

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA**

**PAPEL DO RECEPTOR B<sub>1</sub> PARA CININAS E O  
EFEITO DA INIBIÇÃO DA ENZIMA CONVERSORA DE  
ANGIOTENSINA EM ATAQUES AGUDOS DE GOTA  
EM ROEDORES**

**TESE DE DOUTORADO**

**Cássia Regina da Silva**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2014**

**PAPEL DO RECEPTOR B<sub>1</sub> PARA CININAS E O EFEITO DA  
INIBIÇÃO DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA  
EM ATAQUES AGUDOS DE GOTA EM ROEDORES**

**Por**

**Cássia Regina da Silva**

Tese apresentada no curso de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutor em Bioquímica Toxicológica.**

**Orientador: Dr. Juliano Ferreira**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2014**

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Silva, Cássia Regina  
PAPEL DO RECEPTOR B1 PARA CININAS E O EFEITO DA  
INIBIÇÃO DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA EM ATAQUES  
AGUDOS DE GOTA EM ROEDORES / Cássia Regina Silva.-2014.  
119 p.; 30cm

Orientador: Juliano Ferreira  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica  
Toxicológica, RS, 2014

1. Artrite gotosa 2. Cininas 3. Dor 4. Inflamação 5.  
Cristais de urato I. Ferreira, Juliano II. Título.

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Naturais e Exatas  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:  
Bioquímica Toxicológica**

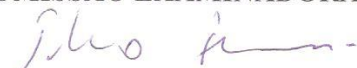
A comissão examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Tese de Doutorado

**O PAPEL DO RECEPTOR B<sub>1</sub> PARA CININAS E O EFEITO DA  
INIBIÇÃO DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA EM  
ATAQUES AGUDOS DE GOTA EM ROEDORES**

elaborada por  
**Cássia Regina da Silva**

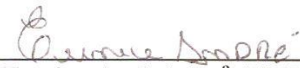
como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Doutor em Bioquímica Toxicológica**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**



---

**Juliano Ferreira, Dr (UFSM)  
(Presidente/Orientador)**



---

**Eunice André, Dr<sup>a</sup> (UFPR)**



---

**André Luiz Barbosa Báfica, Dr (UFSC)**



---

**Maribel Antonello Rubin, Dr<sup>a</sup> (UFSM)**



---

**Maria Rosa Chitolina Schetinger, Dr<sup>a</sup> (UFSM)**

**Santa Maria, 20 de agosto de 2014**

*“Dos medos nascem as coragens; E das dúvidas, as certezas. Os sonhos anunciam outra realidade possível e os delírios, outra razão. Somos, enfim, o que fazemos para transformar o que somos. A identidade não é uma peça de museu, quietinha na vitrine, mas a sempre assombrosa síntese das contradições nossas de cada dia.”*

*Eduardo Galeano*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao André, sempre me incentivando e acalmando. Ele foi quase tão responsável quanto eu por este momento, sem ele ao meu lado tudo teria sido muito difícil. Foram 3 anos driblando a distância e se mantendo presente. Obrigada pelo apoio incondicional, por estar ao meu lado, principalmente na época do meu doutoramento sanduíche no Canadá.

Agradeço ao suporte recebido de minha família. Ter apoio para as escolhas que faço na vida me permite a tranquilidade e confiança que preciso para alcançar meus sonhos.

Agradeço aos amigos que fiz e mantive em todos os lugares. Abro um espaço especial para agradecer a Fernanda, a Regina, a Sara, a Rafaela, o Gabriel e a Rúbia por se preocuparem em saber sempre como eu estava, pelas conversas, pela animação, por se manterem presentes em minha vida.

Aos colegas de trabalho, pois sem um ambiente propício não seria nada bom realizar as tarefas. Aos colaboradores, sejam eles de outros laboratórios ou universidades. Um agradecimento especial à Sara, minha ajudante número um, de todas as horas mesmo; e a Alisson, que facilitou ao máximo minha experiência na Universidade Dalhousie.

Um agradecimento coberto de amor e carinho ao Norman e a Breezy, meus “pais” de aluguel no Canadá. Eles foram maravilhosos em minha estada por lá, e fizeram do doutorado sanduíche uma fase de aprendizagem também para a vida.

A Universidade Federal de Santa Maria por viabilizar a realização deste curso, bem como a CAPES e CNPq pelo apoio financeiro como iniciação científica, mestrado e doutorado.

A Universidade Dalhousie, de Halifax no Canadá, e ao professor Jason McDougall, por abrirem as portas do laboratório e da universidade para a realização de meu doutoramento sanduíche.

Aos funcionários das Universidades por onde passei na realização deste doutoramento. E a todos os professores e alunos de outras universidades

Ao professor Juliano Ferreira, pelo conhecimento prático e teórico, por instigar minha curiosidade e aceitar me orientar durante toda esta etapa.

A todos os integrantes da banca, pelas sugestões e trabalho dedicado a correção desta tese.

## RESUMO

Tese de Doutorado

Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica  
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

### **PAPEL DO RECEPTOR B<sub>1</sub> PARA CININAS E O EFEITO DA INIBIÇÃO DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA EM ATAQUES AGUDOS DE GOTA EM ROEDORES**

AUTORA: Cássia Regina da Silva

ORIENTADOR: Juliano Ferreira

LOCAL E DATA DA DEFESA: Santa Maria, 20 de agosto de 2014

A gota, ou artrite gotosa, está associada à ocorrência de diversas comorbidades como doenças renais e cardiovasculares. Alguns dos fármacos utilizados para o tratamento destas comorbidades podem ainda precipitar ataques agudos de gota. Um exemplo são os inibidores da enzima cininase II ou enzima conversora de angiotensina (iECA). Muitos dos efeitos cardioprotetores dos iECA são mediados pelos receptores B<sub>1</sub> para cininas. Além disso, a inibição da ECA é capaz de bloquear a hidrólise da bradicinina, que por sua vez é também um substrato para a formação do agonista do receptor B<sub>1</sub>, des-Arg<sup>9</sup>-bradicinina, pela ação da enzima cininase I. Apesar dos estudos demonstrando o envolvimento do sistema das cininas na gota e do papel do receptor B<sub>1</sub> na iniciação e manutenção da inflamação, não se conhece a relação do receptor B<sub>1</sub> com a gota, especialmente durante a inibição da ECA. Assim, o presente estudo tem por objetivo verificar o papel do receptor B<sub>1</sub> para cininas durante o ataque agudo de gota induzido por cristais de urato monossódico (MSU) em roedores, incluindo aqueles tratados com iECA.

Para isso, a dor (alodínia ao toque e comportamento doloroso espontâneo) e alguns parâmetros inflamatórios (edema articular, concentração de proteínas, infiltração leucocitária, avaliação da cinética de leucócitos e níveis de interleucina-1β) causados pelo ataque agudo de gota foram avaliados em diferentes tempos após a injeção intra-articular (IA) de uma alta dose de MSU no tornozelo de roedores. O papel do receptor B<sub>1</sub> foi investigado através de seu antagonismo farmacológico, pela utilização de roedores com deleção gênica do receptor e pela inibição da enzima cininase I. Ainda, a expressão do receptor B<sub>1</sub> no tecido do tornozelo e neurônios sensoriais, atividade da enzima cininase I e os níveis de des-Arg<sup>9</sup>-bradicinina foram analisados no fluido sinovial dos roedores submetidos ao modelo de gota. Ferramentas semelhantes foram utilizadas para a investigação do envolvimento dos receptores B<sub>1</sub> na inflamação causadas pela inibição da ECA em animais submetidos a injeção IA de uma baixa dose de MSU, que não apresentava efeito *per se*.

Tanto o uso de antagonistas do receptor B<sub>1</sub>, como sua deleção gênica, foram capazes de reduzir a inflamação neste modelo de gota. Além disso, o MSU causou um aumento na expressão de receptores B<sub>1</sub> na articulação, e também um aumento dos níveis do agonista B<sub>1</sub>, des-Arg<sup>9</sup>-bradicinina e da atividade da enzima cininase I. Por último, a baixa dose de MSU foi capaz de causar um ataque agudo de gota em animais pré-tratados com iECA, por um mecanismo que envolve a ativação de receptores B<sub>1</sub>.

Concluimos que a ativação do receptor B<sub>1</sub> contribui para o desenvolvimento do ataque agudo de gota, incluindo aqueles que são precipitados pelo tratamento com iECA. Assim, o B<sub>1</sub> apresenta um potencial terapêutico para o tratamento e profilaxia da gota, especialmente em indivíduos que fazem uso de iECA.

Palavras-Chave: Artrite gotosa. Dor. Inflamação. Cininas. Cristais de urato.

## **ABSTRACT**

PhD Thesis

Graduate Course in Biological Sciences: Toxicological Biochemistry  
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

### **THE ROLE OF BRADYKININ B<sub>1</sub> RECEPTOR AND THE EFFECT OF ANGIOTENSIN -CONVERTING ENZYME INHIBITION ON ACUTE GOUT ATTACKS IN RODENTS**

AUTHOR: Cássia Regina da Silva

ADVISOR: Juliano Ferreira

PLACE AND DATE OF THE DEFENSE: Santa Maria, August, 20<sup>th</sup>, 2014.

Gout, or gouty arthritis, has been associated of a range of comorbidities as hypertension and kidney diseases. Some studies have indicated that certain antihypertensive drugs, such as angiotensin I-converting enzyme inhibitors (ACEi), increase the risk of gout. Notably, ACEi block the metabolism of several peptides, in particular bradykinin hydrolysis. Bradykinin is also a substrate for kininase I, which forms des-Arg-kinin B<sub>1</sub>R agonists. Therefore, ACE inhibition can activate the B<sub>1</sub>R pathway. Moreover, ACEi are allosteric enhancers of kinin receptors and B<sub>1</sub>R are linked to inflammatory cardiovascular diseases. However, despite the body of evidence demonstrating a clear contribution of the kinin system to the pathogenesis of some arthritic conditions, the role of the kinin B<sub>1</sub> receptor in monosodium urate (MSU) crystals crystal-induced gout is currently unknown, especially in respect to ACEi. Thus, the aim of the present study was to verify the role of the bradykinin B<sub>1</sub> receptors and the effect of ACEi on acute gout induced by MSU crystals in rodents.

Painful (overt pain and allodynia) and inflammatory parameters (joint edema, leukocyte trafficking, interleukin-1 $\beta$  levels) of acute gout attacks were assessed several hours after intra-articular (IA) injection of MSU (1.25 or 0.5 mg/articulation) in the ankle of rats or mice, respectively. The role of B<sub>1</sub>R was investigated by pharmacological antagonism or gene deletion. In addition, B<sub>1</sub>R immunoreactivity on ankle tissue and sensory neurons, kininase I activity and des-Arg<sup>9</sup>-bradykinin synovial levels were also measured. Similar tools were used to investigate the effects of ACEi on low dose of MSU (0.0125 mg/articulation)-induced inflammation.

Both, bradykinin B<sub>1</sub>R antagonism or gene deletion largely reduced all painful and inflammatory signs of gout. Furthermore, MSU increased not only the B<sub>1</sub>R expression in articular tissues, but also the content of the B<sub>1</sub> agonist des-Arg<sup>9</sup>-bradykinin and the activity of the B<sub>1</sub> agonist-forming enzyme kininase I. Finally, low dose of MSU crystals (which did not induced inflammation in control animals) was capable of causing signs of acute gout attacks in ACEi-treated animals, which was B<sub>1</sub>R-dependent.

Concluding, bradykinin B<sub>1</sub>R activation contributes to acute gouty attacks, including the ones facilitated by ACEi. Thus, B<sub>1</sub>R is a potential therapeutic target for treatment and prophylaxis of gout, especially in patients taking ACEi.

Keywords: Gouty arthritis. Nociception. Inflammation. Kinins. Urate crystals.



## LISTA DE ABREVIATURAS

AINEs	Antiinflamatórios Não- Esteroidais
ANOVA	Análise de Variância
B <sub>1</sub> R	Receptor B <sub>1</sub>
BK	Bradicinina
CCL	Proteína Quimioatrativa para Monócitos
CPM	Carboxipeptidase M
CXC	Peptídeo Ativador de Neutrófilo
DABK	des-Arg <sup>9</sup> -bradicinina
DAG	Diacylglicerol
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DRG	Gânglio da Raiz Dorsal
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
IASP	Associação Internacional para o Estudo da Dor
ICAM	Molécula de Adesão Intrrecelular
IP3	Trifosfato de Inositol
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
MSU	Cristais de Urato Monossódico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PK	Proteína Quinase
pKa	Potencial de Ionização
PLC	Fosfolipase C
RNA	Ácido Ribonucleico
TGF	Fator de Crescimento Transformador
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TRPA1	Receptor de Potencial Transitório A1
TRPV1	Receptor de Potencial Transitório Vanilóide
URAT1	Transportador de Urato 1
VCAM	Molécula de Adesão Celular Vascular

## LISTA DE FIGURAS

### Manuscrito

**Figure 1** - The protective effect of the selective B<sub>1</sub>R antagonist SSR240612 (10 nmol/articulation) (A, B, C) and B<sub>1</sub>R ablation (B<sub>1</sub><sup>-/-</sup>) (E, F, G) on touch allodynia (PWT: paw withdrawal threshold, A), overt pain-like behaviors (B, F) and oedema (C, G) induced by an IA MSU injection (1.25 mg/articulation). B<sub>1</sub>R expression (D) increased by IA MSU injection. N=6 per group, only rats (A-C), N=4 per group, only rats (D) and N=7 per group, only mice (E-G). .....53

**Figure 2** - The protective effect of the B<sub>1</sub>R antagonist SSR240612 (10 nmol/articulation) on synovial lavage fluid protein content (A), IL-1 $\beta$  levels (B), total leukocyte number (C), MPO levels (D), and leukocyte rolling (E) and adherence (F) were increased by IA MSU injection (1.25 mg/articulation). Representative intravital microscope images of vehicle (G), MSU (H), and SSR240612 plus MSU (I) on leukocyte accumulation in an ankle blood vessel. N=5 per group, only rats were used. ....55

**Figure 3** - The protective effect of the kininase I inhibitor Mergepta (0.05 nmol/articulation) on touch allodynia (A), overt pain-like behaviors (B) and oedema (C) induced by MSU IA injections (1.25 mg/articulation). Synovial lavage fluid kininase I activity (D) and articular tissue DABK levels (E) increased by MSU injection. The measurements, with except of F, were made two hours after IA injections. N=5 per group (A-D) and N=4 per group (E), only rats were used. ....57

**Figure 4** - Total number of Fluoro-Gold positive cells (A) and the number of Fluoro-Gold and B<sub>1</sub> co-localized positive cells (B) from L3, L4 and L5 dorsal root ganglia (DRGs), 2 h after vehicle or MSU (1.25 mg/articulation) IA injections. Size distribution of Fluoro-Gold and B<sub>1</sub> co-localized cells in L3, L4

and L5 DRGs (C). N=4 for per group, only rats were used. Photomicrographs shown in the left panel: retrograde labeling of ankle joint afferent DRGs with Fluoro-Gold taken from L3 (D), L4 (E) and L5 (F); right panel: immunofluorescent images revealing co-localization of B<sub>1</sub>-positive cells in the corresponding L3–L5 DRGs (G-I). Scale bar, 50 μm. ....58

**Figure 5.** Articular tissue ACE activity (A), touch allodynia (B), overt pain-like behaviors (C) and oedema (D) in animals pre-treated with saline or enalapril (3 mg/kg, p.o.) 0.5 h before the IA injection of a low dose of MSU (0.0125 mg/articulation). N=8 per group, only rats were used. ....59

**Figure 6.** The protective effect of the kininase I inhibitor Mergepta (0.5 nmol/articulation) and the B<sub>1</sub>R antagonist SSR240612 (10 nmol/articulation) on touch allodynia (A), overt pain-like behaviors (B) and oedema (C) in animals pre-treated with enalapril (3 mg/kg, p.o.) 0.5 h before the IA injection of a low dose of MSU (0.0125 mg/articulation). Synovial lavage fluid kininase I activity (D) and articular tissue DABK levels (E) in animals pre-treated with saline or enalapril 0.5 h before MSU-IA injection. All measures were made two hours after IA injections. N=8 for per group (A-C) and N=5 per group (D, E), only rats were used. ....62

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	15
1.1 Artrite gotosa.....	17
1.2 Ácido úrico e hiperuricemia.....	18
1.3 Ataque agudo de gota.....	22
1.4 Tratamento.....	27
1.5 Sistema cininas-caliceínas.....	31
1.6 Participação do sistema cinina-caliceína nos processos de artrite.....	39
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	43
2.1 Objetivo Geral.....	44
2.2 Objetivos Específicos.....	44
<b>3. MANUSCRITO CIENTÍFICO</b> .....	45
Abstract.....	46
Introduction.....	47
Material and methods.....	48
Results.....	53
Discussion.....	64
References.....	68
<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	85
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	94
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	98
<b>7. Apêndice A – Artigo científico</b> .....	111

---

## 1. APRESENTAÇÃO

## APRESENTAÇÃO

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

Apresenta-se os itens metodologia e resultados que compõem esta tese sob a forma de artigo científico enviado para publicação, o qual se encontra no item **ARTIGO**. Já as seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas encontra-se no próprio artigo e representam a íntegra deste estudo.

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

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

No item **APENDICE A** consta um artigo completo publicado, que é requisito necessário para obtenção do título de doutor.

---

## 1. INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), as doenças musculoesqueléticas são a principal causa de incapacidade física na sociedade atual, afetando um em cada três indivíduos (WHO, 2003). Além de sua grande prevalência sobre a população, as doenças musculoesqueléticas incluem diferentes condições e síndromes com o denominador comum de dor e/ou inflamação (WHO, 2003; WOOLF et al., 2010).

Entre as doenças musculoesqueléticas, as doenças reumáticas são as de maior incidência, sendo reconhecidas mais de 100 doenças reumáticas. Estas doenças são caracterizadas pela dor e comprometimento físico progressivo de articulações e tecidos moles que as rodeiam (MCDUGALL, 2006; BUCHANAN e DAQUEKER, 2003). O comprometimento físico atinge funções musculoesqueléticas básicas como locomover-se, afetando por sua vez, atividades diárias básicas como comer, se vestir e sair de casa. Em decorrência do comprometimento físico surge então o comprometimento social e o indivíduo com alguma doença reumática encontra dificuldades em interagir com outras pessoas. Desta forma, as doenças reumáticas atingem não só os portadores, mas também suas famílias e a sociedade em geral, no âmbito econômico e social, devido às limitações que a doença impõe (BECKER et al., 2009; BENEDEK, 1997).

As doenças reumáticas precedem o homem na terra, sendo que indícios de osteoartrose foram documentados em um fóssil de um Platicarpo, réptil que viveu há cerca de cem milhões de anos (VIANA DE QUEIROZ, 1996). O termo *rheuma* (que significa “fluxo”) foi introduzido no século primeiro depois de Cristo. Nesta mesma época a doença era cercada por crenças. Acreditava-se na existência de quatro humores: sangue, fleuma, bÍlis amarela e bÍlis negra, e toda doença era atribuída a um desequilÍbrio em algum destes humores. Assim, o “reumatismo” seria advindo de um desequilÍbrio no fleuma, uma serosidade fria que se acreditava partir do cérebro e cobrir as articulações. Apesar de muito antigas, as doenças reumáticas foram reconhecidas como sendo uma síndrome musculoesquelética por Guillaume Baillou em um trabalho publicado apenas em 1642 (BENEDEK, 1997).

Dentre as doenças reumáticas, a gota ou artrite gotosa foi uma das primeiras artrites a ser clinicamente descrita e está entre as artrites de maior prevalência, sendo a artrite inflamatória mais comum entre homens acima dos 40 anos de idade (RICHETTE e BRADIN, 2010; NEOGI, 2011; JOSHI, 2012).



### **1.1 Artrite gotosa**

A primeira evidência de gota em humanos data de 2640 a.C. e foi documentada a partir de achados em uma múmia egípcia, escavada próxima ao templo de Isis na região de Philae (NUKI et al., 2006). Evidências escritas datam do ano 400 a.C e foram feitas por Hipócrates, que descreve pela primeira vez a “podagra” (do grego “*podos*” pé, e “*agra*” ataque), ataque de gota agudo que ocorre na primeira articulação metatarsofalangeal do pé, ou hálux (Hipócrates apud ADAMS, 1886). Algumas das definições de Hipócrates em relação aos sintomas e ocorrência da doença são aplicáveis ainda hoje. Dois conceitos citados por Hipócrates são válidos por milênios, o de que a doença ocorria predominantemente em homens após a puberdade e, que havia uma ligação entre o estilo de vida e a ocorrência dos ataques agudos de gota. Hipócrates descreveu a gota como “artrite dos ricos”, devido à sua associação com a ingestão excessiva de alimentos ricos em purinas e de álcool (Hipócrates apud ADAMS, 1886).

O Greco-Romano Claudii Galeni faz a primeira descrição do “topho” como sendo nódulos duros depositados sob a pele e ao redor das articulações (GALENI, 1826 apud Khun, 1965, p. 1821). Já a palavra gota, do latim “*gutta*” - *gotejar*, foi cunhada pelo monge Frances Randolphus of Bocking (Copeman, 1964). A origem da palavra vem da crença medieval onde o excesso de um dos quatro humores responsáveis por manter o equilíbrio do indivíduo, gotejava para a articulação resultando em dor e inflamação, como comentado anteriormente (COPEMAN, 1964).

