de cristais de MSU na articulação tíbio-tarsal de rato permite a avaliação de parâmetros nociceptivos e inflamatórios semelhantes aos sintomas apresentados pelos pacientes com gota (CODERRE E WALL, 1988; DALBETH E LINDSAY, 2012). Aqui, se demonstrou o envolvimento do TRPV1 e do mediador pró-nociceptivo/inflamatório óxido nítrico (NO) no desenvolvimento de respostas nociceptivas e inflamatórias observadas nas crises agudas de gota.

Inicialmente, se observou que a administração i.a. de cristais de MSU, desencadeou comportamentos nociceptivos lentos e de longa duração. Estas respostas foram caracterizadas por nocicepção em curso, alodínia mecânica e hiperalgesia ao calor. Tais respostas iniciaram cerca de 2 horas, com pico em torno

de 4-6 horas, mantendo-se até 24 horas após a injeção do MSU. Os dados obtidos estão de acordo com achados clínicos, que descrevem a crise aguda da gota ser caracterizada pelo desenvolvimento de dor contínua grave durante um período de aproximadamente 12 horas, sendo que o pico desta ocorre em torno de 4 horas, desaparecendo completamente após 72 horas (FAIRES E MCCARTY, 1962; KEITH E GILLILAND, 2007; ZYCHOWICZ et al., 2010). Outro aspecto dessa crise aguda dolorosa é uma sensação de queimação na articulação afetada, a qual inicia cerca de 2 horas e atinge um pico máximo em torno de 4 horas após a injeção de MSU em seres humanos (FAIRES E MCCARTY, 1962). Estes relatos concordam com os presentes resultados, uma vez que também se observou o desenvolvimento de uma hiperalgesia ao calor de longa duração (mais de 4 horas), um efeito relacionado à estimulação do TRPV1 em “ambientes inflamatórios” (CATERINA et al., 2000). Alguns pacientes descrevem que durante a crise a dor inicial é tão intensa que os tornam incapazes de suportar o peso de suas próprias roupas nem o “tremor” causado por uma pessoa andando rapidamente pelo cômodo em que se encontram (NUKI E SIMKIN, 2006). Esses relatos comprovam que a gota causa nos pacientes um tipo hipersensibilidade nociceptiva (alodínia mecânica). De tal modo que observou-se o desenvolvimento desta resposta, já em 1 hora após a administração i.a. do MSU, a qual se manteve intensa, em grande parte, até 12 horas. Portanto, houve comprovação de que as respostas dolorosas induzidas pela administração i.a. de MSU no tornozelo dos ratos foram semelhantes aos relatados em seres humanos, demonstrando que esse modelo utilizado no referido estudo mimetiza uma crise aguda de gota (SCHUMACHER et al., 1974; SEEGMILLER E MALAWISTA, 1962; FAIRES E MCCARTY, 1962; MATSUKAWA et al., 1998).

Como referido anteriormente, alguns estudos sugerem que o TRPV1 está envolvido na dor e na inflamação associadas com alguns tipos de artrite, inclusive gota (SZABO et al., 2005; BARTON E SCHMELZ, 2006; ENGLER et al., 2007; RUSSEL et al., 2009; DOHERTY et al., 2011; HOFFMEISTER et al., 2011). Neste aspecto se comprovou que o antagonismo seletivo do TRPV1 preveniu a nocicepção em curso de forma breve e moderada. Este padrão de resposta foi o mesmo apresentado por outro antagonista do receptor de TRPV1 administrado por via sistêmica em um modelo de gota canino (CATHCART et al., 2012). Neste estudo, o antagonismo do TRPV1 produziu antinocicepção, mas causou hipertermia, um efeito adverso comum dos antagonistas seletivos dos receptores TRPV1. No presente

estudo, os tratamentos realizam-se no local (intra-articular) não induzindo a alterações na temperatura corporal dos animais (dados não mostrados). Este achado sugere que a administração local de antagonistas seletivos dos TRPV1, pode ser uma forma alternativa para produzir analgesia e evitar a hipertermia pela administração sistêmica, uma vez que medicamentos intra-articulares já são utilizados para tratar certos casos de gota (TERKELTAUB, 2010). Da mesma forma, a alodínia mecânica também foi significativamente prevenida o que está de acordo com alguns estudos que relataram que o antagonismo do TRPV1 foi capaz de alterar o desenvolvimento de alodínia mecânica (KANAI et al., 2005; CUI et al., 2006 FERNANDES et al., 2011). No entanto, o papel dos canais TRPV1 na mecanossensação é controverso, uma vez que outros estudos, demonstraram que camundongos com deleção gênica para TRPV1 não exibiram nenhuma diferença na sensibilidade a estímulos mecânicos (CATERINA et al., 2000; DAVIS et al., 2000). Também se verificou a prevenção da hiperalgesia térmica pelo antagonista seletivo do TRPV1, concordando com estudos anteriores, que demonstraram a importância do receptor de TRPV1 no desenvolvimento e na detecção de hiperalgesia térmica e alodínia mecânica (DAVIS et al., 2000; CATERINA et al., 2004).

Explicita-se que a resposta inflamatória dolorosa desencadeia-se pela deposição dos cristais de MSU nas articulações e tecidos peri-articulares. Este processo caracteriza-se por formação de edema e uma intensa infiltração de leucócitos na articulação afetada (GETTING et al., 1997; MATSUKAWA et al., 1998; MARTINON et al., 2006; TORRES et al., 2009; VANITALIE, 2010; NEOGI, 2011). Observou-se então que MSU induziu um extravasamento plasmático e formação de edema de início precoce, bem como uma leucocitose e aumento da atividade da enzima MPO mais atrasada. Este padrão de resposta era esperado, visto que o edema induzido pelo MSU depende de extravasamento plasmático, sendo que esse processo ocorre devido à rápida alteração na microcirculação. Já a infiltração leucócitos é um processo mais lento, pois depende de vários mecanismos, como a expressão de moléculas de adesão, rolamento, adesão e diapedese (LANDIS E HASKARD, 2001). Além disso, a administração i.a. de MSU induziu a infiltração de leucócitos paralelamente ao aumento da atividade da enzima MPO, indicando que a infiltração de leucócitos na cavidade articular era composta principalmente de neutrófilos. Constatou-se ainda que o MSU induziu um aumento significativo de IL-1 β no lavado articular.