A história moderna da gota começa com a percepção do cristal e a descrição dos sintomas clínicos da doença. O primeiro em 1634, quando Antoni van Leeuwenhoek, um pioneiro da microscopia, descreveu a presença de cristais em um tofo. E o segundo em 1683, por Thomas Sydenham, médico inglês que baseado em seu próprio sofrimento de 34 anos de gotoso descreveu a dor experimentada durante o ataque agudo:

O paciente vai para a cama e dorme serenamente até que, pelas duas de manhã, é acordado por uma dor que normalmente é no dedo grande do pé, mas as vezes atinge ainda o calcanhar, o tornozelo e a panturrilha. A dor lembra ao deslocamento de um osso e é subitamente sucedida por relaxamento, tremores e febre [...] A dor, que é suave no início, aumenta e se torna mais violenta a cada hora [...] É uma dor de tão grande requinte que você

não suporta o peso das roupas nem mesmo o andar de outra pessoa no mesmo cômodo [...] (SYDENHAM apud NUKI, 2006, tradução nossa).

Já a relação do ácido úrico com a gota menciona-se apenas em 1787, quando o pesquisador WOLLASTON demonstrou a presença de urato monossódico (MSU) em um tofo de sua própria orelha. E apenas em 1859 que surge então uma relação mais convincente. É quando o inglês Sir Alfred Baring Garrod desenvolve um método semiquantitativo para a dosagem de ácido úrico no soro e na urina (GARROD, 1859). Garrod também demonstrou a presença de urato monossódico em tecidos subcutâneos e cartilagem articular em indivíduos com gota e sugeriu que os depósitos de urato monossódico seriam a causa, e não a consequência da inflamação (GARROD, 1859). Então em 1961, MCCARTHY e HOLLANDER introduzem o uso da microscopia com luz polarizada na identificação de cristais de urato monossódico em pacientes com gota, e de pirofosfato de cálcio em pacientes com pseudogota (MCCARTY e HOLLANDER, 1962). Estes dois estudiosos injetaram cristais de urato monossódico em seus próprios joelhos, desenvolvendo uma inflamação aguda com todas as características de um ataque agudo de gota, e assim demonstraram que os cristais eram “disparadores” da artrite gotosa (MCCARTY et al., 1961).

## **1.2 Ácido úrico e hiperuricemia**

O ácido úrico é um composto orgânico, cuja fórmula química é  $C_5H_4N_4O_3$ . É um ácido fraco com um  $pK_a$  de 5,75, encontrado no organismo predominantemente na sua forma ionizada de urato (KUTZING e FIRESTEIN, 2008). Nos mamíferos, o ácido úrico é o produto final do metabolismo de bases purínicas (ÁLVAREZ-LARIO e MACARRÓN-VICENTE, 2010). As purinas são bases nitrogenadas e compostos orgânicos heterocíclicos que desempenham funções especiais na duplicação de material genético, transcrição genética, síntese proteica, e são fundamentais ao metabolismo celular. As purinas são degradadas a hipoxantina e esta em xantina, e por ação da enzima xantina oxidase a xantina é então convertida em ácido úrico. A maioria dos mamíferos possui a enzima hepática uricase, que converte o ácido úrico em alantoína, um composto mais solúvel e facilmente excretado pela urina (TANIGUCHI e KAMATANI, 2008; SO e THORENS, 2010). Porém os humanos

sofreram mutações no gene da uricase que resultaram na perda evolutiva de sua função, sendo o ácido úrico o produto final de excreção (ALVAREZ-LARIO e MACARRÓN-VICENTE, 2010). Este fato contribuiu para a formação das teorias a respeito de um possível papel benéfico do ácido úrico. Porém, indivíduos portadores de xantínúria, uma deficiência de xantina oxidase que leva a completa ausência de ácido úrico, não apresentam nenhum outro sintoma além da formação de cálculos compostos de xantina (ROCK et al., 2013).

Pelo contrário, altas concentrações de ácido úrico possuem efeitos pró-oxidantes e estão associadas ao desenvolvimento de gota e um risco aumentado de se desenvolver doenças vasculares e problemas renais (FEIG et al., 2008; KUTZING e FIRESTEIN, 2008; TERKELTAUB et al., 2006). Neste sentido, estudos epidemiológicos mostram uma associação entre níveis aumentados de ácido úrico e hipertensão, aterosclerose ou ainda síndrome metabólica (ROCK et al., 2013). Esta correlação é de extrema importância uma vez que pacientes com gota, que possuem níveis aumentados de ácido úrico, apresentam diversas comorbidades limitando a terapia a ser empregada e criando um grupo cada vez maior de pacientes difíceis de serem tratados. Apenas para se ter uma idéia, 78% dos indivíduos com gota apresentam hipertensão e até 60% apresentam disfunções renais (KUTZING e FIRESTEIN, 2008; CHOI et al., 2012).

A concentração de ácido úrico presente em nosso organismo encontra-se próxima ao limite de solubilidade, que no plasma sanguíneo, em pH (7,4) e temperatura (37°C) fisiológicos, é de aproximadamente 6,8 mg/dl (404 µmol/l), variando de indivíduo para indivíduo (MANDEL, 2008; TERKELTAUB et al., 2010; NEOGY, 2011). Crianças apresentam concentrações de ácido úrico em torno de 3 – 4 mg/dl. Estes níveis aumentam para 6,8 mg/dl durante a puberdade para homens, e nas mulheres fica em torno de 6 mg/dl se aproximando de valores maiores após a menopausa. Esta particularidade nas mulheres é atribuída em parte ao fato do hormônio estrogênio apresentar um efeito direto sobre a expressão do transportador de urato (URAT1) presente no túbulo proximal renal, com efeitos diretos sobre a reabsorção do ácido úrico (KUTZING e FIRESTEIN, 2008). Em geral, nós apresentamos níveis de ácido úrico superiores a maioria das outras espécies e somos predispostos a desenvolver hiperuricemia, quadro clínico onde as concentrações de ácido úrico encontram-se superiores ao limite de solubilidade (ALVAREZ-LARIO e MACARRÓN-VICENTE, 2010).

A hiperuricemia é uma condição relativamente comum, atingindo cerca de 10% da população, porém a dosagem de ácido úrico não é rotina em exames laboratoriais. Mesmo que assintomática e independente do desenvolvimento de gota, a hiperuricemia não é benigna e está relacionada a ocorrência de doenças renais, cardiovasculares, síndrome metabólica, diabetes melitus, entre outras (ALVAREZ-LARIO e MACARRÓN-VICENTE, 2010; KHANNA et al., 2012). O risco de se desenvolver gota aumenta com a cronicidade da hiperuricemia e com os níveis de ácido úrico, porém, esta condição nem sempre evolui para o desenvolvimento da doença. Não se sabe ao certo os fatores que diferenciam indivíduos hiperuricemicos que desenvolvem gota daqueles que nunca apresentarão um ataque agudo da doença. Cerca de 30% dos indivíduos hiperuricemicos irão desenvolver gota, sugerindo que há outros fatores envolvidos na formação dos cristais de urato monossódico e sua atividade pró-inflamatória (ANNEMANS et al., 2008).

Quando a concentração máxima de ácido úrico ultrapassa os níveis de saturação no sangue, há um aumento do risco de cristalização. O urato depositado na articulação ou em tecidos periarticulares possibilita então sua ligação a um ânion sódio formando o urato monossódico (BUSSO e SO, 2010). Outros fatores que facilitam a cristalização do ácido úrico são as mudanças no pH (p.ex. cetose pós operatória), diminuição da temperatura (explicando ataques noturnos), força iônica e ligação a macromoléculas plasmáticas (BUSSO e SO, 2010). Ainda, há algumas características no fluido sinovial de indivíduos com gota que chamam a atenção. Por exemplo, o fluido sinovial de indivíduos gotosos promove a cristalização do urato monossódico mais facilmente que o fluido sinovial de indivíduos saudáveis ou com outras artrites, como a reumatóide e a osteoartrite. Em adição, fluidos biológicos obtidos de pacientes gotosos são capazes de regular o tamanho e a uniformidade dos cristais mantendo-os em tamanhos menores. Estes cristais parecem ser mais patogênicos demonstrando que indivíduos com gota possuem um ambiente sinovial mais propício a cristalização do urato monossódico (MARTINON, 2010).

As quantidades de ácido úrico no organismo são resultado do balanço entre a ingestão dietética, a síntese endógena e a taxa de excreção. Desta forma, uma dieta rica em alimentos de origem animal com grande quantidade de purinas facilita o desenvolvimento de hiperuricemia e está ligada a maior incidência dos ataques agudos da doença (HARROLD, 2013). A minoria dos pacientes com hiperuricemia

apresentam problemas relacionados a superprodução de ácido úrico. Superprodução ocorre em algumas desordens genéticas que levam ao “turnover” aumentado de nucleotídeos. É o que acontece nas desordens mielo e linfoproliferativas, anemia hemolítica, doença de Paget e psoríase (TERKELTAUB, 1996). Os níveis de ácido úrico também podem estar relacionados a anormalidades no funcionamento da atividade de enzimas envolvidas na síntese de nucleotídeos purínicos, como deficiência da hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase ou hiperatividade da 5-fosforribosil-1-pirofosfato sintetase. Apesar destas diferentes formas de alteração nos níveis de ácido úrico, na grande maioria dos pacientes com gota, a hiperuricemia é associada a problemas na excreção renal do ácido úrico (LEE e TERKELTAUB, 2006).

Aproximadamente dois terços a três quartos da eliminação do ácido úrico é feita pelos rins, o restante por via intestinal, porém problemas relacionados a excreção por via intestinal não tem sido associados com hiperuricemia (TANAGUCHI e KAMATANI, 2008). O transporte renal de ácido úrico é regulado por quatro componentes que incluem a filtração glomerular, reabsorção, secreção e reabsorção pós-secretória (KUTZING e FIRESTEIN, 2008). Apesar de ocorrer a quase que completa filtração do ácido úrico nos glomérulos, apenas 8 a 12 % é realmente excretado sendo que o restante é reabsorvido no túbulo proximal renal (LEE e TERKELTAUB, 2006; TANIGUCHI e KAMATANI 2008). Os problemas na excreção do ácido úrico estão associados a diversas condições e doenças que acabam afetando o funcionamento dos rins como o alto consumo de bebidas alcoólicas, doenças renais, diabetes insípida, hipertensão, uso de medicações como diuréticos e salicilatos, entre outros. Talvez por isso a gota atinja comumente a população mais idosa, onde são mais comuns a ocorrência de outras comorbidades, assim como o uso de medicamentos (TERKELTAUB, 2010). Ainda, fatores genéticos, que são de rara ocorrência, como o polimorfismo no gene SLC22A12, ou a doença autossômica dominante nefropatia hiperuricêmica juvenil familiar, estão associados a menor capacidade renal de excreção do ácido úrico, contribuindo assim para o desenvolvimento de hiperuricemia e gota (TANIGUCHI e KAMATANI, 2008).

Todos os fatores citados acima contribuem com o desenvolvimento da hiperuricemia. E ao contrário do que se pode imaginar, até o presente não há tratamento da hiperuricemia assintomática como uma forma de prevenção ao

desenvolvimento de doenças associadas, como a gota. Assim, após apresentar hiperuricemia por em média 5 anos, uma parcela destes indivíduos desenvolverá o primeiro ataque agudo de gota (MANDEL, 2008) .

### **1.3 Ataque agudo de gota**

O ataque agudo de gota, clinicamente, se caracteriza pelo período onde o indivíduo vivência os sintomas clássicos de uma resposta inflamatória (MANDEL, 2008). A articulação fica edemaciada, há grande presença de leucócitos no fluido sinovial e a pele circundante torna-se vermelha ou púrpura, rígida e brilhante, com uma sensação de calor e percepção de dor de forte intensidade (CHOI et al., 2005a).

As estimativas indicam que em 90% dos indivíduos gotosos o primeiro ataque agudo é monoarticular e ocorre principalmente nas baixas extremidades, como a articulação metatarso falangeana (dedos dos pés) e túbio tarsal (tornozelo). Com o tempo outras articulações começam a ser atingidas, incluindo as altas extremidades, como metacarpo falangeanas (dedos das mãos) e epicôndilo medial (cotovelo) (MANDEL, 2008; CRONSTEIN e SUNKUREDDI, 2013). Os ataques agudos também podem ocorrer em estruturas periarticulares, como tendões, mas é incomum. Outro fator comumente descrito pelos gotosos é de que a primeira manifestação da gota ocorre na articulação metacarpo falangeana do dedo grande do pé, sendo conhecida pelo nome de podagra, como citado anteriormente (SCHLESINGER, 2007; BUSSO e SO, 2010; NEOGI, 2011).

Os ataques são muitas vezes desencadeados por algum evento específico como fratura, cirurgia, alguma outra doença intercorrente, ingestão excessiva de álcool nos dias anteriores ou o uso de alguma medicação que altere os níveis de ácido úrico. Especula-se que estes eventos possam estimular a síntese de novo de ácido úrico pela geração de bases purínicas, uma vez que a injúria celular leva a rápida degradação de RNA e DNA, ou ainda levar a liberação de cristais de urato pré-formados e depositados nas articulações (SHI et al., 2003; DALBETH e HASKARD, 2005).

Normalmente o ataque se inicia a noite ou ao amanhecer, e os pacientes descrevem serem acordados pela dor, tão intensa sua ocorrência. Ainda, a intensidade da dor aumenta com o passar do tempo e chega ao ponto em que o indivíduo não consegue suportar o peso do lençol, ficar em pé, e alguns dizem que

mesmo o movimento de outra pessoa no mesmo cômodo intensifica o estado doloroso (BUSSO e SO, 2010). Sob tais circunstâncias, os pacientes descrevem desconforto e sensibilidade anormal e passam a perceber estímulos mecânicos anteriormente inócuos como dolorosos (dor resultante de estímulos não nociceptivos denominada alodínia). Outra possibilidade é a percepção exacerbada da dor a estímulos que já eram anteriormente descritos como dolorosos (dor resultante de estímulos nociceptivos denominada hiperalgesia). E ainda, sensação de dor mesmo na ausência de qualquer estímulo externo (dor espontânea, atualmente referida como dor em curso) (LOESER e TREED, 2008; WOOLF, 2010). Nesse caso, tanto células residentes no sítio da lesão (como sinoviócitos, por exemplo), quanto leucócitos recrutados para a região (como neutrófilos e linfócitos) podem causar a liberação de mediadores inflamatórios levando a sensibilização de fibras sensoriais (LANDIS E HASKARD, 2001).

A detecção dos estímulos nocivos é feita pelos 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). 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, no gânglio trigeminal (TG) 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). Existem duas principais classes de nociceptores, uma composta por neurônios não mielinizados, as fibras C, e outra formada por neurônios finamente mielinizados, as fibras A $\delta$ . Há ainda as fibras mielinizadas de grande diâmetro A $\beta$ , que medeiam a transmissão rápida de estímulos sensoriais inócuos ou não nocivos (estímulos proprioceptivos) (JULIUS e BASBAUM, 2001). Desta forma, a dor que ocorre durante o ataque agudo de gota pode envolver a ativação ou sensibilização de alvos específicos expressos nos nociceptores que inervem a articulação afetada.

O ataque agudo tem uma duração média de 10 dias, sendo que após este período, mesmo sem tratamento, os sintomas da inflamação, como a dor, desaparecem e tem início uma nova fase assintomática denominada período intercrítico, por se tratar do período entre dois ataques agudos (DALBETH e

HASKARD, 2005). Apesar de assintomática, durante o período intercrítico a hiperuricemia persiste e estes depósitos crescem silenciosamente e se expandem para os tecidos periarticulares. Com o progresso da doença e a repetição dos ataques, o período intercrítico se torna cada vez menor e o ataque mais prolongado. Após um ataque agudo de gota a chance de recorrência do ataque é de aproximadamente 60% no primeiro ano após o ataque, 78% no segundo ano atingindo 84% de chance de reincidência no terceiro ano. O paciente pode desenvolver tofos como forma de cronificação da doença levando a dificuldade de realizar movimentos ou ainda erosão óssea (SUNDY, 2010).

Existem diferentes modelos animais para o estudo da gota. Exemplos são os modelos que utilizam a injeção de MSU no peritônio de roedores, injeção de MSU na articulação do joelho ou ainda na pata, e o modelo de hiperuricemia induzida por ácido oxônico. Porém, a injeção intraperitoneal e o modelo de hiperuricemia não permitem a análise de parâmetros como dor nestes animais, fator importante pois a dor é um dos sintomas mais extenuantes nos indivíduos acometidos pela doença. A injeção na pata não contempla o ambiente articular, e a injeção no joelho permite avaliar a gota em uma grande articulação, ao passo que a gota se desenvolve com maior frequência em pequenas articulações e de baixa extremidade. Portanto, na busca de um modelo pré-clínico que permita a avaliação de parâmetros inflamatórios e nociceptivos e ainda, com a maior proximidade possível com a clínica, torna-se interessante a utilização do modelo de injeção de MSU na articulação tibio-tarsal (articulação do tornozelo), pois este modelo contempla uma pequena articulação e leva ao desenvolvimento de dor, edema e infiltração celular, bem próximo ao que é observado em humanos.

Com o estudo da gota, diferentes mecanismos moleculares têm sido propostos como responsáveis pela resposta inflamatória que ocorre durante o ataque agudo de gota. Em comum, estes trabalhos reconhecem a importância da citocina interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e a massiva presença de leucócitos, principalmente neutrófilos, em resposta aos cristais de MSU (MARTINON e GLIMCHER, 2006; SCOTT et al., 2006; MARTIN e HARPER, 2010; POPA-NITA e NACACHE, 2010; MALAWISTA et al., 2011; STEIGER e HARPER, 2013).

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. O influxo de neutrófilos e sua interação com o MSU leva a



produção e liberação de diferentes mediadores inflamatórios como as citocinas interleucina 6 (IL-6), IL-1 $\beta$  e IL-8, quimiocinas como a quimiotática para monócitos (MCP-1/CCL2) e quimiocina CXC lipopolisacarídeo-induzida (CXCL5), leucotrieno B<sub>4</sub>, prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), entre outros (TERKELTAUB et al., 1991; BUSSO e SO, 2010; MITROULIS et al., 2013). Além disso, sugere-se que os macrófagos residentes na articulação (sinoviócitos tipo A) assim como os que migram para o tecido articular, também sejam importantes para a produção de mediadores pró-inflamatórios na gota (DALBETH e HASKARD, 2005; MALAWISTA, 2010).

A IL-1 $\beta$  é a principal citocina envolvida na cascata de eventos inflamatórios em resposta aos cristais de MSU, e após liberada atua no recrutamento e ativação de mais neutrófilos para a área inflamada, criando um ciclo de eventos que auxiliam na manutenção e amplificação da resposta inflamatória (SO et al., 2007; SCANU et al., 2012; MITROULIS et al., 2013). Reforçando assim sua importância no processo inflamatório da gota a terapia com agentes anticitocinas têm se mostrado uma alternativa promissora para o tratamento da doença. Os fármacos anticitocinas, como o anticorpo anti- IL-1 $\beta$  Canakinumab, e a forma recombinante da interleucina Riloncept, bloqueiam a ação da IL-1 $\beta$  demonstrando eficiência em aliviar rapidamente a dor causada tanto pelos quadros agudos de gota quanto pelos quadros crônicos (SO et al., 2007; SCHLESINGER, 2014).

O processo de quimiotaxia, por sua vez, envolve a expressão e ativação de diferentes moléculas de adesão (CHAPMAN et al., 1997; TORRES et al., 2009). De fato, durante a resposta inflamatória ocorre a expressão e ativação de moléculas de adesão como a E- e P-selectina, como já foi evidenciado para o MSU (CHAPMAN et al., 1997). Adicionalmente, é possível que estejam envolvidas ainda a molécula de adesão intracelular 1 (ICAM-1) e a molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM-1), igualmente importantes para a ocorrência de vasodilatação, aumento do fluxo sanguíneo e maior permeabilidade a proteínas plasmáticas, auxiliando na migração leucocitária.

Pondera-se que os cristais de MSU possam interagir diretamente com a superfície celular de alguns receptores ou indiretamente por fagocitose (MARTINON e GLIMCHER, 2006; NG, 2008). Por fagocitose, subsequente ao englobamento do cristal por macrófagos, estes também são ativados, resultando na expressão de fatores pró-inflamatórios, incluindo IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e ciclooxigenase-2. Por interação com receptores ou superfície celular, há estudos que sugerem o reconhecimento do

MSU por receptores de membrana, ou ainda, que o MSU seja capaz de promover a ativação do inflamasoma (complexo formado pela proteína intracelular de reconhecimento de antígenos criopirina, pela proteína adaptadora e pela caspase-1) (MARTINON et al., 2006; SCHRODER e TSCHOPP, 2010). Em relação aos receptores de membrana, recentemente demonstrou-se que os receptores de potencial transitório vanilóide (TRPV1) e os do tipo A1 (TRPA1), ambos expressos em neurônios sensoriais, estão envolvidos nas respostas inflamatórias evocadas pelo MSU (TREVISAN et al., 2014; HOFFMEISTER et al., 2014). Estes estudos sugerem que o processo de fagocitose do MSU desencadeie a produção de peróxido de hidrogênio, que por sua vez, ativa o receptor TRPA1. Neste sentido, já foi observado que pacientes com gota apresentam um nível aumentado de espécies oxidantes em comparação a indivíduos saudáveis, e outros estudos já haviam relatado a liberação de espécies reativas de oxigênio estimulada por MSU (Martin et al., 2010; TREVISAN et al., 2014).