Neste contexto, observou-se também, que esse aumento de IL-1 β no lavado sinovial, foi significativamente prevenido pelo antagonismo seletivo do TRPV1. Este resultado concorda com vários referenciais comprovando que a inibição da IL-1 β impede a dor e a inflamação das articulações do tornozelo em resposta aos cristais intra-articulares MSU em camundongos e ataques de gota em humanos (TORRES et al., 2009; CRONSTEIN E SUNKUREDDI, 2013). Além disso, já se observou que o bloqueio farmacológico da via de IL-1 β reduz o influxo de neutrófilos em resposta ao MSU, reforçando a hipótese de que esta citocina desempenha um papel relevante na dor e inflamação induzida pelo MSU (SO et al., 2007). O antagonismo seletivo do TRPV1, igualmente, impediu a formação da resposta edematogênica, bem como o extravasamento plasmático, a infiltração de leucócitos e o aumento da atividade MPO. Estes dados estão de acordo com resultados de outros autores, os quais demonstraram que a inflamação induzida em alguns modelos pré-clínicos de artrite foi mediada pelo TRPV1, contribuindo para a alteração da permeabilidade vascular e formação de edema (KEEBLE et al., 2005; SZABO et al., 2005). Além disso, também se demonstrou que a ativação do TRPV1 é responsável por mediar o rolamento de leucócitos no ambiente articular (RUSSEL et al., 2012). Ao mesmo tempo, já se comprovou que a ativação do TRPV1 expresso em fibras sensoriais, conduz à liberação de neuropeptídeos, acarretando o desenvolvimento de uma inflamação neurogênica, a qual inclui alteração vascular, extravasamento plasmático e acúmulo de leucócitos (CAO et al., 2000; MIYAZAKI et al., 2006).

Menciona-se ainda que agonistas do TRPV1 como a capsaicina e a resiniferatoxina demonstram a capacidade de desfuncionalizar fibras TRPV1-positivas (subtipos de fibras aferentes primárias, quase exclusivamente em fibras C peptidérgicas, mas também em um pequeno número de fibras A δ , assim denominados, por que expressam fortemente o receptor TRPV1) causando analgesia. De fato, usa-se a capsaicina clinicamente para o tratamento de dor causada por alguns tipos de artrite (LIDAR et al., 1991; KOBAYASHI et al., 2005; KNOTKOVA, 2008). Concordando com estes achados, os dados mostram que o tratamento sistêmico com resiniferatoxina reduziu significativamente as respostas nociceptivas e edematogênica induzidas pelo MSU. Já se esperava esse resultado, uma vez que, se comprovou que os agonistas do receptor TRPV1, RTX e capsaicina, serem capazes de produzir uma degeneração seletiva destes subtipos de fibras aferentes primárias (FERREIRA et al., 2004; HSIEH et al., 2008). Da

mesma forma, reforçando a investigação sobre a participação do TRPV1 especificamente neuronal, nas respostas induzidas pelo MSU, utilizou-se um bloqueador de canal de sódio que permitiu silenciar seletivamente as fibras TRPV1-positivas. Este método foi possível pelo fato de mostrar que após a ativação do receptor com capsaicina, o QX-314 entra pelo canal e se acumula seletivamente nos neurônios que expressam o TRPV1. A exposição a QX-314 leva então ao bloqueio da fibra TRPV1-positiva. Verificou-se então uma prevenção do desenvolvimento das respostas nociceptivas e edematogênicas induzidas pelo MSU. Este resultado foi semelhante ao observado anteriormente com o tratamento sistêmico com resiniferatoxina. Assim, se infere que os receptores TRPV1 encontrados em células neuronais são essenciais para a indução de nocicepção e edema induzidos pelo MSU. Estes resultados não excluem a possibilidade de participação de TRPV1 encontrados em outros tipos celulares.

A respeito do envolvimento de outras células no processo de dor e inflamação articulares, sabe-se que além de sinoviócitos, o tecido articular também apresenta uma pequena quantidade de mastócitos (NIGROVIC E LEE, 2007). Previamente descreveu-se que estas células poderiam mediar nocicepção e edema induzidos por cristais de MSU no tecido subcutâneo (HOFFMEISTER et al., 2011). Ademais, a ativação de mastócitos leva à liberação de vários mediadores pró-inflamatórios. No entanto, observou-se que um indutor de estabilização da membrana de mastócitos, não foi capaz de prevenir as respostas nociceptiva e edematogênica induzidas pela administração MSU no tornozelo dos animais. Este resultado comprova que a dor e inflamação da gota, provavelmente, não resultam da ação de mediadores liberados por estas células. Esta discrepância pode ser devido ao fato de que a articulação tem um número reduzido de mastócitos quando comparada ao tecido plantar (NIGROVIC E LEE, 2007).

Levando-se em conta que em diferentes modelos de dor inflamatória, observou-se um aumento na expressão do TRPV1 (KEEBLE et al., 2005; VON BANCHET et al., 2007), acrescenta-se a observação que os cristais de MSU causaram um aumento na imunorreatividade do canal TRPV1 no tecido articular. Este aumento ocorreu no tempo correspondente ao pico das respostas nociceptivas e inflamatórias. Tal correlação pode ser explicada pelo fato de que uma maior quantidade de receptores TRPV1 poderia estar sendo ativados ou sensibilizados pelos componentes da "sopa inflamatória". Estes componentes incluem produtos da

lipoxigenase, ATP e prótons (pH <5,7), espécies reativas de oxigênio (como H₂O₂) e espécies reativas de nitrogênio (como óxido nítrico) todos produzidos por estímulos térmicos ou mecânicos durante processos inflamatórios em compartimentos articulares (CALIXTO et al., 2005; SCHUMACHER, 2008).

Atentando-se para o fato de que em um modelo plantar de gota investigado previamente pelo grupo (HOFFMEISTER et al., 2011), o MSU ativou o TRPV1, mas que no entanto, esta ativação ocorreu indiretamente, sendo mediada por células residentes no tecido em que os cristais foram administrados. E ainda, à diferença da cinética de desenvolvimento da resposta nociceptiva (duas horas após a administração i.a.) no modelo articular, especulou-se a hipótese de uma ativação indireta do TRPV1 expresso nas fibras nociceptivas presentes na articulação, provavelmente por algum mediador pró-inflamatório produzido no próprio ambiente articular causado pela deposição do MSU.

De tal modo, reporta-se previamente que o óxido nítrico (NO) pode induzir dor aguda em humanos, além de estar envolvido na nocicepção inflamatória em modelos animais (HOLTHUSEN E ARNDT, 1994; ALEY et al., 1998). Ao mesmo tempo, descreve-se que esta espécie reativa de nitrogênio atua como mediador em diferentes tipos de artrites, incluindo a gota (FARREL et al., 1992; CHEN et al., 2004; JU et al., 2011). Adicionalmente, já se demonstrou que o NO é capaz de ativar os receptores TRPV1 e TRPA1 (MIYAMOTO et al., 2009). Assim, se pretende verificar a participação do NO e sua possível relação com a ativação do TRPV1 na nocicepção e inflamação induzidas pela administração de cristais de MSU na articulação tíbio-tarsal de ratos.

Inicialmente, o fato de se relatar um aumento da produção de NO no fluido sinovial de pacientes com alguns tipos de artrite, tais como artrite reumatoide e osteoartrite, conduziu o grupo a investigar essa característica no fluido sinovial da articulação tíbio-tarsal após a administração i.a. de MSU. Interessantemente, observou-se um aumento das concentrações NO (avaliado indiretamente através da dosagem de nitrito, o metabolito estável de NO), no exsudato articular após a injeção de MSU. Além disso, esse aumento atingiu um valor máximo cerca de 4 horas após a administração, ou seja, ao mesmo tempo em que foram máximas, as respostas nociceptivas e inflamatórias induzidas pela administração i.a. de MSU. Adicionalmente, a produção de NO na articulação foi prevenida pelo inibidor não seletivo da NOS quatro horas após a administração do MSU. De tal modo, este

resultado é de grande pertinência, uma vez que relaciona não só a presença, mas também o aumento da concentração de uma molécula pró-nociceptiva/inflamatória (ROBBINS AND GRISHAM, 1997; ALEY et al., 1998) com o desenvolvimento de respostas nociceptivas e inflamatórias de intensidade máxima. Ainda mais atentando-se para o fato de que estas respostas são semelhantes às apresentadas pelos pacientes com gota (SHUMACHER, 2010; DALBETH E LINDSAY, 2012).

Outro fator que sugere a forte relevância do papel do NO na gota são estudos mostrando que a expressão da NOS aumenta em tecidos sinoviais de pacientes com gota, e também que o MSU pode aumentar a expressão de NOS em células presentes no ambiente articular tais como condrócitos, fibroblastos, mioblastos, osteoblastos (CHEN et al., 2004, LIU et al., 2004; JU et al., 2011). Então, observou-se nesse estudo que um inibidor não seletivo da NOS, preveniu significativamente as respostas nociceptivas de dor em curso e alodínia mecânica, no entanto, não preveniu de forma significativa a hiperalgesia ao calor induzida pela administração i.a. de cristais de MSU. Este resultado é oposto ao encontrado por LAWAND e colaboradores (1997), pois eles demonstraram que a administração local de L-NAME impediu o desenvolvimento de hiperalgesia ao calor. Possivelmente, esta discrepância seja explicada pelo fato de tal estudo utilizar um modelo pré-clínico articular de artrite induzida por carragenina e não por cristais MSU. Além disso presente estudo mostrou que a administração i.a. de um doador de NO provocou uma resposta nociceptiva caracterizada pelo desenvolvimento de dor em curso e hiperalgesia ao calor, contudo, não se observou o desenvolvimento de alodínia mecânica. De fato, algumas controvérsias surgiram sobre a contribuição de doadores de NO para a nocicepção, pois há vários relatos de que estes podem produzir ou hiperalgesia ou antinocicepção, dependendo do modelo de dor inflamatória utilizado (SOUZA & PRADO, 2001). Com relação a modelos de nocicepção articular, demonstra-se em modelo de artrite induzida por zymosan, um efeito antinociceptivo de doadores de NO (DA ROCHA et al., 2002), sendo este, um achado totalmente contrário ao observado no presente modelo. Por outro lado, os nossos resultados concordam com MIYAMOTO e colaboradores (2009), uma vez que eles demonstraram o desenvolvimento de hiperalgesia ao calor, mas não de alodínia mecânica decorrente da administração intraplantar de um doador de NO. Por meio destes dados, sugere-se que apenas a dor contínua e a hiperalgesia ao

calor desencadeadas no modelo pré-clínico aqui utilizado, podem estar associados com a produção de NO.