Outro fato interessante do início da resposta inflamatória se refere a opsonização dos cristais. Alguns estudos sugerem que os cristais são capazes de adsorver proteínas em sua superfície, incluindo imunoglobulinas (IgG), proteínas de adesão e proteínas do sistema complemento (PERKIN e ZVAIFLER, 1964; WEBSTER et al., 1972; SHI et al., 2003; DALBETH e HASKARD, 2005; BUSSO e SO, 2010). A opsonização seria guiada pela interação direta destas proteínas com a superfície de carga negativa que o cristal apresenta (RUSSEL et al., 1982; MARTIN e HARPER, 2010). Neste cenário, a ativação da via alternativa do sistema complemento pelo cristal parece ainda facilitar a migração de monócitos para a área da inflamação através da produção de quimiocinas como a MCP-1/CCL2 (MATSUKAWA et al., 1998).

Mesmo na ausência de tratamento, após um período aproximado de 10 dias, a resposta inflamatória ao cristal sofre remissão espontânea. Vários fatores parecem estar envolvidos nesta fase de remissão, como a expressão de apolipoproteínas B e E na superfície do cristal, remoção de células apoptóticas, aumento nos níveis de interleucinas antiinflamatórias como a IL-10 e o recrutamento e diferenciação de monócitos em macrófagos, resultando na produção de fator de crescimento transformador  $\beta$  (TGF $\beta$ ) (TERKELTAUB et al., 1991; POPA-NITA e NACCACHE, 2010; MARTIN e HARPER, 2010; SCANU et al., 2010). No que diz respeito ao papel dos neutrófilos neste processo de resolução, eles são capazes de fagocitar outros

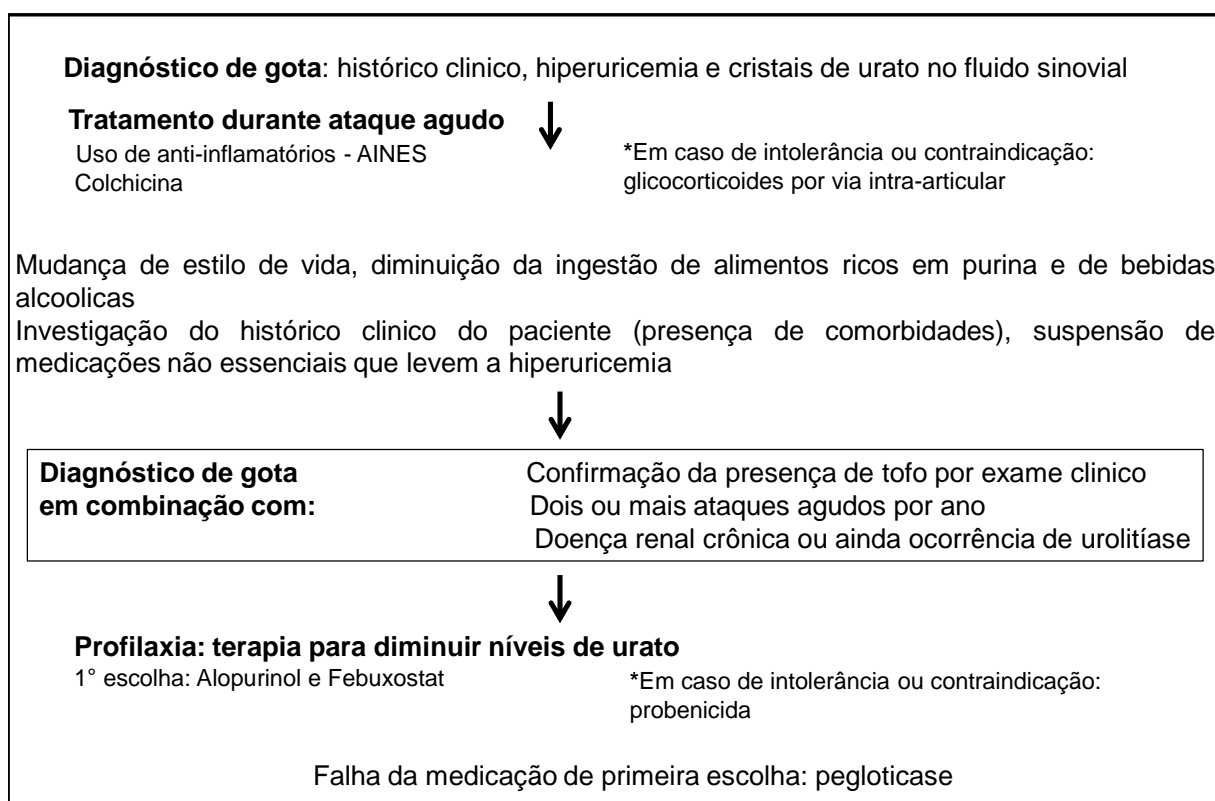
neutrófilos que estejam em apoptose, uma espécie de canibalismo, ou ainda sofrer fagocitose por parte de macrófagos, o que levaria ao aumento de TGF $\beta$ , diminuindo a produção de IL-1 $\beta$  assim como a expressão do receptor IL-1 (MARTIN e HARPER, 2010; SCANU et al., 2012; MITROULIS et al., 2013; STEIGER e HARPER 2013). Porém, na ausência de tratamento, os ataques agudos vão se tornar mais repetitivos, o intervalo entre os ataques cada vez menor, e o indivíduo estará mais suscetível ao desenvolvimento da gota tofacea crônica, ou tofo.

Microscopicamente os tofos são grânulos de macrófagos e cristais de MSU envoltos por um denso tecido conjuntivo, podendo ser subcutâneos ou periarticulares (DALBETH e HASKARD, 2005). O desenvolvimento dos tofos é associado a duração e a severidade da hiperuricemia. Não há tratamento para a gota tofacea crônica e a única ferramenta é a remoção cirúrgica do tofo.

#### **1.4 Tratamento**

Em 2012, no encontro anual do Colégio Americano em Reumatologia, foram definidas algumas diretrizes para o controle da gota, incluindo medidas farmacológicas e não farmacológicas para o tratamento de pacientes com a doença (KHANA et al., 2012). As medidas incluem uma mudança no estilo de vida dos pacientes, uso de medicações para a diminuição da hiperuricemia e combate ao ataque agudo com uso de medicações para diminuição da dor e da inflamação. Segue abaixo um quadro demonstrando a sequência de medidas profiláticas e farmacológicas a serem tomadas após o diagnóstico de gota.

Quadro 1 – Terapia empregada para o tratamento da gota. Baseada em Khana et al (2012), *Arthritis Care and Research* 64: 1431-1446 e Cronstein (2013), *J Clin Rheumatol*, 19: 19-29.



O tratamento consiste inicialmente no uso de fármaco(s) para aliviar a dor e abreviar a inflamação durante a crise aguda. Entretanto, o uso de anti-inflamatórios não esteroidais deve ser feito com cautela, pois podem provocar lesões gastroduodenais e são contraindicados em pacientes com: insuficiência renal e hepática, úlcera péptica, gastrite e hipertensão; condições presentes em uma ampla porcentagem dos pacientes com gota (SCHLESINGER, 2012). A colchicina deve ser utilizada em doses mínimas devido a pequena janela entre a dose terapêutica e a dose que leva aos efeitos adversos e toxicidade. Seu longo tempo de meia vida (de 20 a 30h) favorece a contra-indicação em pacientes com insuficiência renal e hepática onde a droga teria maiores chances de acumulação e toxicidade (SCHLESINGER, 2012).

Em pacientes gotosos com baixa resposta ou intolerância aos AINEs ou à colchicina é indicado o uso de anti-inflamatórios esteroidais (TERKELTAUB, 2010). Estes podem ser administrados de forma sistêmica, no entanto, por um período curto e em doses controladas, uma vez que a hiperglicemia é um de seus efeitos

adversos. Nestes casos, há a alternativa da corticoterapia intra-articular, o que evita os efeitos adversos de uma administração sistêmica e aponta esta via como interessante para o tratamento da gota ou de outras artrites.

Posterior ou concomitantemente, se utilizam drogas como os inibidores da xantina oxidase, enzima chave na síntese de ácido úrico. Não há um consenso quanto aos níveis apropriados, geralmente o objetivo é alcançar concentrações  $\leq 6$  mg/dl (sub-saturantes) (SHOJI et al., 2004). O alopurinol, inibidor competitivo da xantina oxidase, apresenta diversas limitações, a dose utilizada na clínica é frequentemente insuficiente para se alcançar os níveis de urato de 6,8 mg/dl e cerca de 10% dos pacientes apresentam reações alérgicas de hipersensibilidade da pele que vão de leves a severa (CRITTENDEN e PILLINGER, 2013). Esta reação alérgica atinge normalmente pacientes gotosos com insuficiência renal, o que é de grande importância uma vez que 60 % dos gotosos possuem algum tipo de comprometimento renal (CRITTENDEN e PILLINGER, 2013). O Febuxostat é um inibidor não competitivo da xantina oxidase e seu uso não leva a reações de hipersensibilidade (TERKELTAUB, 2010; CHOCHAN, 2011). Por outro lado, o Febuxostat é de alto custo financeiro, apresenta limitações quanto a dosagens disponíveis e remete ao mesmo problema que o Alopurinol, de ser ineficaz para se alcançar níveis de urato de 6,8 mg/dl (CRITTENDEN e PILLINGER, 2013). A primeira opção após os inibidores da xantina oxidase é o agente uricosúrico probenicida. O medicamento requer uso de múltiplas dosagens diárias e consumo concomitante de grandes quantidades de água para reduzir o risco de cálculo renal.

A pegloticase (uma forma recombinante da enzima uricase) é utilizada apenas em casos de refratoriedade aos outros fármacos que diminuem os níveis de urato pois a droga é de uso endovenoso, cerca de 26 % dos pacientes apresentam reações relacionadas a infusão da medicação e em uma porção da população a pegloticase induz imunogenicidade sendo neutralizada por anticorpos gerados contra o fármaco (CRITTENDEN e PILLINGER, 2013). Outro tratamento inovador é o uso de “agentes anticitocinas”, os quais se mostram uma alternativa promissora para o tratamento da gota, conforme citado anteriormente.

Contudo, para um número crescente de pacientes com gota as terapias existentes são ineficazes ou contraindicadas devido, principalmente, a concomitante presença de comorbidades que apresentam e o uso de medicações que interferem diretamente nos níveis de urato. Por exemplo, a análise dos registros médicos de

575 pacientes diagnosticados com gota nos Estados Unidos, apontaram que mais de 88 % apresentavam pelo menos uma condição patológica das que são consideradas comorbidades comuns a gota como doenças cardiovasculares, diabetes tipo 2, hiperlipidemia, síndrome metabólica, doenças crônicas nos rins e nefrolitíase (KEENAN et al., 2011). No mesmo estudo foi identificado que mais de 90% dos pacientes possuíam pelo menos uma contra-indicação ao uso de antiinflamatórios não-esteroidais, e aproximadamente 50% uma contra-indicação ao uso de colchicina, ressaltando que estas são as duas terapias de primeira escolha no controle do ataque agudo de gota.

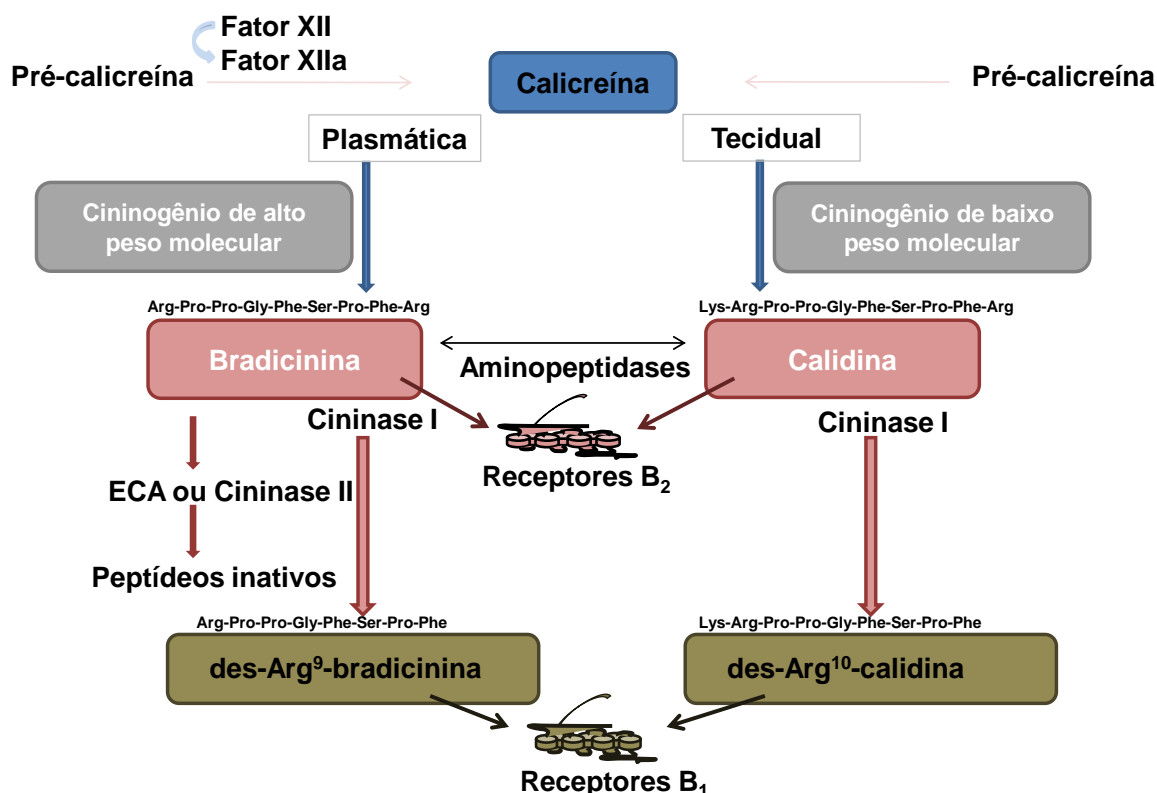
Outro estudo (Choi et al., 2012) demonstrou que alguns dos fármacos utilizados por milhões de pacientes em todo o mundo para tratar de doenças como a hipertensão, aumentam o risco de se desenvolver um ataque agudo de gota. Este estudo realizou a análise multivariada de dados médicos obtidos entre os anos de 2000-2007, de indivíduos de 20-89 anos de idade e que não apresentavam episódios de gota antes do início do estudo. Estes dados foram cruzados quanto ao uso de diferentes drogas anti-hipertensivas, o desenvolvimento de ataques agudos de gota e a presença concomitante de outras doenças, demonstrando ainda haver uma relação entre a gota e as doenças a ela associadas. Entre estes fármacos se encontravam os inibidores da enzima conversora de angiotensina (iECA), ou cininase II. A ECA é responsável pela regulação do metabolismo de diferentes peptídeos, em especial pela conversão da angiotensina I em angiotensina II e pela hidrólise da bradicinina. Atualmente, se sabe que os efeitos cardioprotetores dos iECA vão além da regulação dos efeitos vasoconstritores da angiotensina II, envolvendo ainda a potencialização da sinalização via receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> para cininas (ERDOS et al., 2010). Somado a isto, Damas (1984) observou que após submetidos a injeção intra-plantar de MSU, ratos da linhagem Brown Norway, roedores com um sistema cininas-caliceínas deficiente, desenvolveram apenas 70% do edema observado em ratos Wistar, que apresentam sistema cininas-caliceínas completo. Além disso, a co-administração de MSU e o inibidor da ECA, captopril, potencializou o edema induzido pelo MSU em ratos Wistar, mas não em ratos Brown Norway, indicando uma possível relação do sistema cininas-caliceínas nos efeitos inflamatórios iniciados pelo MSU, incluindo aqueles potencializados pelo tratamento com iECA.

### **1.5 Sistema cininas-caliceínas**

O sistema cininas-caliceínas inclui os precursores das cininas, conhecidos como cininogênios, as próprias cininas (peptídeos relacionados a bradicinina) e seus receptores alvo. Inclui ainda as enzimas teciduais e plasmáticas envolvidas na síntese (caliceínas) e as enzimas envolvidas na degradação das cininas (Figura 1).

Os cininogênios são glicoproteínas de baixo (66 KDa) ou alto peso molecular (120 KDa) que constituem o substrato para a formação de cininas. Eles apresentam em sua estrutura uma porção N-terminal (cadeia pesada, com 362 aminoácidos), e outra C-terminal (cadeia leve, que possui 38 aminoácidos no cininogênio de baixo peso molecular ou 255 aminoácidos no cininogênio de alto peso molecular), e uma porção cininas intercalando estes polipeptídeos terminais (LEEB-LUNDERBERG et al., 2005; KASHUBA et al., 2013).

Estruturalmente, eles apresentam seis domínios, incluindo a sequência de aminoácidos da bradicinina, que lhes confere propriedades distintas e específicas como inibição de cisteíno proteases ou sítios de ligação a macromoléculas (CASSIM et al., 2002; MOREAU et al., 2005; KASHUBA et al., 2013). Quando utilizados como substrato, servem a um grupo de enzimas proteases, ou cininogenases, dentre as quais as caliceínas tissular e plasmática são as mais potentes. As caliceínas diferem em relação ao seu peso molecular, especificidade para substratos, tipo de cinina liberada, gene codificador e sequência de aminoácidos (MURRAY et al., 1990; BEAUBIEN et al., 1991; KLAPHAN et al., 2002; CASSIM et al., 2002; MARCEAU E REGOLI 2004; CASSIM et al., 2009).



**Figura 1 – Sistema cininas-caliceínas** - As cininas são peptídeos ativos formados pela clivagem proteolítica de proteínas inativas circulantes (Fator de Hageman ou fator XII), a pré-caliceína e os cininogênios, que são ativadas como resposta do organismo frente a diferentes estímulos tais como o contato com superfícies de carga negativa, que é o caso do MSU. O grupo mais importante de cininogenases é representado pelas caliceínas plasmática ou tecidual. A caliceína plasmática é responsável pela formação da bradicinina e a caliceína tecidual, pela calidina. A bradicinina pode ser transformada em peptídeos inativos pelas enzimas cininase II (enzima conversora de angiotensina-ECA). Ainda, a bradicinina e a calidina podem ser convertidas em seus metabólitos des-Arg<sup>9</sup>-bradicinina e des-Arg<sup>10</sup>-calidina por ação das enzimas cininase I. A bradicinina e a calidina irão exercer seus efeitos pela ativação dos receptores B<sub>2</sub> para cininas, ao passo que seus metabólitos des-Arg, pela ativação do receptor B<sub>1</sub> para cininas.

A caliceína plasmática é uma serina protease codificada por um único gene e secretada predominantemente pelo fígado na forma inativa de pré-caliceína plasmática. Além do fígado, outros locais capazes de secretar a enzima incluem células endoteliais, leucócitos e fibroblastos (CASSIM et al., 2002). Uma vez liberada



na corrente sanguínea, ela circula ligada ao cininogênio de alto peso molecular (cerca de 80%) ou como uma proteína livre (25%) (MANDLE et al., 1976; CASSIM et al., 2002; KAPLAN et al., 2002). A pré-caliceína plasmática é rapidamente convertida em caliceína em um processo que pode envolver a ativação do Fator XII (Fator de Hagemann) em Fator XIIa (SCHMAIER, 2008; KASHUBA et al., 2013). O Fator XII, juntamente com a pré-caliceína, o cininogênio e o Fator XI formam o “sistema de contato”, também conhecido como sistema formador de cininas. A ativação do sistema de contato, além da formação de cininas, tem como resultado a ativação da via intrínseca da cascata da coagulação e da cascata fibrinolítica (MOREAU et al., 2005; KASHUBA et al., 2013). O Fator XII pode ser autoativado pelo contato com superfícies de carga negativa (aniônicas), que incluem silicatos, heparina, cristais de urato monossódico, entre outros (KAPLAN e SILVERBERG, 1987; CASSIM et al., 2002; CASSIM et al., 2009). A caliceína, por sua vez, cliva o cininogênio de alto peso molecular pela hidrólise dos resíduos arginina<sup>389</sup>-serina<sup>390</sup>, e lisina<sup>380</sup>-arginina<sup>381</sup>, o que resulta na formação do nonapeptídeo bradicinina (Arg<sup>1</sup> – Pro<sup>2</sup> – Pro<sup>3</sup> – Gly<sup>4</sup> – Phe<sup>5</sup> – Ser<sup>6</sup> – Pro<sup>7</sup> – Phe<sup>8</sup> – Arg<sup>9</sup>) (MORI et al., 1981; MOREAU et al., 2005).