Pondera-se que a precipitação de MSU na cavidade articular desencadeia a gota e que inicialmente leva ao desenvolvimento de uma resposta inflamatória aguda. De fato, já foi demonstrado que os cristais de MSU são capazes de estimular células locais do tecido conjuntivo, macrófagos e neutrófilos a produzirem uma variedade de mediadores pró-inflamatórios. Além disso, a NOS pode ser expressa em resposta a diversos mediadores, entre eles a citocina pró-inflamatória interleucina 1 beta (IL-1 β). Ao mesmo tempo se comprovou que a administração i.a de MSU induz à produção dessa citocina no ambiente articular e que o antagonismo do TRPV1 previne, pelo menos em parte a sua produção. Outro estudo demonstrou que a inibição da enzima iNOS pode estar envolvida na inflamação induzida pela administração subcutânea de MSU na pata de camundongos (JU et al., 2011). Em relação ao desenvolvimento de edema, existem controvérsias em relação à contribuição do NO. Por exemplo, alguns estudos demonstraram que a administração de inibidores não seletivos e seletivos da NOS não alteraram a resposta edematogênica desencadeada em modelos experimentais de artrite (MCCARTNEY-FRANCISSET et al., 2001; ROCHA et al., 2002). Em contrapartida, o edema provocado por injeção intraplantar do MSU foi suprimido pelo inibidor seletivo de iNOS (JU et al., 2011). Neste aspecto comprovou-se que a administração local do inibidor não seletivo de NOS preveniu a resposta edematogênica induzida por MSU. Observou-se ainda que o extravasamento plasmático, a infiltração de leucócitos totais e a produção de NO foram igualmente prevenidos. As propriedades anti-inflamatórias do NO têm sido ligadas a alterações na microcirculação local, sendo esta molécula já relacionada a muitos eventos celulares da resposta inflamatória, como aumento no fluxo vascular, alterações no endotélio e migração de leucócitos da circulação para o local da lesão (LYONS, 1995). Portanto, avaliando tais resultados se pode sugerir que as respostas inflamatórias produzidas no modelo pré-clínico utilizado no presente estudo, são associadas com a produção de NO no ambiente articular.

Interessantemente se demonstrou que níveis endógenos de NO são capazes de ativar diretamente os receptores TRPV1 e TRPA1 (MIYAMOTO et al., 2009). Em adição, outros estudos revelaram que o NO, é capaz de ativar receptor TRPV1, através de nitrosilação (YOSHIDA et al., 2006; MIYAMOTO et al., 2009). Além disso,

se comprovou previamente que a ativação do TRPV1 desempenha um papel relevante no desenvolvimento da nocicepção e inflamação induzido pela administração i.a. de MSU (HOFFMEISTER et al., 2013). Em vista disso, especulou-se uma possível conexão entre NO e a ativação do TRPV1 nas respostas nociceptiva e edematogênica induzidas pela administração intra-articular de MSU. O antagonismo deste receptor preveniu a nocicepção em curso e o desenvolvimento de edema induzido pelo doador de NO. A atividade do antagonista não foi eficaz em prevenir a hiperalgesia ao calor, e, em relação à alodínia mecânica não houve a possibilidade avaliar o antagonismo do receptor, devido à incapacidade do doador de desencadear essa resposta.

Portanto, com os dados obtidos no presente estudo conclui-se que o NO exibe um papel relevante tanto na indução das respostas nociceptivas caracterizadas como dor em curso e hiperalgesia ao calor, quanto no desenvolvimento das respostas inflamatórias caracterizadas por edema, extravasamento plasmático e infiltração de leucócitos totais. Acrescenta-se ainda que apenas as respostas de nocicepção em curso e desenvolvimento de edema foram mediadas pela ativação do TRPV1 através do NO.

Uma possível explicação para todos estes resultados é que outro membro da família dos TRPs contribua para desenvolvimento das respostas nociceptivas e inflamatórias induzidas no modelo em estudo. Essa idéia é fundamentada pelo fato de que recentemente, este grupo de pesquisa apontou diversas evidências que o receptor TRPA1 (possivelmente ativado por H₂O₂) contribui para a nocicepção e inflamação causadas pela administração de MSU dentro da articulação tíbio-tarsal. Levando-se em consideração, o fato de que o TRPA1 e o TRPV1, são co-expressos em fibras sensoriais e que o H₂O₂ também é capaz de sensibilizar o TRPV1, é possível que ambos os receptores contribuam de forma sinérgica para o desenvolvimento dessas respostas induzidas pela deposição MSU no ambiente articular.

5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no presente estudo, conclui-se que:

5.1. Os cristais de MSU injetado na articulação tíbio-tarsal de ratos induziu comportamento nociceptivo do tipo dor em curso, hiperalgesia ao calor, alodínia mecânica, bem como resposta inflamatória caracterizada por edema articular, extravasamento plasmático, infiltração de leucócitos produção de IL-1 β no lavado articular;

5.2. O receptor TRPV1 participa do desenvolvimento das respostas nociceptivas e inflamatórias induzidas pela administração i.a. de cristais de MSU na articulação tíbio-tarsal de ratos, já que seu antagonista seletivo SB366791 reduziu tais respostas;

5.3. As fibras sensoriais TRPV1 positivas participam do desenvolvimento da nocicepção e inflamação produzidas pela administração de cristais de MSU na articulação tíbio-tarsal de ratos, uma vez que a depleção destas reduziu significativamente essas respostas;

5.4. A administração de cristais de MSU na articulação tíbio-tarsal de ratos induz um aumento na imunoreatividade do receptor TRPV1 no tecido articular;

5.5. A nocicepção e a inflamação induzidas pela administração de cristais de MSU na articulação tíbio-tarsal de ratos não se relacionam com mastócitos;

5.6. O óxido nítrico exibe um papel relevante nas respostas nociceptivas e inflamatórias induzidas nesse modelo;

5.7. Apenas as respostas de nocicepção em curso e edema induzidas nesse modelo estão relacionada com a ativação do TRPV1 através do NO.

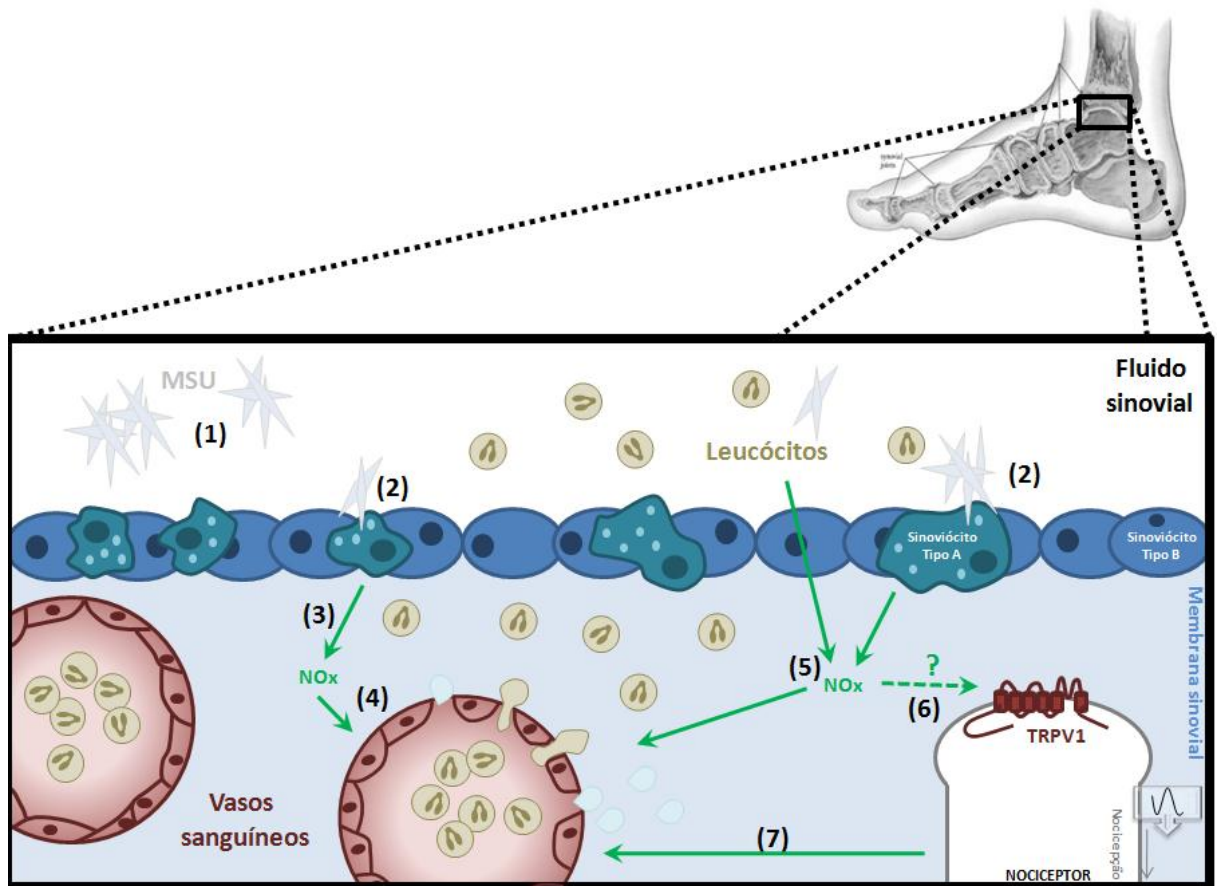


Figura 2 – O receptor TRPV1 possui um papel relevante na nocicepção e inflamação observados neste modelo articular de gota aguda. Sendo que alguns desses efeitos podem ser mediados pelo óxido nítrico.

Assim, o receptor TRPV1 talvez seja um alvo potencial para o desenvolvimento de novas terapias para o tratamento das crises agudas de gota.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEY, K. O.; MCCARTER, G.; LEVINE, J. D. Nitric oxide signaling in pain and nociceptors sensitization in the rat. **J Neurosci.** 18:7008-7014, 1998.
- BARTON, N. J.; MCQUEEN, D. S.; THOMSON, D.; GAULDIE, S. D.; WILSON, A. W.; SALTER, D. M.; CHESSELL, I. P. Attenuation of experimental arthritis in *trpv1r* knockout mice. *Exp Mol Pathol.* 81:166-170, 2006.
- BASBAUM, A. I.; et al. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell.** 139:267-284, 2009.
- BREIVIK, H.; et al. Survey of chronic pain in europe: prevalence, impact on daily life, and treatment. **Eur J Pain.** 10: 287-333, 2006.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **ANAL BIOCHEM.** 72:248-54, 1976.
- BRENNEIS, C.; KISTNER, K.; PUOPOLO, M.; JO, S.; ROBERSON, D.; SISIGNANO, M.; SEGAL, D.; COBOS, E. J.; WAINGER, B. J.; LABOCHA, S.; FERREIRÓS, N.; VON HEHN, C.; TRAN, J.; GEISLINGER, G.; REEH, P. W.; BEAN, B. P.; WOOLF, C. J. bupivacaine-induced cellular entry of qx-314 and its contribution to differential nerve block. **Br J Pharmacol.** 2013.
- BUSSO, N.; SO, A. Mechanisms of inflammation in gout. **Arthritis Res Ther.** 2:206, 2010
- CALIXTO, J. B.; et al. Contribution of natural products to the discovery of the transient receptor potential (TRP) channels family and their functions. **Pharmacol Ther.** 106:179-208, 2005.
- CAO T, PINTER E, AL RASHED S, GERARD N, HOULT JR, BRAIN SD. Neurokinin-1 receptor agonists are involved in mediating neutrophil accumulation in the inflamed, but not normal, cutaneous microvasculature: an in vivo study using neurokinin-1 receptor knockout mice. *J IMMUNOL.* 164: 5424–5429, 2000.
- CATERINA, M. J. et al. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature.** 389: 816-824, 1997.
- CATERINA, M. J. et al. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. **Science** 288: 306-313, 2000.
- CATHCART, C. J.; JOHNSTON, S. A.; REYNOLDS, L. R.; AL-NADAF, S.; BUDSBERG, S. C. Efficacy of ABT-116, an antagonist of transient receptor potential vanilloid type 1, in providing analgesia for dogs with chemically induced synovitis. **Am J Vet Res.** 73:19-26, 2012.
- CHANDRATRE, P. et al. Health-related quality of life in gout: a systematic review. **Rheumatology (Oxford).** 11:2031-2040, 2013.