As caliceínas tissulares são serinas proteases codificadas por uma família de genes e secretadas por diversos órgãos e células como pâncreas, rim, baço, neutrófilos, pituitária, placenta, glândulas sudoríparas e sebáceas e cérebro (YOUSEF et al., 2003). Similar a caliceína plasmática, a tissular é secretada na forma inativa de pré-caliceína e é capaz de clivar o cininogênio de baixo peso molecular pela hidrólise dos resíduos amino-terminais metil<sup>379</sup>-lisina<sup>380</sup> e carboxi-terminais arginina<sup>389</sup>-serina<sup>390</sup>, resultando na formação do decapeptídeo calidina (Lys<sup>1</sup>- bradicinina). Apesar do cininogênio de baixo peso molecular ser o substrato preferencial da caliceína tissular, ela pode ainda utilizar o cininogênio de alto peso molecular para a formação de calidina. Por outro lado, em roedores, tanto a caliceína plasmática como a tissular formam preferencialmente bradicinina (CAMPBELL, 2003). A calidina pode ser facilmente convertida em bradicinina pela clivagem do resíduo lisina de sua porção amino-terminal por ação de aminopeptidases plasmáticas (GUIMARÃES et al., 1973). A bradicinina, juntamente com a Lys-bradicinina e os dois metabólitos des-Arg, constituem as quatro cininas biologicamente ativas (MARCEAU E REGOLI, 2004). Parte da produção de cininas é controlada por inibidores endógenos de caliceínas, como por exemplo, a  $\alpha_1$ -

antitripsina no caso da calicreína tissular, e  $\alpha_2$ -macroglobulina e inibidor esterase C1 para calicreína plasmática (CASSIM et al., 2009). Logo depois de formadas, a bradicinina e a calidina se difundem através da parede de capilares ou de vasos linfáticos dos tecidos e são rapidamente inativadas (tempo de meia vida de 10-50 segundos) por enzimas zinco metalopeptidases (MOREAU et al., 2005). Estas enzimas compreendem as cininases I e II, a aminopeptidase C e a endopeptidase neutra.

As enzimas cininases I são representadas pela carboxipeptidase N (CPN) e carboxipeptidase M (CPM) (CASSIM et al., 2002). A CPN age preferencialmente em peptídeos contendo lisina na porção C-terminal ao passo que a CPM age preferencialmente em peptídeos contendo resíduos de arginina. A CPM age na conversão de bradicinina a des-Arg<sup>9</sup>-bradicinina, e pode também funcionar como um regulador alostérico do receptor B<sub>1</sub>, aumentando sua afinidade pela des-Arg<sup>9</sup>-bradicinina (ZHANG et al., 2013a, 2013b). Adicionalmente, a CPM pode facilitar a ativação do receptor B<sub>1</sub> pelo agonista B<sub>2</sub>, bradicinina. Porém esta regulação requer a expressão da CPM próxima ao receptor B<sub>1</sub>, para permitir a formação de um complexo CPM-B<sub>1</sub>, necessário para este processo, descrito mais detalhadamente a seguir (ZHANG et al., 2011; 2013b). A enzima CPM pode ser encontrada ancorada na membrana ou em sua forma solúvel, amplamente distribuída pelo fígado, rins, vasos sanguíneos, intestino, cérebro e nervos periféricos (ZHANG et al., 2013b).

As enzimas cininase II são representadas pela enzima conversora de angiotensina (ECA), e pela endopeptidase neutra. A ECA é primeiramente sintetizada como uma proteína ligada a membrana que é posteriormente liberada na circulação (COSTEROUSSE et al., 1992). A ECA é responsável por clivar sequencialmente o dipeptídeo Phe<sup>8</sup>-Arg<sup>9</sup> e Phe<sup>5</sup>-Ser<sup>6</sup> da porção C-terminal da bradicinina, transformando-a em um metabólito inativo. Apesar da baixa afinidade desta enzima por metabólitos des-Arg-, em alguns casos a ECA pode ainda clivar a extremidade C-terminal da des-Arg<sup>9</sup>-bradicinina (DEDDISH et al., 1997). Por outro lado, inibidores da ECA causam um aumento nos níveis de cininas, que são substrato para as enzimas cininase I, podendo desta maneira, resultar na geração de agonistas do receptor B<sub>1</sub>. Ainda, os inibidores da ECA podem agir como agonistas alostéricos do receptor B<sub>1</sub> e formar um complexo com o receptor B<sub>2</sub>, potencializando a sinalização dos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> para cininas (ERDOS et al., 2010). Outra função da ECA é atuar na conversão do hormônio angiotensina I no

potente vasopressor angotensina II. Já a endopeptidase neutra (neprilisina ou encefalinase) é uma metaloprotease capaz de clivar o dipeptídeo C-terminal da bradicinina, agindo ainda em outros peptídeos (KASHUBA et al., 2013).

A maioria das ações das cininas é mediada pela interação com receptores de membrana. Estes receptores foram inicialmente definidos pela utilização de critérios farmacológicos, pelo uso de agonistas e antagonistas dos receptores. Primeiramente demonstrou-se que os metabólitos des-Arg<sup>9</sup>-bradicinina e des-Arg<sup>10</sup>-calidina apresentavam atividade farmacológica em preparações de tecido isolado de coelhos, e o receptor responsável por mediar estas ações foi então denominado receptor B<sub>1</sub> para cininas (REGOLI et al., 1977). Subsequentemente, um segundo receptor foi identificado e denominado receptor B<sub>2</sub> para cininas, ao qual a bradicinina e calidina possuem alta afinidade (REGOLI e BARABE, 1980). A característica estrutural determinante para a ligação aos receptores B<sub>1</sub> em mamíferos foi identificada como sendo a remoção da arginina C-terminal, que quando presente determina a ligação aos receptores B<sub>2</sub> (PESQUERO e BADER, 1998). Recentemente, porém, demonstrou-se que a substituição dos resíduos Arg C-terminal por um grupamento lisina levam a formação de moléculas com atividades de agonista em ambos os receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> para cininas (ZHANG et al., 2012).

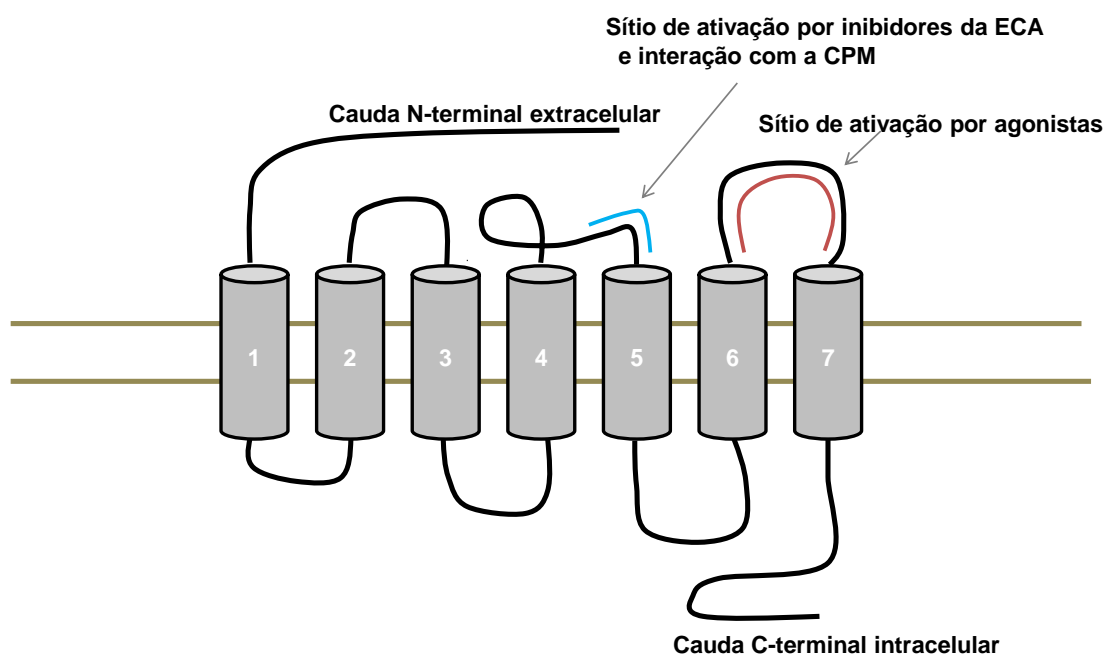
A definição molecular dos receptores iniciou-se com a clonagem do receptor B<sub>2</sub> de ratos (MCEACHERN et al., 1991). Mais tarde, em 1994, ocorreu a clonagem do receptor B<sub>1</sub> a partir de fibroblastos de pulmão de embriões humanos (MCEACHERN et al., 1991; MENKE et al., 1994). Apesar da proximidade nos genes e de estes receptores apresentarem número semelhante de aminoácidos (o receptor B<sub>2</sub> humano possui 359 aminoácidos e o receptor B<sub>1</sub> 353), eles apresentam apenas 36% de homologia (MENKE et al., 1994). Este dado sugere que estes receptores possuem mecanismos distintos para a regulação da atividade e produção de sinais intracelulares.

A clonagem do receptor B<sub>1</sub> em humanos (Figura 2), semelhante ao ocorrido após clonagem do receptor B<sub>2</sub>, facilitou a clonagem deste receptor em outras espécies como coelhos, camundongos, ratos, cães, macacos e bovinos (MACNEIL et al., 1995; PESQUERO et al., 1996; NI et al., 1998; HESS et al., 2002; MORISSETE e MARCEAU, 2006). Os genes dos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> em humanos, camundongos e ratos, estão localizados no mesmo locus do cromossomo 14, 12 e 6, e todos com menos de 20 kilobases de distância um do outro (HESS et al., 2002;

MOREAU et al., 2005). Além disso, um receptor para cininas foi identificado em peixes (zebrafish) e aves (galinha) e parece ser homólogo ao receptor B<sub>2</sub> de mamíferos, que por sua vez, seria o receptor ancestral do B<sub>1</sub> (SCHROEDER et al., 1997; DUNÉR et al., 2002; MOREAU et al., 2005).

Os receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> para cininas são membros da superfamília de receptores acoplados a proteína G, geralmente G $\alpha_{q/11}$ , que apresentam sete domínios transmembrana, uma porção N-terminal extracelular e outra C-terminal intracelular (Figura 2). A ativação destes receptores desencadeia a estimulação de diferentes sistemas de segundo mensageiros, conforme o tipo celular e proteína G envolvida (MOREAU et al., 2005). Na maioria das vezes sua ativação envolve a via de ativação da fosfolipase C (PLC), com consequente formação de trifosfato de inositol (IP3) e diacilglicerol (DAG) (GUTOWSKI et al., 1991; MARCEAU e REGOLI, 2004; LEEB-LUNDBERG et al., 2005). O aumento dos níveis de IP3 resulta em aumento dos níveis de cálcio liberado do retículo endoplasmático, enquanto que a formação de DAG promove ativação de isoformas específicas da proteína quinase C (PKC). Os eventos celulares estimulados pelos receptores de cininas podem ainda envolver a ativação de canais de potássio sensíveis ao cálcio, ativação da adenilato ciclase, da fosfolipase A2, das óxido nítrico sintases e de várias proteínas quinases (BHOOLA et al., 1992; BLAUKAT, 2003; FERREIRA et al., 2008).

Esta via de segundos mensageiros pode ainda levar a um processo de sensibilização periférica por modificar a atividade de outros receptores, como acontece com o receptor TRPA1 e TRPV1. A ativação dos receptores para cininas durante o processo inflamatório ou dano tecidual e a consequente ativação de PLC pode resultar na produção de IP3, causando a liberação de Ca<sup>++</sup> intracelular provocando a sensibilização do TRPV1, que por sua vez induz a um influxo de Ca<sup>++</sup> capaz ainda de sensibilizar o canal TRPA1. Adicionalmente, a produção de DAG atua na ativação de PKC, que juntamente com a PKA, são capazes de fosforilar o TRPA1 levando ao aumento de sua atividade, ou sensibilização.



**Figura 2 – Receptor B1 para cininas** – o receptor B<sub>1</sub> para cininas apresenta sete domínios transmembrana, uma cauda N-terminal extracelular e outra C-terminal intracelular. A alça extracelular 2 contém o domínio para a ligação de inibidores da ECA (enzima conversora de angiotensina) e para interação com a CPM (enzima carboxipeptidase M), e a alça extracelular 3 apresenta o domínio para a ativação do receptor por agonistas.

Os receptores para cininas diferem amplamente quanto aos mecanismos que regulam sua expressão. Os receptores B<sub>2</sub> são constitutivamente expressos e já foram identificados nos sistemas gastrointestinal, cardiovascular, respiratório, genitourinário, bem como no sistema nervoso central e periférico (MOREAU et al., 2005). Este receptor é relativamente estável quando expresso na membrana na ausência de agonista (ENQUIST et al., 2007). Após ativação agonista-dependente, o receptor B<sub>2</sub> exibe uma resposta transitória, típica de outros receptores acoplados a proteína G. Se a estimulação persiste, esta resposta é seguida de um processo de dessensibilização mediada por fosforilação da alça C-terminal, endocitose dependente de  $\beta$ -arrestina e formação de vesículas intracelulares (BLAUKAT, 2003;

MOREAU, 2005; ENQUIST et al., 2007; 2014). A ativação de endocitose pelo agonista é um fenômeno reversível, sendo que o receptor é reciclado de volta a membrana quando o agonista é retirado (MARCEAU et al., 2002; ENQUIST et al., 2007).

Já o receptor B<sub>1</sub> para cininas pode estar constitutivamente expresso ou ainda, sua expressão ser rapidamente induzida, o que ocorre geralmente em resposta a um processo inflamatório ou injúria tecidual. Sua expressão já foi demonstrada em neurônios sensoriais de gânglios trigeminais, células satélites do gânglio da raiz dorsal e nas lamínas superficiais da medula espinhal (MA et al., 2000; WOTHERSPOON e WINTER, 2000; MA e HEAVENS, 2001; FOX et al., 2003; RASHID et al., 2004; MA 2001; SHUGHRUE et al., 2003). Em ratos, demonstrou-se que esta expressão se dá predominantemente em neurônios de pequeno e médio diâmetro e de fibras C peptidérgicas e não peptidérgicas (MA et al., 2000, 2001). Ainda, a expressão do receptor foi confirmada em terminações nervosas periféricas, como as que inervam a bexiga (WOTHERSPOON e WINTER, 2000) e pele humana, assim como em gânglios de fibras do sistema nervoso simpático (SEABROOK et al., 1997; SCHREMMER-DANNINGER et al., 2004). Adicionalmente, há expressão do receptor B<sub>1</sub> em células não-neuronais como em diferentes células do sistema imune (macrófagos, fibroblastos e neutrófilos) e em células endoteliais (SCHAEFFER et al., 2001; EHRENFELD et al., 2006).

Quando expresso, o receptor B<sub>1</sub> não é estável na membrana e sofre endocitose espontânea com posterior degradação lisossomal (ENQUIST et al., 2007). Os mecanismos envolvidos nesta internalização ainda não foram bem elucidados, mas o receptor parece não sofrer fosforilação ou dessensibilização significativa (ENQUIST et al., 2007, 2013). Por outro lado, a presença do agonista leva a ativação do receptor e estabilização temporária do mesmo na membrana, retardando sua endocitose (ENQUIST et al., 2007). Estes processos parecem contribuir para a ativação sustentada que o receptor B<sub>1</sub> apresenta, e apontam a cauda C-terminal do receptor como determinante para estes efeitos.

Ele encontra-se no retículo endoplasmático, onde ocorre a formação de homo-oligômeros, que parece ser necessária para a translocação e expressão de um receptor funcional na membrana. A não formação do complexo resultaria na degradação do receptor (SANDÉM e LEEB-LUNDBERG, 2013). Porém, trabalhos anteriores sugerem a formação de um complexo hetero-oligômero entre os

receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> (KANG et al., 2004). Na formação deste complexo, o receptor B<sub>2</sub> parece desempenhar o papel de estabilizador do receptor B<sub>1</sub> na membrana, e sofre degradação, ao passo que a sinalização via B<sub>1</sub> se mantém (KANG et al., 2004; ENQUIST et al., 2013).

Outro mecanismo de regulação do receptor B<sub>1</sub> é pela interação com a enzima carboxipeptidase M (CPM), como demonstrado por ZHANG e colaboradores (2011) pela utilização de células HEK 293 (células embrionárias humanas). Assim, além da conhecida atividade da enzima de gerar os agonistas des-Arg<sup>9</sup>-bradicinina e des-Arg<sup>10</sup>-calidina, ela regularia a sinalização do receptor B<sub>1</sub> via bradicinina e calidina, sem a necessidade de clivagem. O grupo sugere que a bradicinina é capaz de se ligar a CPM, que sofre uma alteração conformacional e interage com o receptor B<sub>1</sub> levando a alterações conformacionais também no receptor causando sua ativação. Demonstraram ainda que a ruptura do complexo receptor B<sub>1</sub>-CPM reduz a sinalização via receptor B<sub>1</sub> gerada pela bradicinina, e que em células endoteliais pulmonares bovinas, o inibidor da CPM, Mergepta, foi capaz de bloquear o influxo de Ca<sup>++</sup> induzido por bradicinina (ZHANG et al., 2011, 2013a, 2013b). Esta interação exigiria a co-expressão do receptor e da enzima, e interessante, citocinas capazes de causar aumento na expressão do receptor B<sub>1</sub>, também induzem o aumento da expressão da enzima CPM.

Fisiologicamente, as cininas estão envolvidas na regulação do tônus de vários tipos de musculatura lisa, regulação da pressão arterial, transporte de glicose e de eletrólitos, estimulação da reabsorção óssea e proliferação celular (BHOOLA, 1992; BASCANDS et al., 2003). Além destas importantes ações fisiológicas, as cininas participam de vários processos patológicos, como câncer, asma, hipertensão, choque séptico, pancreatite e artrite (BHOOLA et al., 1992; CASSIM et al., 2002; BASCANDS et al., 2003). De fato, diferentes componentes do sistema cininas-caliceínas já foram identificados em leucócitos circulantes e amostras de líquido sinovial obtidas de pacientes com doenças inflamatórias articulares.

### **1.6 Participação do sistema cinina-caliceína nos processos de artrite**

Há na literatura trabalhos demonstrando a ativação do Fator de Hageman induzida por MSU *in vitro* e em modelo animal, em fluido sinovial e plasma humano de pacientes com gota (KELLERMEYER 1965; 1967; GINSBERG et al., 1980). Adicionalmente, há estudos mostrando que o uso de antagonistas do receptor B<sub>2</sub>

reduz a inflamação causada pelo MSU em modelo animal de gota e que há aumento nos níveis de bradicinina no fluido sinovial de pacientes com gota (WEBSTER et al., 1972; DAMAS et al., 1992;). Interessantemente, Chercuitte (1987), demonstrou o aumento da atividade da enzima cininase I em fluido sinovial de pacientes com artrite, incluindo um paciente durante o ataque agudo de gota. Considerando que a bradicinina possa ser utilizada como substrato para a formação de des-Arg<sup>9</sup>-bradicinina pela cininase I, estes dados corroboram com a possibilidade do envolvimento do receptor B<sub>1</sub> para cininas na gota.

Da mesma forma, foi relatado o envolvimento de receptores B<sub>1</sub> no extravasamento plasmático em modelo de artrite induzido por adjuvante completo de Freund (CRUWYS et al., 1994). Este mesmo estudo demonstrou ainda, que a administração de des-Arg<sup>9</sup>-bradicinina em joelho de animais naive resultou em extravasamento plasmático, e apesar de menos intenso que o induzido pela bradicinina, foi significativo em relação a animais não injetados. Além disso, o tratamento intra-articular com antagonistas do receptor B<sub>1</sub> foi capaz de prevenir a nocicepção e a degradação da cartilagem em um modelo pré-clínico de osteoartrite (KAUFMAN et al., 2011).

Outros estudos que sustentam um possível envolvimento dos receptores B<sub>1</sub> na gota são aqueles que demonstram a presença de calicreínas, cininogênios e receptores B<sub>1</sub> para cininas em neutrófilos circulantes e no fluido sinovial de indivíduos com artrite (MELLMON et al., 1967; WILLIAMS et al., 1997; CASSIM et al., 2009). O receptor B<sub>1</sub> está envolvido em diferentes modelos inflamatórios associados ao desenvolvimento de nocicepção e animais com deleção gênica do receptor são refratários ao acúmulo de neutrófilos nos tecidos (MARCEAU et al., 1998; PESQUERO et al., 2000). Além disso, estes receptores são fundamentais na regulação da infiltração leucocitária dependente de IL-1 $\beta$  (AHLUWALIA e PERRETI, 1996; MCLEAN et al., 2000; DUCHENE et al., 2007). Ainda, a expressão do receptor B<sub>1</sub> em células endoteliais e neutrófilos parece favorecer sua importância na regulação das interações entre leucócitos e endotélio, regulando processos como adesão, rolamento e infiltração, através da modulação de diferentes moléculas de adesão (FIGUEROA et al., 2014). Todos estes aspectos são de grande importância uma vez que a gota é uma doença inflamatória dolorosa com a característica de induzir um grande infiltrado leucocitário como um dos acontecimentos primários do



processo inflamatório gerado pelo MSU, que tem ainda a IL-1 $\beta$  como citocina chave destes acontecimentos.