- CHEN, L. Stimulation of inducible nitric oxide synthase by monosodium urate crystals in macrophages and expression of iNOS in gouty arthritis. **Nitric Oxide**. 11:228-236, 2004.
- CHOHAN, S.; BECKER, M. A. update on emerging urate-lowering therapies. *curr opin rheumatol*. 21:143-149. 2009.
- CODERRE TJ AND WALL PD. Ankle joint urate arthritis in rats provides a useful tool for the evaluation of analgesic and anti-arthritic agents. **Pharmacol Biochem Behav**. 29:461-466, 1988.
- CRONSTEIN, B. N.; SUNKUREDDI, P. Mechanistic aspects of inflammation and clinical management of inflammation in acute gouty arthritis. **J Clin Rheumatol**. 19:19-29, 2013.
- CRUWYS, S. C.; GARRETT, N. E.; KIDD, B. L. Sensory denervation with capsaicin attenuates inflammation and nociception in arthritic rats. **Neurosci Lett**. 193:205-207, 1995.
- CUI, M. et al. TRPV1 receptors in the CNS play a key role in broad-spectrum analgesia of TRPV1 antagonists. **J Neurosci** 26:9385-93, 2006.
- DALBETH, N.; HASKARD, D. O. Mechanisms of inflammation in gout. **Rheumatol** 44:1090–1096, 2005.
- DALBETH, N.; LINDSAY K. The patient's experience of gout: new insights to optimize management. **Curr Rheumatol Rep**. 14:173-178, 2012.
- DA S. ROCHA, J. C. et al. Dual effect of nitric oxide in articular inflammatory pain in zymosan-induced arthritis in rats. **Br J Pharmacol**.136:588-96, 2002.
- DAVIS, J. B.; GRAY, J.; GUNTHORPE, M. J. et al., Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. **Nature** 405:183-187, 2000.
- DEAL CL, SCHNITZER TJ, LIPSTEIN E, ET AL., Treatment of arthritis with topical capsaicin: a double-blind trial. **Clin Ther**.13:383-395, 1991.
- DIXON W J. Efficient analysis of experimental observations. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*. 20:441-462, 1982.
- DOUGHERTY, P. M. et al. Taxol-induced sensory disturbance is characterized by preferential impairment of myelinated fiber function in cancer patients. **Pain**.109:132-142, 2004.
- ENGLER, A. et al. Expression of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) in synovial fibroblasts from patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. **Biochem Biophys Res Commun** 359:884-888, 2007.
- FAIRES, J. S.; MCCARTY, J. R. D. J. Acute arthritis in man and dog after intrasynovial injection of sodium urate crystals. **Lancet**.;2:682–685, 1962.

- FARRELL, A. J.; BLAKE, D. R.; PALMER, R. M.; MONCADA, S. Increased concentrations of nitrite in synovial fluid and serum samples suggest increased nitric oxide synthesis in rheumatic diseases. **Ann Rheum Dis.** 51:1219-1222, 1992.
- FEIG, D. I.; KANG, D. H.; JOHNSON, R. J. Uric acid and cardiovascular risk. **N Engl J Med.** 359:1811-1812, 2008.
- FERRAZ, M. B.; O'BRIEN, B. A cost effectiveness analysis of urate lowering drugs in nontophaceous recurrent gouty arthritis. **J Rheumatol.** 22:908-14, 1995.
- FERNANDES, E. S. et al. A distinct role for transient receptor potential ankyrin 1, in addition to transient receptor potential vanilloid 1, in tumor necrosis factor α -induced inflammatory hyperalgesia and Freund's complete adjuvant-induced monoarthritis. **Arthritis Rheum.** 63:819-829, 2011.
- FERREIRA, J.; DA SILVA, G. L.; CALIXTO, J. B. Contribution of vanilloid receptors to the overt nociception induced by B2 kinin receptor activation in mice. **Br J Pharmacol.** 141:78–794, 2004.
- FIEHN, C.; ZEIER, M. Successful treatment of chronic tophaceous gout with infliximab (Remicade). **Rheumatol Int.** 27:274-276, 2006.
- GETTING, S. J. et al., Molecular determinants of monosodium urate crystals-induced murine peritonitis: a role for endogenous mast cells and a distinct requirement for endothelial-derived selectins. **J Pharmacol Exp Ther.** 283:123–130, 1997.
- HARGREAVES, K.; DUBNER, R.; BROWN, F.; FLORES, C.; JORIS, J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. **Pain.** 32:77-88, 1988.
- HSIEH, Y.L.; CHIANG, H.; TSENG, T. J.; HSIEH, S. T. Enhancement of cutaneous nerve regeneration by 4-methylcatechol in resiniferatoxin-induced neuropathy. **J Neuropathol Exp Neurol.** 67:93–104, 2008.
- HOFFMEISTER C. et al. Role of TRPV1 in nociception and edema induced by monosodium urate crystals in rats. **Pain** 152:1777-1788, 2011.
- HOFFMEISTER C, et al. Participation of the TRPV1 receptor on the development of acute gout attacks. **Rheumatology (Oxford)** 53:240-249, 2013.
- HOLTHUSEN, H.; ARNDT, J. O. Nitric oxide evokes pain in humans on intracutaneous injection. **Neurosci Lett** 165:71–74, 1994.
- HUNT, S. P.; MANTYH, P. W. The molecular dynamics of pain control. **Nat. Rev. Neurosci.** 2:83-91, 2001.

- JARA-OSEGUERA A, SIMON SA, ROSENBAUM T. TRPV1: on the road to pain relief. **Curr Mol Pharmacol** 1: 255-69, 2008.
- JU, T. J. et al. Inhibition of Inducible Nitric Oxide Synthase Attenuates Monosodium Urate-induced Inflammation in Mice. **Korean J Physiol Pharmacol**. 15:363-369, 2011.
- JULIUS, D.; BASBAUM, AI. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*. 413:203-210, 2001.
- KEITH, M. P.; GILLILAND, W. R. Updates in the Management of Gout. **Am. J. Med**. 120:221-224, 2007.
- KEEBLE, J. et al. Involvement of transient receptor potential vanilloid 1 in the vascular and hyperalgesic components of joint inflammation. **Arthritis Rheum**. 52:3248 –3256, 2005.
- KANAI, Y.; NAKAZATO, E.; FUJIUCHI, A.; HARA, T.; IMAI, A. Involvement of an increased spinal TRPV1 sensitization through its up-regulation in mechanical allodynia of CCI rats. *Neuropharmacology*. 49:977-984, 2005.
- KOBAYASHI, K. et al., Distinct expression of TRPM8, TRPA1 and TRPV1 mRNAs in rat primary afferent neurons with adelta/c-fibers and colocalization with trk receptors. **J Comp Neurol**. 493:596–606, 2005.
- KNOTKOVA, H.; PAPPAGALLO, M.; SZALLASI, A. Capsaicin (TRPV1 Agonist) therapy for pain relief: farewell or revival? **Clin J Pain**. 24:142-154, 2008.
- LANDIS, R. C.; HASKARD, D. O. Pathogenesis of crystal-induced inflammation. **Curr Rheumatol Rep**.3:36-41, 2001.
- LAWAND, N. B.; WILLIS, W. D.; WESTLUND, K. N. Blockade of joint inflammation and secondary hyperalgesia by L-NAME, a nitric oxide synthase inhibitor. **Neuroreport**. 8:895-899, 1997
- LEWIS, RICKI. Beginnings of life: an introduction to cell, molecular, and developmental biology. Dubuque, IA: Wm. C. Brown Publishers, c1992: pg86.
- LINDSAY, K.; GOW, P.; VANDERPYL, J.; LOGO, P.; DALBETH, N. The experience and impact of living with gout: a study of men with chronic gout using a qualitative grounded theory approach. **J Clin Rheumatol**. 1:1-6, 2011.
- LIU, R.; LIOTÉ, F. ROSE, D. M.; MERZ, D.; TERKELTAUB, R. Proline-rich tyrosine kinase 2 and src kinase signaling transduce monosodium urate crystal-induced nitric oxide production and matrix metalloproteinase 3 expression in chondrocytes. *Arthritis Rheum*. 50:247-258, 2004.
- LOESER, J. D.; TREEDE, R. D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain** 137:473-477, 2008.

- LYONS, C. R. The role of nitric oxide in inflammation. *Adv. Immunol.* 60:323–371, 1995.
- MANDELL, B. Clinical manifestations of hyperuricemia and gout. **Clive Clin Med.** S5-S8, 2008.
- MARTINON, F.; GLIMCHER, L. H. Gout: new insights into an old disease. **J Clin Invest** 116:2073-2075, 2006.
- MATSUKAWA, A. et al., 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** 78:559–569, 1998.
- MCCARTHY, G. M.; MCCARTY, D. J. Effect of topical capsaicin in the therapy of painful osteoarthritis of the hands. *J Rheumatol.* 19:604-607, 1992.
- MCCARTNEY-FRANCIS, N. L.; SONG, X.; MIZEL, D. E.; WAHL, S. M. Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase exacerbates erosive joint disease. **J Immunol.** 166:2734-2740, 2001.
- MERSKEY, H.; BOGDUK, N. **Classification of Chronic Pain.** 2. ed. Seattle: IASP Press, pp. 209-214, 1994.
- MIYAZAKI, Y.; SATOH, T.; NISHIOKA, K.; YOKOZEKI, H. STAT-6-mediated control of P-selectin by substance P and interleukin-4 in human dermal endothelial cells. **Am J Pathol.** 169: 697–707,2006.
- MIYAMOTO, T. et al. TRPV1 and TRPA1 mediate peripheral nitric oxide-induced nociception in mice. **PLoS One.** 4:e7596, 2009.
- MORAN, M. M.; MCALEXANDER, M. A.; BÍRÓ, T.; SZALLASI, A. Transient receptor potential channels as therapeutic targets. **Nat Rev Drug Discov.** 10:601-620, 2011.
- MURRELL, G. A. C.; DOLAN, M. M.; JANG, D.; SZABO, C.; WARREN, R. F.; HANNAFIN, J. A. Nitric oxide: An important articular free radical. **J. Bone Joint Surg.** 78A:265–274, 1996.
- NAKAYAMA, D. A.; BARTHELEMY, C.; CARRERA, G.; LIGHTFOOT, R. W. JR.; WORTMANN, R. L. Tophaceous gout: a clinical and radiographic assessment. **Arthritis Rheum.** 27:468-471, 1984.
- NAVRATILOVA, E. et al. Evaluation of reward from pain relief. **Ann N Y Acad Sci,** v. 1282, p. 1-11, 2010.
- NEOGI, T. Clinical practice. Gout. **N Engl J Med.** 364:443-452, 2011.
- NIGROVIC, P. A.; LEE, D. M. Synovial mast cells: role in acute and chronic arthritis **Immunol Rev.** 217:19-37, 2007.