O receptor B<sub>1</sub> para cininas pode ser expresso ainda por outras células do sistema imune como fibroblastos, monócitos e macrófagos, o que também o coloca no cenário da gota podendo ele estar expresso nestas células nas articulações. É importante observar que os sinoviócitos (tanto os do tipo A ou macrófagos, quanto os do tipo B ou fibroblastos) são células residentes, e a ativação do receptor B<sub>1</sub> expresso nestas células poderia facilitar o envolvimento do receptor nos estágios iniciais do ataque de gota (IWANAGA et al., 2000).

Já no que diz respeito a dor, um dos sintomas mais extenuantes que atingem os indivíduos durante o ataque de gota, há a expressão de receptores B<sub>1</sub> no gânglio da raiz dorsal e terminações nervosas de neurônios sensoriais, preferencialmente em fibras nociceptivas, o que facilitaria seu envolvimento direto na modulação e transmissão de processos dolorosos (MA et al., 2000; 2001). Todavia, a expressão deste receptor em outras células não o exclui como possível regulador indireto da nocicepção durante o ataque de gota. Ainda, é importante observar que animais com a deleção gênica do receptor B<sub>1</sub> para cininas são refratários a indução de nocicepção química e térmica (PESQUERO et al., 2000).

Assim, fica evidente que o receptor B<sub>1</sub> para cininas pode fazer parte do microambiente sinovial, podendo ser expresso em diferentes células neuronais e não-neuronais, e podendo atuar nos principais processos que ocorrem durante o ataque agudo de gota. Ainda, é bem conhecido o papel dos receptores B<sub>1</sub> na iniciação e manutenção de diferentes processos inflamatórios e há diferentes estudos demonstrando o envolvimento do sistema cininas-caliceínas na gota, incluindo os ataques agudos da doença precipitados pelo tratamento com inibidores da ECA, conforme observado no item 1.4. Uma vez que os receptores B<sub>1</sub> também participam dos efeitos cardioprotetores dos iECA, torna-se plausível sua participação também nos efeitos potencializadores destes medicamentos em relação a deflagração do ataque agudo de gota.

Desta maneira, a investigação sobre o envolvimento dos receptores B<sub>1</sub> no processo inflamatório doloroso que caracteriza o ataque agudo de gota é importante pois pode esclarecer o papel do receptor na doença, facilitar o entendimento da relação entre o uso de iECA com o risco aumentado de se desenvolver gota e

apontar um novo alvo terapêutico para esta condição ainda sem um tratamento eficaz e seguro.

---

## **2. OBJETIVOS**

## **2. Objetivos**

### **2.1 Objetivo Geral**

Verificar o papel dos receptores B<sub>1</sub> para cininas e o efeito da inibição da enzima conversora de angiotensina sobre o ataque agudo de gota induzido por MSU em roedores.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- 2.2.1 Analisar o papel do receptor B<sub>1</sub> para cininas sobre a resposta nociceptiva e inflamatória induzida pela injeção intra-articular de cristais de urato monossódico (MSU);
- 2.2.2 Verificar a expressão dos receptores B<sub>1</sub> para cininas frente a injeção de MSU na articulação
- 2.2.3 Avaliar a resposta nociceptiva e edematogênica induzida pela injeção intra-articular de uma baixa dose de MSU em animais previamente tratados com inibidores da enzima conversora de angiotensina;
- 2.2.4 Verificar se há o envolvimento do receptor B<sub>1</sub> para cininas nas respostas nociceptiva e edematogênica induzidas pela injeção intra-articular de uma baixa dose de MSU em animais previamente tratados com o inibidor da enzima conversora de angiotensina

---

### **3. MANUSCRITO CIENTÍFICO**

### 3.1 MANUSCRITO CIENTÍFICO

Os resultados inseridos nesta tese apresentam-se sob a forma de manuscrito científico. Os itens Introdução, Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se no manuscrito. O manuscrito está disposto na mesma forma a qual foi submetido à revista científica *Annals of the Rheumatic Diseases*. O artigo, requisito necessário para a obtenção do título de doutor, está disposto na mesma forma a qual foi publicado na revista científica *Journal of Ethnopharmacology* e é apresentado no item APÊNDICE.

#### 3.1.1 Manuscrito: The role of kinin B<sub>1</sub> receptor and the effect of angiotensin I-converting enzyme inhibition on acute gout attacks in rodents

Cássia R. Silva<sup>1</sup>, Sara M. Oliveira<sup>1</sup>, Carin Hoffmeister<sup>2</sup>, Vinícius Funck<sup>2</sup>, Gustavo P. Guerra<sup>4</sup>, Gabriela Trevisan<sup>1</sup>, Raquel Tonello<sup>1</sup>, Mateus F. Rossato<sup>1</sup>, João B. Pesquero<sup>5</sup>, Michael Bader<sup>6</sup>, Mauro S. Oliveira<sup>2</sup>, Jason J. McDougall<sup>7</sup>, Juliano Ferreira<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Graduate Program in Biological Sciences: Toxicological Biochemistry, <sup>2</sup>Graduate Program in Pharmacology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

<sup>3</sup>Department of Pharmacology, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil.

<sup>4</sup>Center for Food Sciences, Federal Technologic University of Paraná, Medianeira, PR, Brazil.

<sup>5</sup>Department of Biophysics, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

<sup>6</sup>Max-Delbrück-Center for Molecular Medicine (MDC) and Charité, University Medicine, Berlin, Germany.

<sup>7</sup>Departments of Pharmacology and Anesthesia, Pain Management & Perioperative Medicine, Dalhousie University, Halifax, NS, Canada.

Corresponding author: \*Juliano Ferreira, Departamento de Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima, Centro de Ciências Biológicas, Bairro Trindade, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil, Cep: 88040-900. Phone:+55 (48) 37219491; Fax: +55 (48) 33375479.

e-mail: [ferreiraj99@gmail.com](mailto:ferreiraj99@gmail.com)

Keywords: urate crystals, arthritis, kinin-system, nociception, inflammation

Word count: 2.953

**ABSTRACT**

**Objective:** Verify the role of the kinin B<sub>1</sub> receptors (B<sub>1</sub>R) and the effect of angiotensin I-converting enzyme inhibitors (ACEi) on acute gout induced by monosodium urate (MSU) crystals in rodents.

**Methods:** Painful (overt pain and allodynia) and inflammatory parameters (joint oedema, leukocyte trafficking, interleukin-1 $\beta$  levels) of acute gout attacks were assessed several hours after an intra-articular (IA) injection of MSU (1.25 or 0.5 mg/articulation) into the ankle of rats or mice, respectively. The role of B<sub>1</sub>R was investigated using pharmacological antagonism or gene deletion. In addition, B<sub>1</sub>R immunoreactivity in ankle tissue and sensory neurons, kininase I activity and des-Arg<sup>9</sup>-bradykinin synovial levels were also measured. Similar tools were used to investigate the effects of ACEi on a low dose of MSU (0.0125 mg/articulation)-induced inflammation.

**Results:** Kinin B<sub>1</sub>R antagonism or gene deletion largely reduced all painful and inflammatory signs of gout. Furthermore, MSU increased B<sub>1</sub>R expression in articular tissues, the content of the B<sub>1</sub> agonist des-Arg<sup>9</sup>-bradykinin and the activity of the B<sub>1</sub> agonist-forming enzyme kininase I. A low dose of MSU crystals, which did not induce inflammation in control animals, caused signs of acute gout attacks in ACEi-treated animals that were B<sub>1</sub>R-dependent.

**Conclusions:** Kinin B<sub>1</sub>R contributes to acute gouty attacks, including the ones facilitated by ACEi. Therefore, B<sub>1</sub>R is a potential therapeutic target for the treatment and prophylaxis of gout, especially in patients taking ACEi.



## INTRODUCTION

Gout is induced by the deposition and crystallization of monosodium urate (MSU), and it is the most common cause of inflammatory arthritis in older adults[1]. MSU crystallization leads to the release of multiple inflammatory mediators such as kinins[2,3]. Kinins have an important function in painful and inflammatory processes by stimulating leukocyte recruitment, especially in response to IL-1 $\beta$ [4,5]. However, despite the body of evidence demonstrating a clear contribution of the kinin system to the pathogenesis of some arthritic conditions, the role of the kinin B<sub>1</sub> receptor (B<sub>1</sub>R) in MSU crystal-induced pain and inflammation is currently unknown[2,3,6,7].

One known but under investigated aspect of gout, is the fact that patients suffering from this disease frequently experience a range of comorbidities which restricts treatment options and affects long-term prognosis[1,8]. The most common comorbidity is hypertension, which affects 60-80% of gout patients[8-10]. Additionally, some studies have indicated that certain antihypertensive drugs, such as ACE inhibitors (ACEi), increase the risk of gout[10,11]. Notably, ACEi block the metabolism of several peptides, in particular bradykinin hydrolysis[12]. Bradykinin is also a substrate for kininase I, which forms des-Arg-kinin B<sub>1</sub>R agonists. Therefore, ACE inhibition can activate the B<sub>1</sub>R pathway. Moreover, ACEi are allosteric enhancers of kinin receptors[13] and B<sub>1</sub>R are linked to inflammatory cardiovascular diseases[14].

The present study focused on the rodent model of gout-like joint pain and inflammation induced by MSU injection into the ankle, which shares a number of the characteristics of acute gout attack in humans[15,16]. The aim was to investigate the possible involvement of B<sub>1</sub>R and ACEi treatment in the development of acute gouty attacks.

## **METHODS**

### **Ethical statement**

All animal handling and experimental procedures were performed in accordance with the Canadian Council for Animal Care guidelines for the care and use of experimental animals. All protocols used were also approved by the Committee on the Ethical Use of Animals of the Federal University of Santa Maria (CEUA, process number 94/2010), or the Dalhousie University Science Animal Care Committee (protocol number 12-041). The behavioral studies followed the ARRIVE guidelines[17]. Experiments were performed in a total of 230 adult male Wistar rats (250-300 g, bred in house), 8 Wild type C57BL/6 and 8 kinin B<sub>1</sub> receptor knockout mice (B1<sup>-/-</sup>) (20-30 g)[18] obtained from the Department of Biophysics (UNIFESP, São Paulo, Brazil). All animals submitted to IA injections were first deeply anaesthetized (2% isoflurane, 100% O<sub>2</sub> 1L/min). The study design, housing conditions and reagents information are provided in online supplementary material.

### **MSU crystals-induced arthritic gout**

MSU crystals (0.0125 – 1.25 mg/articulation; with a mean length of 12 ± 2 µm) suspended in 50 µl of endotoxin-free PBS were injected into the medial side of the tibio-tarsal joint (ankle articulation) of rats[15]. Control animals received an intra-articular (IA) injection of 50 µl of vehicle alone (PBS). All drugs treatments were co-administered in the MSU suspension at a final volume of 50 µl. For the mouse experiments, animals received IA injections of 20 µl of MSU crystals (0.5 mg/articulation)[16].

### **Treatments**

To study B<sub>1</sub>R involvement on gouty attacks, animals were treated with the selective B<sub>1</sub>R antagonist SSR240612 (10 nmol/articulation)[19]. To verify kininase I involvement in gout attacks, another group of gouty animals were treated with the kininase I inhibitor Mergepta (0.05 nmol/articulation)[20]. Control animals received IA injections of 50 µl of the MSU vehicle (PBS) or the SSR240612 vehicle (0.05% dimethyl sulfoxide - DMSO in PBS).

We also performed ACE inhibition using enalapril[21] (3 mg/kg, oral route - p.o.), 0.5h before IA injection of either MSU (0.0125 mg/articulation) or vehicle (saline). A separate cohort of animals was treated with the ACEi, enalapril (3 mg/kg, p.o.) and 0.5 h later received an IA co-injection of the B<sub>1</sub> receptor antagonist SSR240612 (10 nmol/articulation) or Mergepta (0.05 nmol/ articulation) plus MSU (0.0125 mg/articulation). Controls received saline p.o. and IA MSU (0.0125 mg/articulation).

### **Nociception and oedema evaluation**

Animals were assessed for nociception (touch allodynia and overt pain-like behaviors) and oedema development up to 8 h post-MSU. Measurements of touch allodynia [significant decrease in paw withdrawal threshold (PWT) compared to baseline values] were carried out using von Frey monofilaments as previously reported[22,23] and results expressed as 50% of mechanical PWT, in grams (g). Overt pain-like behaviors induced by MSU IA injection was assessed using a standing paw pressure scale from 0 - 3[24]. The online supplementary material provide a detailed description of the nociceptive procedures. Ankle oedema was measured by a digital caliper, before and after IA injections[25], and results expressed as change in ankle diameter.

### **Inflammatory parameters of MSU-induced gout**

Synovial lavage fluid samples from MSU injected animals treated with either SSR240612 (10 nmol/articulation) or vehicle (PBS 0.05% DMSO) were obtained 2 h after IA injections. Briefly, animals were deeply anaesthetized with sodium pentobarbital (100 mg/kg, i.p.) and perfused with ice saline to remove blood. Ankle synovial cavities were washed with a final volume of 30  $\mu$ L of PBS to obtain synovial lavage fluid samples[26]. Protein content from synovial lavage was measured by Bradford method[27]. In addition, the total number of leukocytes[26], neutrophil myeloperoxidase (MPO) enzyme activity[28] and IL-1 $\beta$  levels were determined (See online supplementary material for detailed description).

For intravital microscopy, animals were deeply anaesthetized 2 h after treatment and placed on a homoeothermic heating blanket to maintain internal body temperature at 37°C. The skin over the left ankle was surgically removed and circulating leukocytes were stained *in vivo* using an intravenous injection of 0.05% Rhodamine 6G[29]. Joint microcirculation was observed under an epifluorescent microscope Axiotech Vario (Carl Zeiss, Jena, Germany). One minute recordings from ankle blood vessels (diameter 30-50  $\mu$ m) was selected for analysis of leukocyte rolling and adherence as previously described[29].

### **Kininase I and II activities**

Synovial lavage samples from gouty and control animals were obtained as described above and assessed for kininase I activity. The enzyme activity assay involved the incubation of samples in the presence of fluorescent dansyl-Ala-Arg, which is a substrate for kininase I[30, 31]. The fluorescent product was extracted with

chloroform and measured at 495 nm (340 nm excitation). The results are expressed as fluorescent units/mg of protein.

For the kininase II activity, ankle tissue samples (synovium and capsule) were incubated in the presence of a kininase II substrate, (N-[3-(2-furyl)-acryloyl]-L-phenylalanyl-glycylglycine (FAPGG)[32]. The product was measured colorimetrically (340 nm), and the results are expressed as  $\mu\text{mol}$  of cleaved substrate/minute.

### **Des-Arg<sup>9</sup>-bradykinin (DABK) measurement**

The synovial lavage fluid of animals IA injected with either vehicle (PBS) or MSU (1.25 mg/articulation) were used to analyze DABK levels. Samples with equal amounts of protein were centrifuged at 3000 g for 15 min and the supernatant was evaporated for complete precipitation of kinin precursors[33]. The formed residue was used for DABK quantification on nitrocellulose membranes using a Millipore slot blot apparatus[34]. The membrane was incubated first with a rabbit anti-human DABK-antibody (1:1000) followed by a streptavidin peroxidase polymer (1:2500). Blots were developed using 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, dried, scanned, and quantified with ImageJ software (RIID: nif=0000=30467).

### **Western blot and immunohistochemistry**

B<sub>1</sub>R expression in articular tissue samples (synovium and capsule) was assessed by western blotting 1, 2 and 4h after MSU or vehicle injections. Western blot analysis was carried out as described previously[35]. Ponceau staining served as a loading control and a specific anti-B<sub>1</sub> polyclonal primary antibody was used. The results were normalized to control group densitometry values and expressed as the relative amount of B<sub>1</sub>R expression.

Furthermore, ankle joint afferent nerves from 8 animals were labeled using the dye Fluoro-Gold (2% solution). Five days after an IA injection of Fluoro-Gold, animals were euthanized and ipsilateral dorsal root ganglia (DRG) from L3-L5 were removed[29]. Immunofluorescence was performed as previously reported[36] using B<sub>1</sub>R primary antibody (1:100) and an FITC-conjugated donkey antigoat secondary antibody (1:200). Specificity of the B<sub>1</sub>R antibody was determined through the omission of the primary antibody. The cell body areas of all Fluoro-Gold and B<sub>1</sub> positive cells were measured and analyzed[36]. No Fluoro-Gold labeling was observed in DRG sections from rats that were not injected with Fluoro-Gold (data not shown).

### **Statistical analysis**

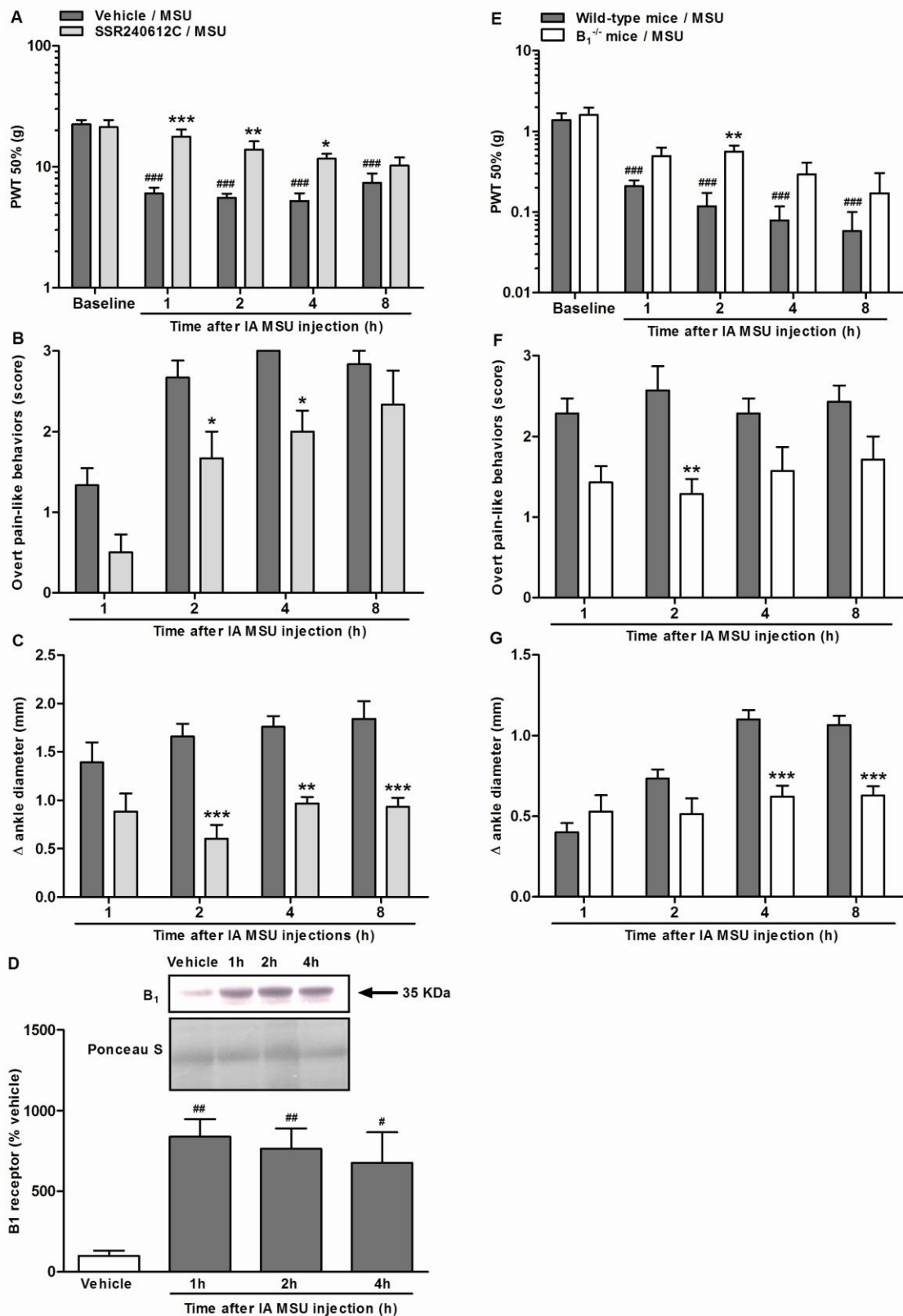
The difference between 2 groups at one time point was analyzed using Student's t test. Differences among 3 or more groups at one time point were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Newman-Keuls or Dunnett's post-hoc tests. Differences between 3 or more groups at different times were analyzed using two-way ANOVA followed by Bonferroni's post-hoc test. Statistical analysis was performed using GraphPad Software 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Percentage inhibition values are reported as the mean  $\pm$  S.E.M. obtained in each experiment in relation to the control values. P values less than 0.05 were considered significant. To meet the ANOVA assumptions, mechanical hyperalgesia data were log transformed prior to statistical analysis.

## **RESULTS**

### **Involvement of kinin B<sub>1</sub> receptors in MSU-induced pain and oedema**

IA injection of high dose MSU induced touch allodynia, overt pain-like behaviors and articular oedema (see online supplementary figure S1). The highest dose (1.25 mg/articulation) was able to induce pain and oedema at all time points tested ( $P < 0.001$ ), whereas low dose MSU (0.0125 mg/articulation) did not induce pain or oedema (see online supplementary figure S1).

The selective B<sub>1</sub>R antagonist SSR240612 (Fig. 1A-C), and B<sub>1</sub>R gene deletion (Fig. 1E-G), reduced touch allodynia, overt pain-like behaviors and articular oedema triggered by high dose MSU, especially at the early time points. Moreover, articular tissues from naïve animals constitutively expressed B<sub>1</sub>R protein which increased from 1 to 4 hours after MSU injection (Fig. 1D). Only 10 nmol/articulation was able to prevent the mechanical hyperalgesia and no significant pain behavior or oedema was observed with this dose (see online supplementary figure S2). Another bradykinin B<sub>1</sub>R antagonist, des-Arg<sup>10</sup>-HOE140, equally reduced nociception and oedema induced by MSU, which corroborates the role of kinin B<sub>1</sub>R activation in gout (see online supplementary figure S3).



**Fig. 1.** The protective effect of the selective B<sub>1</sub>R antagonist SSR240612 (10 nmol/articulation) (A, B, C) and B<sub>1</sub>R ablation (B<sub>1</sub><sup>-/-</sup>) (E, F, G) on touch allodynia (PWT:

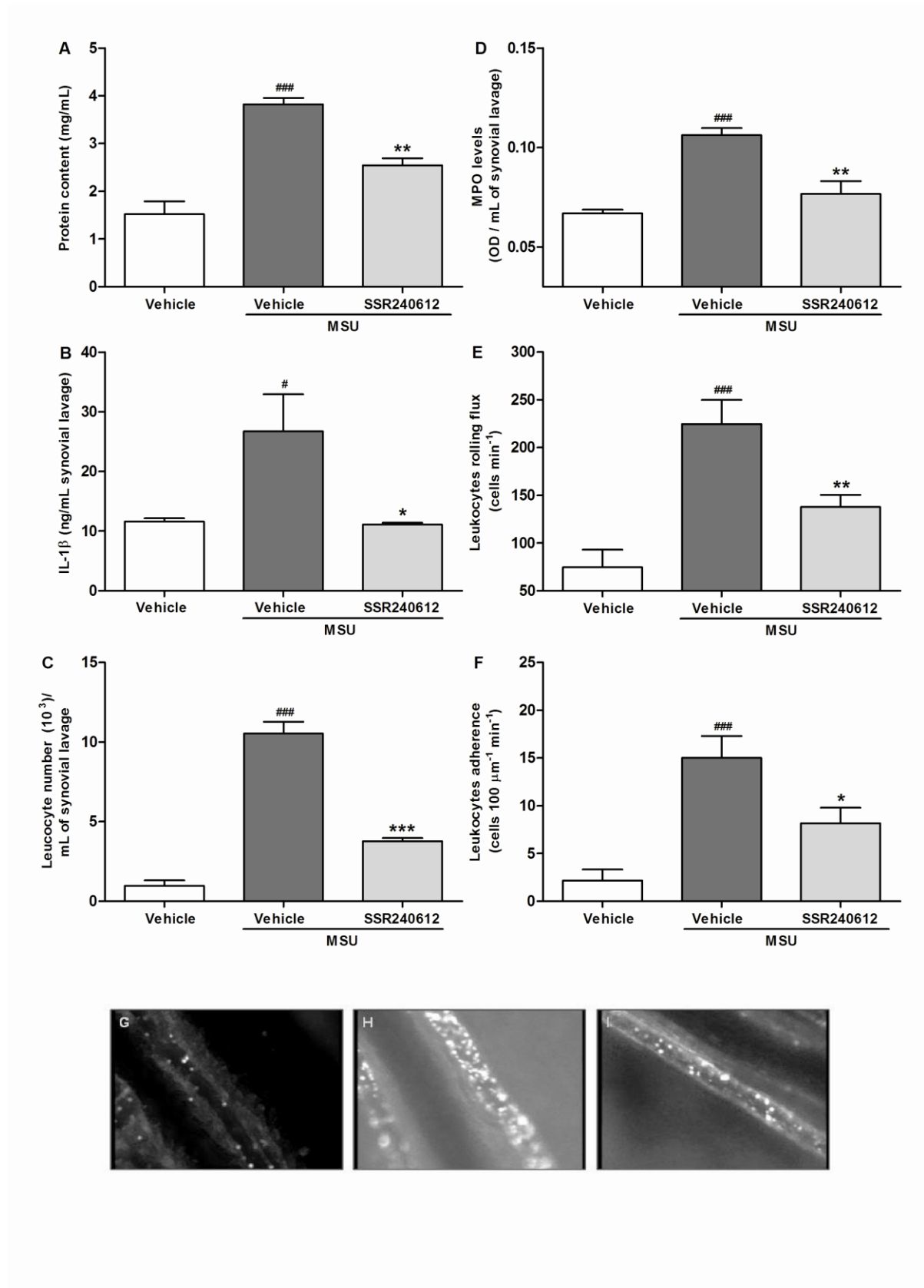


paw withdrawal threshold, A, E), overt pain-like behaviors (B, F) and oedema (C, G) induced by an IA MSU injection (1.25 mg/articulation). B<sub>1</sub>R expression increased by IA MSU injection (D). N=6 per group, only rats (A-C), N=4 per group, only rats (D) and N=7 per group, only mice (E-G). Each column represents the mean ± SEM. ### P<0.001 represent significant differences compared to the baseline levels of vehicle/MSU group (one-way ANOVA followed by the Student-Newman-Keuls' test). \* P<0.05; \*\* P<0.01 and \*\*\* P<0.001 represent significant differences compared to the vehicle/MSU IA-injected group (two-way ANOVA followed by Bonferroni's test).

### **Stimulation of kinin B<sub>1</sub> receptors mediate additional inflammatory responses in gout**

In addition to pain and oedema, B<sub>1</sub>R has been implicated in the development of other signs of inflammation, including leukocyte recruitment and pro-inflammatory cytokine production[4,18]. In the present study, it was found that SSR240612 reduced the protein content in the synovial fluid of MSU injected ankles (Fig. 2A) and abolished the release of IL-1 $\beta$  into the synovial fluid of gouty animals (Fig. 2B). Furthermore, we found that treatment with the B<sub>1</sub>R antagonist largely reduced the number of leukocytes (Fig. 2C), and MPO activity (Fig. 2D), indicating that PMN infiltration caused by MSU is mediated by B<sub>1</sub>R activation. Finally we demonstrated that MSU caused a three-fold increase in leukocyte rolling and a five-fold increase in. Furthermore, treatment with SSR240612 inhibited the increase in leukocyte rolling and adherence (41±16 and 58±20 % of inhibition, respectively) in ankle blood vessels (Fig. 2E, F). Representative images of vehicle, MSU and SSR240612 plus MSU effects on leukocyte rolling and adherence are illustrated in Fig. 2G-I. We also

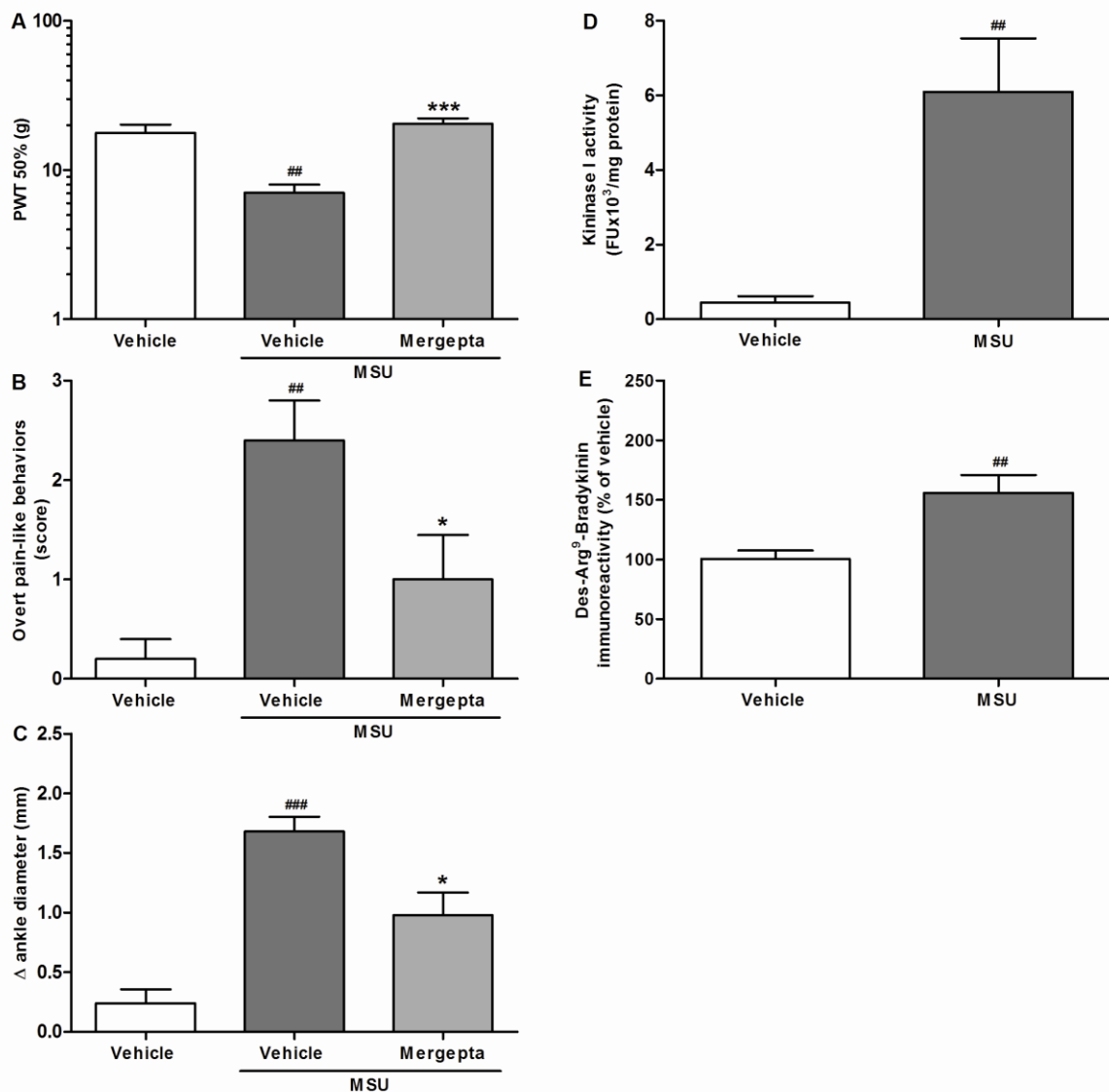
detected that B<sub>1</sub>R antagonism reduced the increase in P-selectin expression produced by MSU (see online supplementary figure S4).



**Fig. 2.** The protective effect of the B<sub>1</sub>R antagonist SSR240612 (10 nmol/articulation) on synovial lavage fluid protein content (A), IL-1 $\beta$  levels (B), total leukocyte number (C), MPO levels (D), and leukocyte rolling (E) and adherence (F) were increased by IA MSU injection (1.25 mg/articulation). Representative intravital microscope images of vehicle (G), MSU (H), and SSR240612 plus MSU (I) on leukocyte accumulation in an ankle blood vessel. N=5 per group, only rats were used. Each column represents the mean  $\pm$  SEM. # P<0.05 and #### P<0.001 represent significant differences compared to the vehicle group; \* P<0.05, \*\* P<0.01 and \*\*\* P<0.001 represent significant differences compared to the vehicle/MSU IA-injected group. The statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by the Student-Newman-Keuls' test.

### **Kinin B<sub>1</sub> receptor activation pathways involved in MSU-induced gouty attacks**

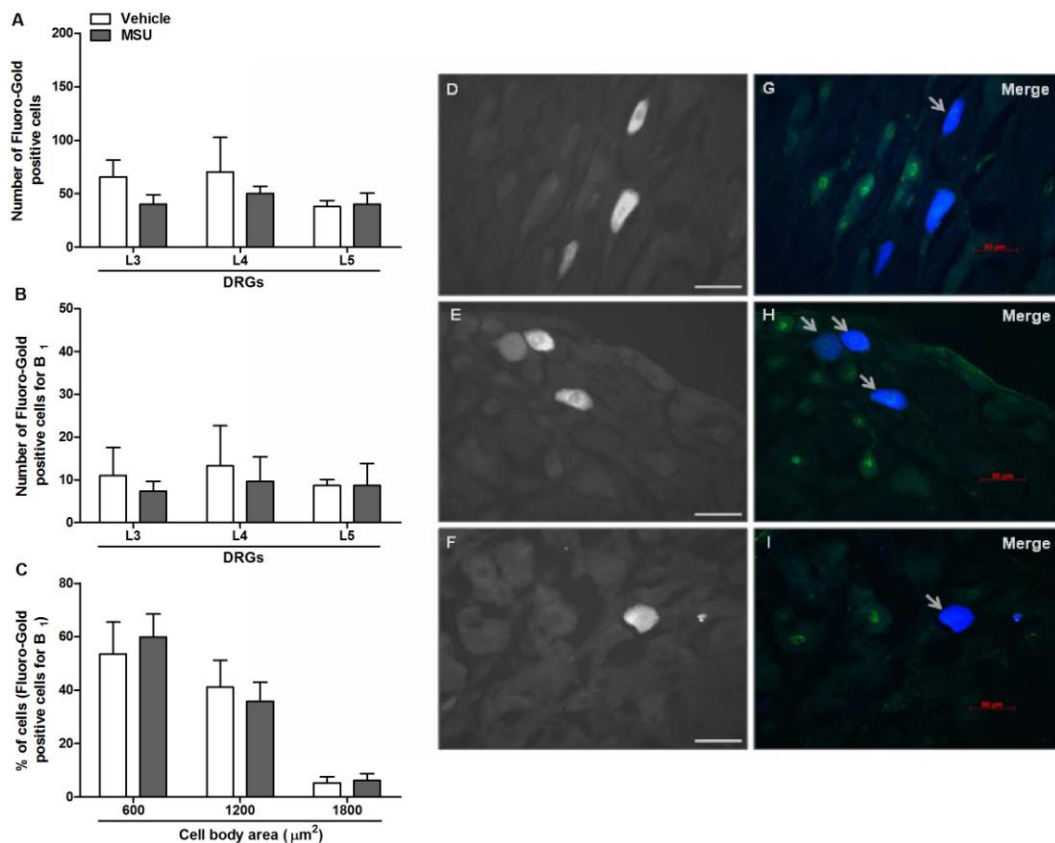
The kininase1 inhibitor Mergepta significantly reduced MSU-induced touch allodynia, overt pain-like behaviors and articular oedema (Fig. 3A-C). Animals challenged with MSU had higher articular kininase1 activity and DABK levels than animals injected with vehicle (Fig. 3D-E).



**Fig. 3.** The protective effect of the kininase I inhibitor Mergeпта (0.05 nmol/articulation) on touch allodynia (A), overt pain-like behaviors (B) and oedema (C) induced by MSU IA injections (1.25 mg/articulation). Synovial lavage fluid kininase I activity (D) and articular tissue DABK levels (E) increased by MSU injection. The measurements, with except of F, were made two hours after IA injections. N=5 per group (A-D) and N=4 per group (E), only rats were used. Each column represents the mean  $\pm$  SEM. # P<0.05, ## P<0.01 and ### P<0.001 represent significant differences compared to vehicle IA injected group, \* P<0.05 and \*\*\* P<0.001 represent significant differences compared to the vehicle/MSU IA injected

group. The statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by the Student-Newman-Keuls' test (A-C, F) or Student's t test (D, E).

We also confirmed that kinin B<sub>1</sub>R are expressed on sensory neurons that innervates gouty ankles. Further analysis of receptor expression between L3-L5 DRGs revealed that receptors were uniformly expressed at all levels (Fig 4A-B). Additionally, the majority of B<sub>1</sub> positive neurons were small-sized neurons with an area of 600 μm<sup>2</sup> or less, followed by medium-sized neurons (600-1200 μm<sup>2</sup>) (Fig. 4C), which indicated that kinin B<sub>1</sub>R are localized on nociceptive C- and Aδ-fibres[36]. In contrast with joint tissues, MSU injection did not alter the expression or the distribution of neuronal B<sub>1</sub>R. Photomicrographs from L3-L5 DRGs demonstrating Fluoro-gold positive cells from ankle joint afferents (D-F) and immunopositive cells for B<sub>1</sub> (G-I) are shown in Fig. 4.

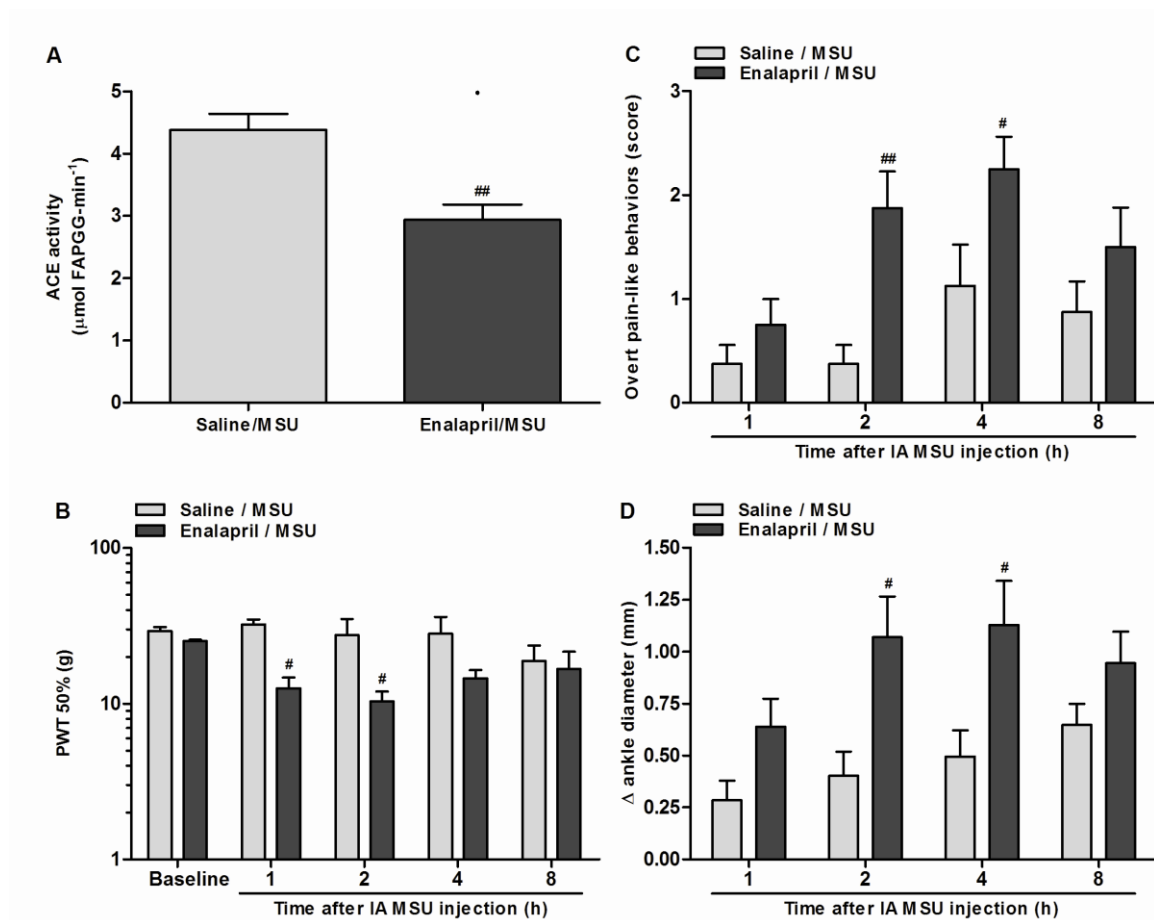


**Fig. 4.** Total number of Fluoro-Gold positive cells (A) and the number of Fluoro-Gold and B<sub>1</sub> co-localized positive cells (B) from L3, L4 and L5 dorsal root ganglia (DRGs), 2 h after vehicle or MSU (1.25 mg/articulation) IA injections. Size distribution of Fluoro-Gold and B<sub>1</sub> co-localized cells in L3, L4 and L5 DRGs (C). N=4 for per group, only rats were used. Photomicrographs shown in the left panel: retrograde labeling of ankle joint afferent DRGs with Fluoro-Gold taken from L3 (D), L4 (E) and L5 (F); right panel: immunofluorescent images revealing co-localization of B<sub>1</sub>-positive cells in the corresponding L3–L5 DRGs (G–I). Scale bar, 50 μm.

### ACEi treatment sensitizes animals to MSU-triggered acute gouty attacks

As mentioned above, IA injection of low dose MSU did not induce pain or edema itself. However, when the animals were pre-treated with the ACEi enalapril (3

mg/kg), low dose MSU reduced ACE activity in tissue taken from the ankles of these animals (Fig. 5A) and heightened mechanosensitivity and articular oedema (Fig. 5B-D). Pretreatment with another ACEi (captopril, 0.5 mg/kg) also produced pain and oedema after IA injection of low dose MSU (data not shown). Furthermore, ACEi treatment did not cause pain or oedema when administered in animals injected with saline (see online supplementary figure S5). Thus, ACE inhibition increased the sensitivity to MSU and facilitated the development of acute gout attacks.