- NILIIUS, B.; VOETS, T.; PETERS, J. TRP channels in disease. **Sci STKE**. (295):re8, 2005.
- NOBACK, C.R; STROMINGER, N.L.; DMAREST, R.J. In: The human nervous system: structure and function. Pain and temperature, 5^a ed., William & Wilkins, New York, 1996: 123-137.
- NUKI, G. SIMKIN, P. A. A concise history of gout and hyperuricemia and their treatment. **Arthritis Res Ther**. 8 Suppl 1:S1, 2006.
- PATAPOUTIAN, A.; PEIER, A. M.; STORY, G. M.; VISWANATH, V. ThermoTRP channels and beyond: mechanisms of temperature sensation. **Nat Rev Neurosci**. 4:529-39, 2003.
- PÉTRILLI, V.; MARTINON, F. The inflammasome, autoinflammatory diseases, and gout. **Joint Bone Spine**. 74:571-576, 2007.
- PINTO, L. G.; CUNHA, T. M.; VIEIRA, S. M.; et al. IL-17 mediates articular hypernociception in antigen-induced arthritis in mice. **Pain**.148:247-56, 2010.
- RICHETTE, P.; BARDIN, T. Gout. **Lancet**. 375:318-328, 2010.
- ROBBINS, R. A.; GRISHAM, M. B. Nitric oxide. **Int J Biochem Cell Biol** 29:857– 860, 1997.
- RUSSELL, F. A. et al., Tumour necrosis factor α mediates transient receptor potential vanilloid 1-dependent bilateral thermal hyperalgesia with distinct peripheral roles of interleukin-1 β , protein kinase C and cyclooxygenase-2 signalling. **Pain**. 142:264-274, 2009.
- RUSSELL, F. A.; SCHUELERT, N.; VELDHOEN, V.; HOLLENBERG, M. D.; MCDUGALL, J. J. Activation of PAR(2) receptors sensitizes primary afferents and causes leukocyte rolling and adherence in the rat knee joint. **Br J Pharmacol**. 167:1665-1678, 2012.
- SAKURAI, H.; KOHSAKA, H.; LIU, M. F.; ET AL. Nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression in inflammatory arthritides. **J. Clin. Invest**. 96:2357–2363, 1995.
- SCHAIBLE, H. G. Peripheral and central mechanisms of pain generation. **Handb Exp Pharmacol**.177:3-28, 2007.
- SCHLESINGER, N. Difficult-to-treat gouty arthritis: a disease warranting better management. **Drugs** 71:1413-1439, 2011(a).
- SCHLESINGER, N.; YASOTHAN, U.; KIRKPATRICK, P. Pegloticase **Nat Rev Drug Discov**. 10:17-18, 2011(b).
- SCHUMACHER, H. R. JR. The pathogenesis of gout. **Cleve Clin J Med**. Suppl 5:S2-S4, 2008.

- SCHUMACHER, M. A. Transient receptor potential channels in pain and inflammation: therapeutic opportunities. **Pain Pract.** 10:185-200, 2010.
- SEEGMILLER, J. E.; MALAWISTA, S. E. The effect of pretreatment with colchicine on the inflammatory response to microcrystalline urate: a model for gouty inflammation. A model for Gouty Inflammation. **Ann Intern Med.** 62:648-657, 1965.
- SO, A.; DE SMEDT, T.; REVAZ, S. et al. A pilot study of IL-1 inhibition by anakinra in acute gout. **Arthritis Res Ther.** 9:R28, 2007.
- SOUSA, A. M.; PRADO, W. A. The dual effect of a nitric oxide donor in nociception. **Brain Res.** 897:9-19, 2001.
- SZABO, A. et al. Role of transient receptor potential vanilloid 1 receptors in adjuvant-induced chronic arthritis: in vivo study using gene-deficient mice. **J Pharmacol Exp Ther.** 314:111–119, 2005.
- SZALLASI, A. E.; BLUMBERG, P. M. Vanilloid (capsaicin) receptors and mechanisms. **Pharmacol Rev.** 51:159-212, 1999.
- SZALLASI, A. CORTRIGHT, D. N.; BLUM, C. A.; EID, S. R. The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept. **Nat Rev Drug Discov.** 6:357-72, 2007.
- TAUSCHE, A. K.; RICHTER, K.; GRÄSSLER, A.; HÄNSEL, S.; ROCH, B.; SCHRÖDER, H. E. Severe gouty arthritis refractory to anti-inflammatory drugs: treatment with anti-tumour necrosis factor alpha as a new therapeutic option. **Ann Rheum Dis.** 63:1351-1352, 2004.
- TERKELTAUB, R. Update on gout: new therapeutic strategies and options. **Nat Rev Rheumatol.** 6:30-38, 2010.
- TOMINAGA, M.; CATERINA, M.J. Thermosensation and pain. **J Neurobiol.** 6:3–12, 2004.
- 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** 68:1602-1608, 2009.
- VANITALLIE, T. B. Gout: epitome of painful arthritis. **Metabolism** 59:S32–S36, 2010.
- VALDES, A. M.; DE WILDE, G.; DOHERTY, S. A.; LORIES, R. .; VAUGHN, F. L.; LASLETT, L. L.; et al. The Ile585Val TRPV1 variant is involved in risk of painful knee osteoarthritis. **Ann Rheum Dis.** 70:1556-1561, 2011.
- VON BANCHET, G. S.; RICHTER, J.; HÜCKEL, M.; ROSE, C.; BRÄUER, R.; SCHAIBLE, H. G. Fibroblast-like synovial cells from normal and inflamed knee joints differently affect the expression of pain-related receptors in sensory neurones: a co-culture study. **Arthritis Res Ther.** 9:R6, 2007.

WALL, P.D.; MELZACK, R. In: Textbook of pain. 4^a ed.: Churchill Livingstone: 59-103. 1999.

WALKER, R. A.; MCCLEANE, G. J. The addition of glyceryltrinitrate to capsaicin cream reduces the thermal allodynia associated with the application of capsaicin alone in humans. **Neurosci Lett** 323:78-80, 2002.

WOOLF, C.J. What is this thing called pain? **J Clin Invest.** 120:3742-3744, 2010.

WORTMANN, R. L. Recent advances in the management of gout and hyperuricemia. **Curr Opin Rheumatol.** 17: 319-324, 2005.

YOSHIDA, T. et al. Nitric oxide activates TRP channels by cysteine S-nitrosylation. **Nat Chem Biol.** 2:596-607, 2006.

ZAMPONI, G. W. et al. Role of voltage-gated calcium channels in ascending pain pathways. **Brain Res Rev.** 60:84-89, 2009.

ZIMMERMANN M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain.*16:109–110, 1983.

ZYCHOWICZ, M. E.; POPE, R. S.; GRASER, E. The current state of care in gout: Addressing the need for better understanding of an ancient disease. *J Am Acad Nurse Pract.* 1:623-36, 2010.