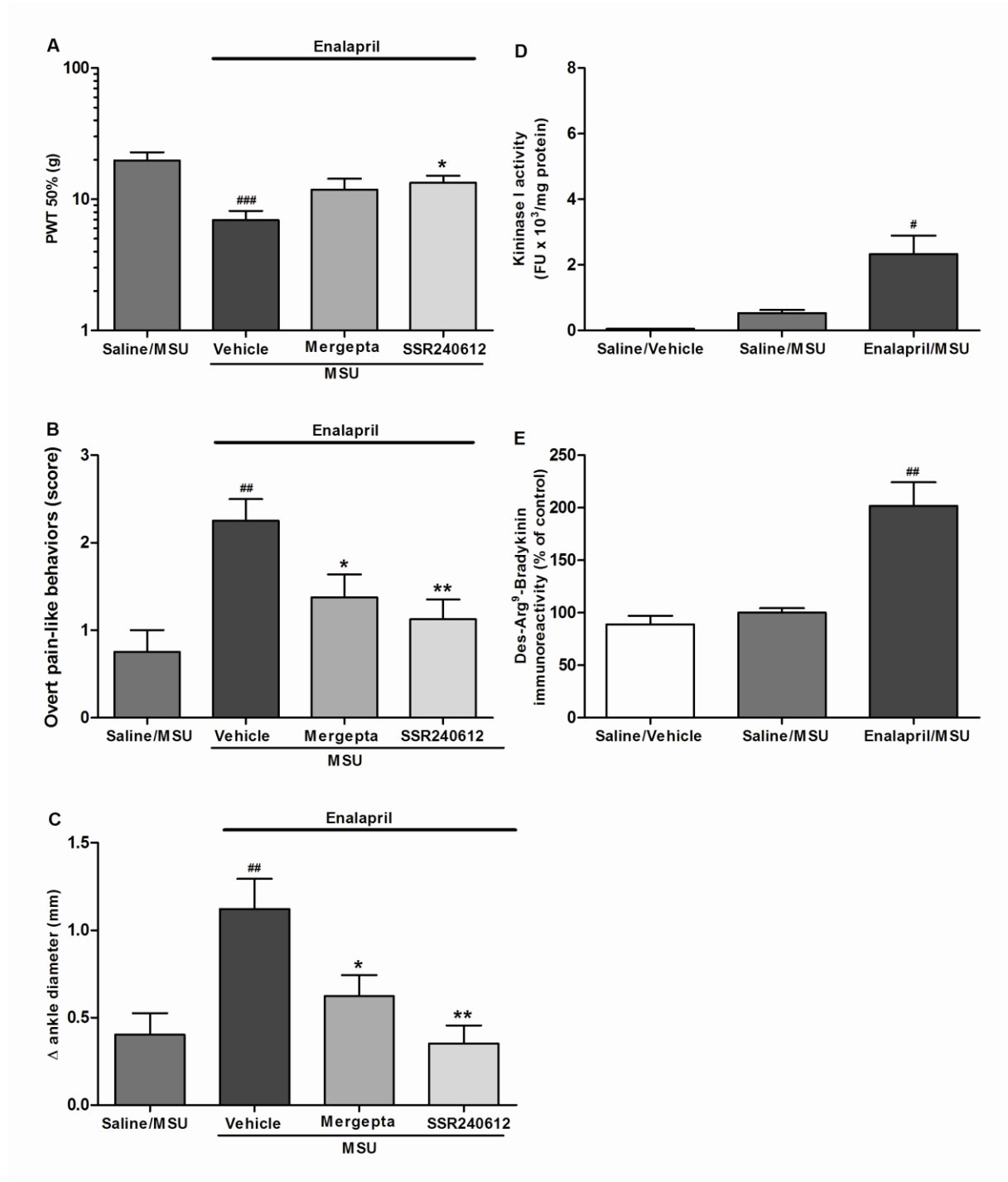
**Fig. 5.** Articular tissue ACE activity (A), touch allodynia (B), overt pain-like behaviors (C) and oedema (D) in animals pre-treated with saline or enalapril (3 mg/kg, p.o.) 0.5 h before the IA injection of a low dose of MSU (0.0125 mg/articulation). N=8 per group, only rats were used. Each column represents the mean  $\pm$  SEM. # P<0.05, ## P<0.01 and ### P<0.001 represent significant differences compared to the saline/MSU

group. The statistical analysis was performed using Student's t test (A) or two-way ANOVA followed by Bonferroni's post-hoc test (B,C,D).

### **MSU-triggered acute gouty attacks induced by ACEi treatment involve stimulation of kinin B<sub>1</sub> receptors**

To test if ACE inhibition potentiates MSU-induced gouty attack by a kinin B<sub>1</sub>R mechanism, the effects of SSR240612 and Mergepta administered to ACEi/MSU treated animals were observed on joint pain and oedema. Both SSR240612 and Mergepta inhibited touch allodynia, hyperalgesia and oedema in enalapril-treated animals (Fig. 6A-C). Corroborating these *in vivo* results, animals treated with enalapril and challenged with low dose MSU had higher articular kininaseI activity and DABK levels than animals challenged with vehicle alone (Fig. 6D, E). Additionally, enalapril treatment increased B<sub>1</sub>R expression in the ankle tissues (see online supplementary figure S4).





**Fig. 6.** The protective effect of the kininase I inhibitor Mergeпта (0.5 nmol/articulation) and the B<sub>1</sub>R antagonist SSR240612 (10 nmol/articulation) on touch allodynia (A), overt pain-like behaviors (B) and oedema (C) in animals pre-treated with enalapril (3 mg/kg, p.o.) 0.5 h before the IA injection of a low dose of MSU (0.0125 mg/articulation). Synovial lavage fluid kininase I activity (D) and articular tissue DABK

levels (E) in animals pre-treated with saline or enalapril 0.5 h before IA injection. All measures were made two hours after IA injections. N=8 for per group (A-C) and N=5 per group (D, E), only rats were used. Each column represents the mean  $\pm$  SEM. # P<0.05, ## P<0.01 and ### P<0.001 represent significant differences compared to saline/MSU treated group; \* P<0.05 and \*\* P<0.01 represent significant differences compared to enalapril/MSU group (A, B, C). The statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by the Student-Newman-Keuls' test.

## DISCUSSION

The present study determined that both peripheral B<sub>1</sub>R antagonism and gene deletion reduced pain and oedema induced by MSU in rodents, which indicate a role for the B<sub>1</sub> pathway in the onset of MSU crystal-induced inflammation. These results are relevant because pain and oedema are hallmark responses of an acute gouty attack in humans[8,9,37] Similar to our findings in a gout model, IA administration of a B<sub>1</sub>R antagonist is able to reduce pain and joint damage in a model of osteoarthritis[38]. Additionally, since IA administration is routinely used clinically it is possible that local administration of B<sub>1</sub>R antagonists could be an effective way to treat gouty attacks in humans[8].

The current study also found that a kinin B<sub>1</sub>R antagonist reduced increased articular IL-1 $\beta$  levels and the massive influx of leukocytes induced by MSU. This is an interesting finding because both neutrophils and IL-1 $\beta$  are pivotal triggers of gout, and have been detected in the synovial fluid of gouty patients[1,5,39-41]. Contrary to our results, another study failed to detect B<sub>1</sub>R antagonism effects on leukocyte infiltration caused by an intraperitoneal MSU injection[42]. Differences in the injection

site of MSU and pharmacokinetic limitations of the antagonist used due to its peptidic nature may explain this observation. Furthermore, we demonstrated that MSU increased the rolling and adherence of leukocytes in blood vessels supplying the ankle, and these effects were mediated by B<sub>1</sub>R. It is known that B<sub>1</sub>R stimulates leukocyte recruitment by promoting interactions between leukocytes and vascular endothelium adhesion molecules, resulting in increased rolling, adhesion and migration[4,18,43,44]. Accordingly, we verified that B<sub>1</sub>R antagonism not only reduced leukocyte trafficking in the joint, but also increased the expression of the adhesion molecule P-selectin.

The exudation of plasma proteins caused by MSU could contain some of the substrates and forming enzymes for the local generation of kinins in the gouty joint[6]. In fact, MSU induced a rise in local DABK levels and this process seemed to be regulated by kininase I. Accordingly, increased kininase I activity was previously reported in the synovial fluid of a gout patient[7]. Despite the enhanced local DABK production, the expression of B<sub>1</sub>R was necessary to mediate MSU-induced inflammation.

Immunohistochemistry revealed constitutive B<sub>1</sub>R expression in the articular tissues of control rats, similar to what has been described in normal synovial tissue of humans[6]. Moreover, we detected, for the first time, the expression of B<sub>1</sub>R in small diameter sensory neurons projecting from the ankle joint. Consistent with our findings, constitutive B<sub>1</sub>R-containing sensory neurons have been found in peripheral nerve terminals[45], and these neurons are likely to be C- and A $\delta$ -fibre which are important for pain regulation[33]. Interestingly, MSU increased B<sub>1</sub>R expression in articular tissues as early as 1 hour after IA injection. This rapid increase in B<sub>1</sub>R expression seems to be independent of transcription and it may be dependent on

mRNA stabilization and protein synthesis induction by interleukin-1 $\beta$ [35,48]. In addition, it has been proposed that a facilitatory interaction between B<sub>1</sub>R and IL-1 $\beta$  can promote rapid B<sub>1</sub>R expression[43,49]. Moreover, it is important to note that in addition to neurons, other resident or infiltrating cells (such as synoviocytes or neutrophils) can express B<sub>1</sub>R in joints[6,46,47]. This means that the increased B<sub>1</sub>R in articular tissues may be dependent on leukocyte infiltration, without an actual “up regulation” in expression.

Another exciting finding of our investigation was the involvement of B<sub>1</sub>R in the increased propensity of acute gout attack in response to systemically administered ACEi. In fact, articular B<sub>1</sub>R antagonism and kininase I inhibition prevented the inflammation caused by low dose MSU in ACEi-treated animals. Low dose MSU also increased kininase I activity and DABK levels in ACEi-treated animals, which suggests that bradykinin may serve as a substrate for DABK formation, as demonstrated previously[12]. Additionally, ACEi increased B<sub>1</sub>R expression in the low dose MSU IA injected animals, which can directly enhance B<sub>1</sub> signalling[13]. This is an interesting observation since millions of patients are treated with ACEi to combat cardiovascular and renal diseases which are common comorbidities of gout[8,10]. Our finding that ACEi increased the risk of gout in the rodent model is consistent with this observation. Thus, ACEi therapy in gout patients requires careful considerations since in addition to B<sub>1</sub>R contributing to some of the ACEi cardioprotective effects[50], it may also increase the patient's risk of gout.

In summary, the present study showed that kinin B<sub>1</sub>R are involved in pain and inflammation in a rodent model of acute gouty arthritis. Data presented here also showed that ACEi increased the risk and severity of acute gouty attacks by triggering

B<sub>1</sub>R activation. These data suggest that the kinin B<sub>1</sub>R has therapeutic potential for acute gouty arthritis treatment and prophylaxis, especially in patients taking ACEi.

### **ACKNOWLEDGMENT**

The authors acknowledge Dr. Daniela Cabrini, Maria Fernanda Werner and Michel Fleith Otuki, from the Federal University of Parana, Brazil, for all the assistance during this work. We also acknowledge Allison Reid and Eugene Krustev from Dalhousie University, Canada, for their technical support. This study was supported by grants from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil.

Competing Interest: None declared.

**REFERENCES**

1. Terkeltaub R. Update on gout: new therapeutic strategies and options. *Nat Rev Rheumatol* 2010;6:30:8.
2. Damas J, Ramacle-Volon G, Adam A. Inflammation in the rat paw due to urate crystals. Involvement of the kinin system. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1984;325:76-9.
3. Ginsberg MH, Jaques B, Cochrane CG, et al. Urate crystal--dependent cleavage of Hageman factor in human plasma and synovial fluid. *J Lab Clin Med* 1980;95:497-506.
4. Ahluwalia A, Perretti M. Involvement of bradykinin B<sub>1</sub> receptors in the polymorphonuclear leukocyte accumulation induced by IL-1 in vivo in the mouse. *J Immunol* 1996;156:269-74.
5. Mitroulis I, Kambas K, Ritis K. Neutrophils, IL-1 $\beta$ , and gout: is there a link? *Semin Immunopathol* 2013;35:501-12.
6. Cassim B, Shaw OM, Mazur M, et al. Kallikreins, kininogens and kinin receptors on circulating and synovial fluid neutrophils: role in kinin generation in rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 2009;48:490-6.
7. Chercuitte F, Beaulieu AD, Poubelle P, et al. Carboxypeptidase N (kininase I) activity in blood and synovial fluid from patients with arthritis. *Life Sci* 1987;41:1225-32.
8. Schlesinger N. Difficult-to-treat gouty arthritis: a disease warranting better management. *Drugs* 2011;71:1413-39.
9. Rock KL, Kataoka H, Lai JJ. Uric acid as a danger signal in gout and its comorbidities. *Nat Rev Rheumatol* 2013;9:13-23.

10. Choi HK, Soriano LC, Zhang Y, et al. Anthihypertensive drugs and risk of incident gout among patients with hypertension: population based case-control study. *BMJ* 2012;344:d8190.
11. Choi HK, Mount DB, Reginato AM, et al. Pathogenesis of gout. *Ann Intern Med* 2005;143:499-516.
12. Marceau F, Regoli D. Bradykinin receptor ligands: therapeutic perspectives. *Nat Rev Drug Discov* 2004;3:845-52.
13. Erdos EG, Tan F, Skidgel RA. Angiotensin-I converting enzyme inhibitors are allosteric enhancers of kinin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptor function. *Hypertension* 2010;55:214-20.
14. Duchene J, Ahluwalia A. The kinin B<sub>1</sub> receptor and inflammation: new therapeutic target for cardiovascular disease. *Curr Opin Pharmacol* 2009;9:125-31.
15. Coderre TJ, Wall PD. Ankle joint urate arthritis (AJUA) in rats: an alternative animal model of arthritis to that produced by Freund's adjuvant. *Pain* 1987; 28:379-93.
16. 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.
17. McGrath J, Drummond G, Kilkenny C, et al. Guidelines for reporting experiments involving animals: the ARRIVE guidelines. *Br J Pharmacol* 2010;160:1573–6.
18. Pesquero JB, Araujo RC, Heppenstall PA, et al. Hypoalgesia and altered inflammatory responses in mice lacking kinin B<sub>1</sub> receptors . *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:8140-5.

19. Fox A, Wotherspoon G, McNair K, et al. Regulation and function of spinal and peripheral neuronal B<sub>1</sub> bradykinin receptors in inflammatory mechanical hyperalgesia. *Pain* 2003;104:683-91.
20. Décarie A, Drapeau G, Closset J, et al. Development of digoxigenin-labeled peptide: application to chemiluminoenzyme immunoassay of bradykinin in inflamed tissues. *Peptides* 1994;15:511-8.
21. Santos DR, Calixto JB, Souza GE. Effect of a kinin B2 receptor antagonist on LPS- and cytokine-induced neutrophil migration in rats. *Br J Pharmacol* 2003;139:271-8.
22. Dixon WJ. Efficient analysis of experimental observations. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1980;20:441-62.
23. Chaplan, SR, Bach FW, Pogrel JW, et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods* 1994;53:55-63
24. Coderre TJ, Wall PD. Ankle joint urate arthritis in rats provide a useful tool for evaluation of analgesic and anti-arthritis agents. *Pharmacol Biochem Behav* 1988;29:461-6.
25. 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.
26. Pinto LG, Cunha TM, Vieira SM, et al. IL-17 mediates articular hypernociception in antigen-induced arthritis in mice. *Pain* 2010;148:247-56.
27. Bradford MM. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-25.
28. Suzuki K, Ota H, Sasagawa S, et al. Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. *Anal Biochem* 1983;132:345-52.



29. 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.
30. Sangsree S, Brovkovich V, Minshall RD, et al. Kininase I-type carboxipeptidase enhance nitric oxide production in endothelial cells by generating bradykinin B<sub>1</sub> receptor agonists. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;284:1959-68.
31. Zhang X, Tan F, Zhang Y, et al. Carboxypeptidase M and kinin B<sub>1</sub> receptors interact to facilitate efficient b1 signaling from B2 agonists. *J Biol Chem* 2008; 283:7994-8004.
32. da Silva AS, Dias LD, Borges JF, et al. Renal GLUT1 reduction depends on angiotensin-converting enzyme inhibition in diabetic hypertensive rats. *Life Sci* 2013;92:1174-9.
33. Cyr M, Lepage Y, Blais C Jr, et al. Bradykinin and des-Arg<sup>9</sup>-bradykinin metabolic pathways and kinetics of activation of human plasma. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;281:H275-83.
34. Singh P, Krishna A, Sridaran R. Localization of gonadotrophin-releasing hormone I, bradykinin and their receptors in the ovaries of non-mammalian vertebrates. *Reproduction* 2007;133:969-81.
35. Ferreira J, Trichês KM, Medeiros R, et al. Mechanisms involved in the nociception produced by peripheral protein kinase c activation in mice. *Pain* 2005;117:171-81.
36. Ma QP. The expression of bradykinin B(1) receptors on primary sensory neurones that give rise to small caliber sciatic nerve fibres in rats. *Neuroscience* 2001;107:665-73.

37. Mandell BF. Clinical manifestations of hyperuricemia and gout. *Cleve Clin J Med* 2008;75(Suppl 5):S5–S8
38. Kaufman GN, Zaouter C, Valteau B, et al. Nociceptive tolerance is improved by bradykinin receptor B1 antagonism and joint morphology is protected by both endothelin type A and bradykinin receptor B1 antagonism in a surgical model of osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 2011;13:R76.
39. Scanu A, Oliviero F, Ramonda R, et al. Cytokine levels in human synovial fluid during the different stages of acute gout: role of transforming growth factor  $\beta$ 1 in the resolution phase. *Ann Rheum Dis* 2012;71:621-4.
40. Schlesinger N, Alten RE, Bardin T, et al. Canakinumab for acute gouty arthritis in patients with limited treatment options: results from two randomised, multicentre, active-controlled, double-blind trials and their initial extensions. *Ann Rheum Dis* 2012;71:621-4.
41. Schlesinger N. Anti-interleukin-1 therapy in the management of gout. *Curr Rheumatol Rep* 2014;16:398.
42. Shaw OM, Harper JL. Bradykinin receptor 2 extends inflammatory cell recruitment in a model of acute gouty arthritis. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 416:266-9
43. Duchene J, Lecomte F, Ahmed S, et al. A novel inflammatory pathway involved in leukocyte recruitment: role for the kinin B<sub>1</sub> receptor and the chemokine CXCL5. *J Immunol* 2007;179:4849-56.
44. Figueroa CD, Matus CE, Pavicic F, et al. Kinin B1 receptor regulates interactions between neutrophils and endothelial cells by modulating the levels of Mac-1, LFA-1 and intercellular adhesion molecule-1. *Innate Immun.* 2014 Apr 11. [Epub ahead of print]

45. Wotherspoon G, Winter J. Bradykinin B<sub>1</sub> receptor is constitutively expressed in the rat sensory nervous system. *Neurosci Lett* 2000;294: 175e178.
46. Dlamini Z, Bhoola KD. Upregulation of tissue kallikrein, kinin B<sub>1</sub> receptor, and kinin B<sub>2</sub> receptor in mast and giant cells infiltrating oesophageal squamous cell carcinoma. *J Clin Pathol* 2005;58:915e922.
47. Wohlfart P, Dedio J, Wirth K, et al. Different B<sub>1</sub> kinin receptor expression and pharmacology in endothelial cells of different origins and species. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;280:1109-16.
48. Zhou X, Polgar P, Taylor L. Roles for interleukin-1beta, phorbol ester and a post-transcriptional regulator in the control of bradykinin B<sub>1</sub> receptor gene expression. *Biochem J* 1998;15:361-6.
49. Cunha TM, Verri WA Jr, Fukada SY, et al. TNF-alpha and IL-1beta mediate inflammatory hypernociception in mice triggered by B<sub>1</sub> but not B<sub>2</sub> kinin receptor. *Eur J Pharmacol* 2007;573:221-9.
50. Duka A, Kintsurashvili E, Duka I, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibition after experimental myocardial infarct: role of the kinin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptors. *Hypertension* 2008;51:1352-7.

## Online supplementary material

### Study design

For the experiments, the primary outcome measures were pain behaviour and secondary was oedema formation. The group size for each experiment was determined by sample size estimation for each experiment, based on previous results obtained in our laboratory, where we have observed touch allodynia development after MSU IA injection. Each experiment was repeated 2 to 3 times, between 8:00 a.m. and 5:00 p.m. Allocation concealment was not performed because we had allocated the animals in different groups to yield groups with similar basal values in the initial phase of the experiment. Experimenters were blinded to the genotype of the animals and the drug treatment when performing the tests. No animal or sample was excluded from the analysis.

Animals were housed in a controlled-temperature environment in individually ventilated cages: rat (2 per cage) or mouse (8 per cage), with wood shaving bedding and nesting material, maintained at  $22\pm 1^\circ\text{C}$ . Animals were housed with a 12 hours light/dark cycle (lights on at 7:00 am) and fed with rodent chow (Puro Lab 22 PB pelleted form, Puro Trato, Rio Grande do Sul, Brazil for rats or Global Diet 2018, Harlan, Lombardia for mice) and tap water *ad libitum*. Deletion of the entire coding sequence for B<sub>1</sub> kinin receptors was achieved according to the methodologies described by Pesquero (2000) and mice were only used for the experiments with B<sub>1</sub>R gene deletion, to reinforce B<sub>1</sub> receptor involvement on gout attack. Animals were allowed to acclimatize to their housing environment for at least 7 days prior to experimentation and to the experimental room for 1 hour before experiments. The final volume of IA injections, even when there was MSU plus treatment, was 50  $\mu\text{l}$  for rats or 20  $\mu\text{l}$  for mice.

### **Nociceptive parameters**

For the measurement of touch allodynia the PWT was carried out using the Up-and-Down paradigm [22, 23]. Von Frey filaments of increasing stiffness (6 - 100 g for rats and 0,07 – 6 g for mice) were applied to the animal hind paw plantar surface with enough pressure to bend the filament. The absence of paw lifting after 3 s led to the use of the next filament with increasing stiffness, and paw lifting indicated a positive response and led to the use of the next weakest filament. This paradigm continued until a total of six measurements were taken or until four consecutive positive or four consecutive negative responses had occurred. The 50% mechanical PWT response was then calculated from the resulting scores [23]. The PWT is expressed in grams (g) and was evaluated before (Baseline) and several times after the IA injection.

The overt pain-like behaviors [24] were observed before start the measurement of touch allodynia. The amount of weight the rat was willing to put on the hind paw of the injected limb was evaluated and categorized according to the scale: score 0 was considered when the paw pressure was normal, with equal weight distribution on both hind-paws; score 1 was considered when the paw pressure was slightly reduced, with the paw completely on the floor, but toes are not spread; score 2 was considered when paw pressure was moderately reduced, with foot curled with only some parts of the foot lightly touching the floor; and finally score 3 was considered when the paw pressure was severely reduced, with foot elevated completely.

### **Inflammatory parameters**

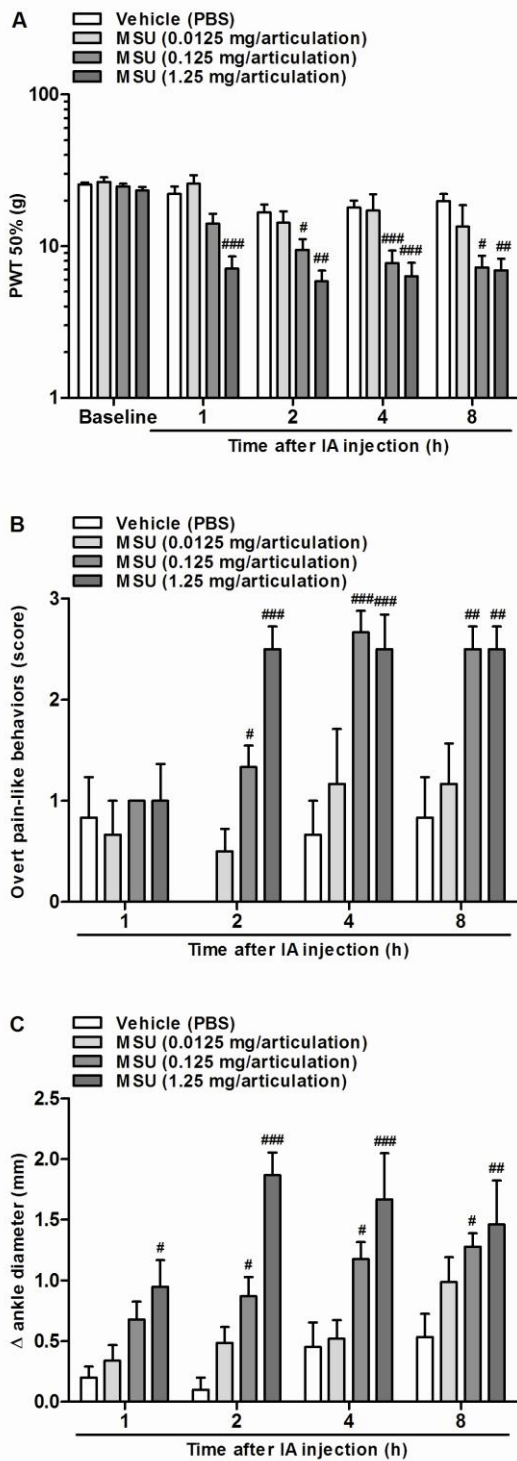
Injected ankle synovial cavities were washed with 30  $\mu$ L of PBS (10  $\mu$ L, three times) to obtain the synovial lavage fluid sample. Protein content was measured by

Bradford method and expressed as mg of protein/mL of lavage[27]. Following, samples were centrifuged at 13000 g for 15 min to obtain supernatant S1 and precipitate P1. Samples of synovial lavage (P1) were diluted (1:10) with Turk's solution to a final volume of 100  $\mu$ L, and the total number of leukocytes was determined using a Neubauer chamber. A second centrifugation from P1 mixed to acetate buffer and 0.5% HTAB was required to obtain the supernatant S2, used for colorimetrically (630 nm) MPO enzyme activity determination, expressed as MPO levels (optical density (OD)/mL of lavage). S1 samples, diluted to a final volume of 200  $\mu$ L on the appropriate buffer, were used for determination of synovial levels of the inflammatory cytokine IL-1 $\beta$  by enzyme immunoassay kit, and expressed as ng of cytokine/mL of lavage.

### Reagents

MSU was prepared as described by Hoffmeister (2011). Briefly, 4 g of uric acid (Vetec, Rio de Janeiro, Brazil) was dissolved and heated in 800 mL of H<sub>2</sub>O, adjusted to pH 8.9 with NaOH (9 mL, 0.5 N) at 60 °C, cooled overnight, and then washed and dried. Needle-like crystals were recovered and suspended in phosphate-buffered saline (PBS; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10.71 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 6.78 mM, NaCl 120.4 mM, pH 7.4). Polarized light microscopic examination confirmed that the crystals were rod-shaped and varied in length (12  $\pm$  2  $\mu$ m). The preparation was endotoxin-free as determined by an amebocyte cell lysate assay (Sigma, St Louis, MO, USA). The selective B<sub>1</sub>R antagonist SSR240612 was kindly provided by Sanofi-Aventis (Germany). Cytokine IL-1 $\beta$  kit was from PeproTech Inc., Rocky Hill, NJ, USA. Fluorescent dansyl-Ala-Arg and (N-[3-(2-furyh)-acryloyl]-L-phenylalanyl)glycylglycine (FAPGG) were purchased from Bachem Inc., Canada. Rabbit anti-human DABK-antibody from Bio-Rad AbD Serotec, United Kingdom and anti-B<sub>1</sub> polyclonal primary antibody, B<sub>1</sub>R antibody and

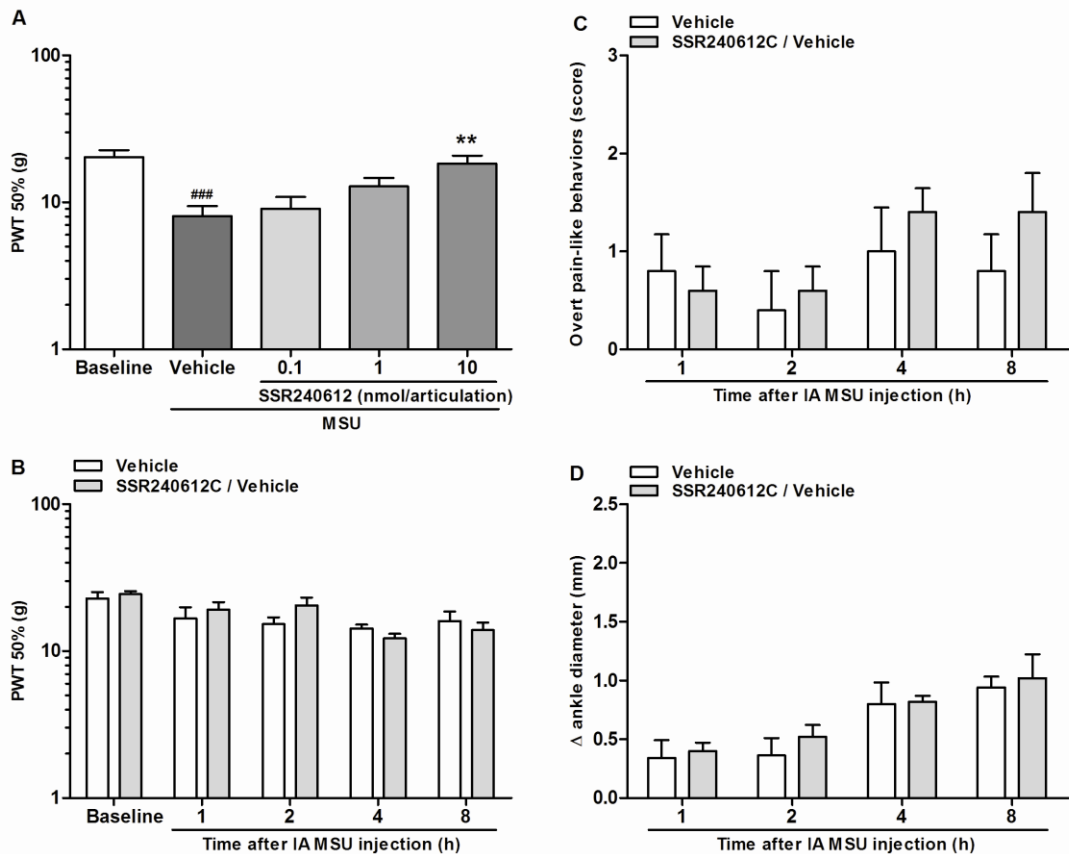
FITC-conjugated donkey antigoat from Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA. Retrograde dye Fluoro-Gold from Invitrogen, Ontario, Canada. Unless otherwise indicated, all other reagents were obtained from Sigma (Sigma, St Louis, MO, USA) and were dissolved in the appropriate vehicle solutions.



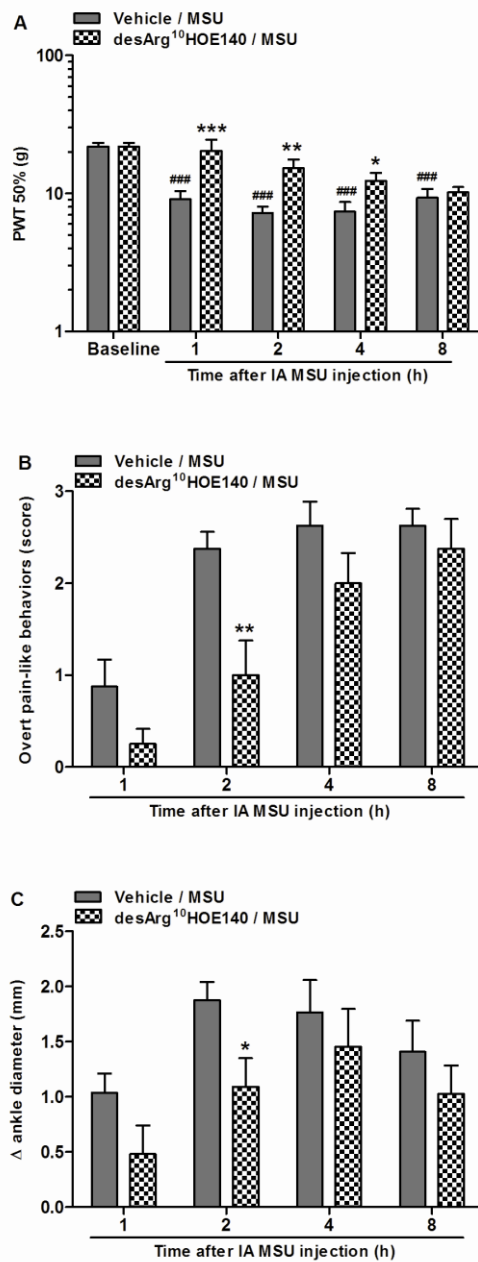
**Online supplementary figure S1.** Touch allodynia (A, PWT: paw withdrawal threshold), overt pain-like behaviors (B) and oedema (C) induced by IA MSU injection. N=6 per group, only rats were used. Each column represents the mean  $\pm$  SEM. # P<0.05, ## P<0.01 and ### P<0.001 represent significant differences compared



to vehicle injected group. The statistical analysis was performed using two-way ANOVA followed by Bonferroni's test.

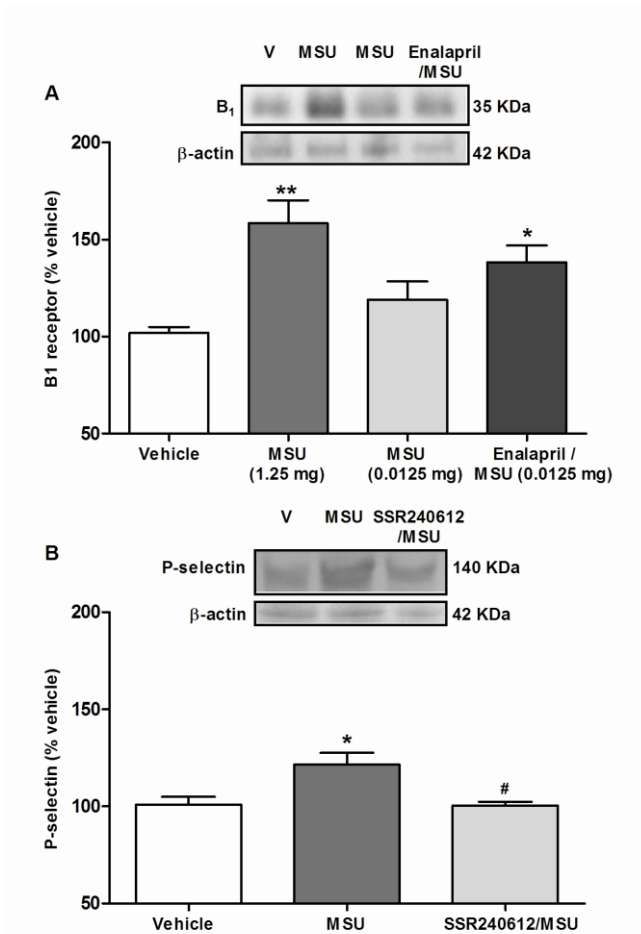


**Online supplementary figure S2.** Dose-response curve of the preventive effect of the  $B_1$  receptor antagonist SSR240612 on touch allodynia induced by MSU IA injection (A). touch allodynia (B), overt pain-like behaviors (C) and oedema (D) in animals IA injected with vehicle or SSR240612. All measures were obtained two hours after IA injections. N=6 for baseline, vehicle/MSU and 1 nmo/articulation; N=5 for 0.1 and 10 nmo/articulation (A), N=5 per group (B-D), only rats were used. Each column represents the mean  $\pm$  SEM. of ###  $P < 0.001$  represent significant differences compared to the baseline and \*\*  $P < 0.01$  represent significant differences compared to the vehicle/MSU IA injected group. The statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by the Student-Newman-Keuls' test.

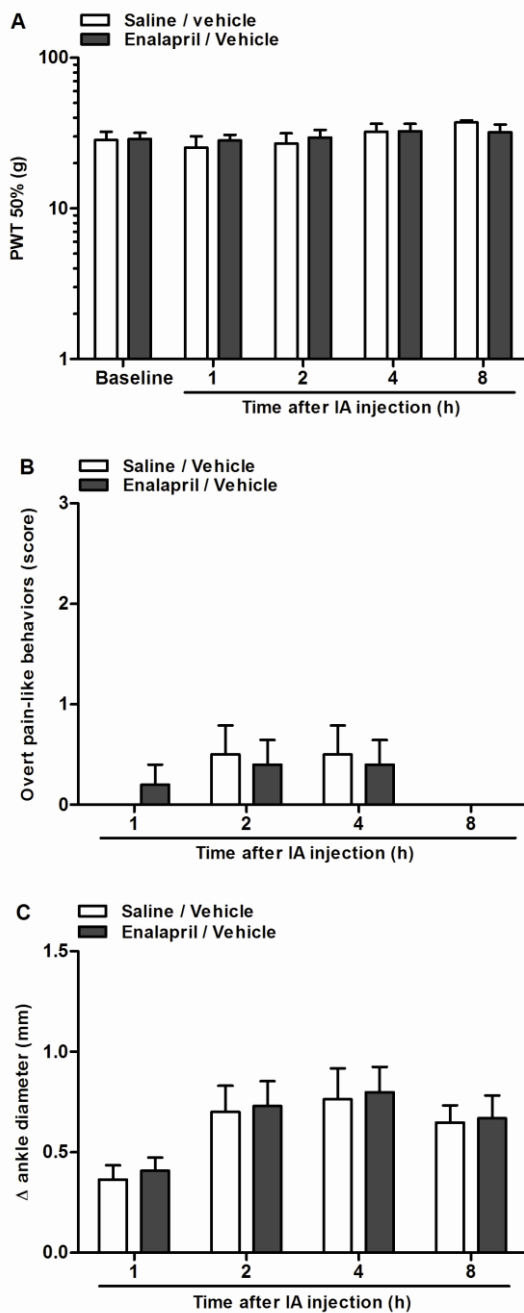


**Online supplementary figure S3.** The preventive effect of the selective B<sub>1</sub>R antagonist desArg<sup>9</sup>HOE140 (10 nmol/articulation) on touch allodynia (A), overt pain-like behaviors (B) and edema (C) induced by IA MSU injection (1.25 mg/articulation). N=8 per group, only rats were used. Each column represents the mean  $\pm$  SEM. ### P<0.001 represent significant differences compared to the baseline of vehicle/MSU group (one-way ANOVA followed by the Student-Newman-Keuls' test); and \* P<0.05;

\*\*  $P < 0.01$  and \*\*\*  $P < 0.001$  represent significant differences compared to the vehicle/MSU IA injected group (two-way ANOVA followed by Bonferroni's test).



**Online supplementary figure S4.** B<sub>1</sub>R expression in ankle tissue 2 h after IA injections of vehicle (PBS), high MSU dose (1.25 mg/articulation), low MSU dose (0.0125 mg/articulation) or Enalapril pretreatment plus low MSU dose (A). P-selectin expression in ankle tissue 2 h after IA injections of vehicle (PBS) or a high MSU dose (1.25 mg/articulation) (B). N=4 per group, only rats were used. Each column represents the mean  $\pm$  SEM. \*  $P < 0.05$  and \*\*  $P < 0.01$  represent significant differences compared to vehicle group; #  $P < 0.05$  represent significant differences compared to MSU group (one-way ANOVA followed by the Student-Newman-Keuls' test).



**Online supplementary figure S5.** Analyses of touch allodynia (A), overt pain-like behaviors (B) and edema (C) development after pre-treatment with saline or Enalapril (3 mg/kg) in animals IA injected with vehicle. N=4 for saline/vehicle and N=5 for enalapril/vehicle, only rats were used. Each column represents the mean  $\pm$  SEM. No significant differences were observed between the groups. Statistical analysis was performed using two-way ANOVA followed by Bonferroni's test.

---

## 4. DISCUSSÃO

Pudemos observar que a administração IA de cristais de MSU (1,25 mg/articulação) em ratos desencadeou comportamentos nociceptivos que foram caracterizados como alodínia ao toque e nocicepção em curso (ou nocicepção espontânea) (BENNET 2012). Estas respostas foram visíveis a partir de 1 hora após a injeção IA dos cristais, com pico em torno de 2-4 horas e mantendo-se até 8 horas após a injeção do MSU (tempo observado). Nossos resultados estão de acordo com um estudo anterior de nosso grupo, no qual foi caracterizada a resposta nociceptiva frente a injeção IA de MSU (HOFFMEISTER et al., 2014) bem como com achados clínicos, que descrevem a crise aguda da gota como sendo caracterizada pelo desenvolvimento de dor contínua grave durante um período de aproximadamente 12 horas, sendo que o pico ocorre em torno de 4 horas, desaparecendo após 72 horas (FAIRES e MCCARTY, 1962; KEITH e GILLILAND, 2007; ZYCHOWICZ et al., 2010).

Outro aspecto clínico da crise aguda de gota é a sensação de queimação e o inchaço (edema) da articulação afetada, o qual se 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). Da mesma forma, a injeção IA de MSU no tornozelo de ratos foi capaz de levar a formação de edema entre 2-8 horas após sua injeção (tempo observado). Este dado está de acordo com o estudo de HOFFMEISTER et al. (2014), onde foi demonstrado a formação de edema articular entre 1-72 horas após a injeção de MSU. Estes resultados são interessantes, pois comprovam que o modelo pré-clínico utilizado neste estudo é capaz de mimetizar alguns dos parâmetros inflamatórios evidenciados em pacientes com artrite gotosa, como desenvolvimento de alodínia mecânica, nocicepção espontânea e edema (SEEGMILLER e MALAWISTA, 1962; FAIRES e MCCARTY, 1962).

A importância do receptor B<sub>1</sub> na modulação da inflamação e nocicepção já é bem descrita na literatura (PERKINS et al., 1993; PESQUERO et al., 2000; FERREIRA et al., 2001, 2005) e há uma base sustentável de evidências demonstrando o envolvimento do sistema cinina-caliceína na artrite. Alguns exemplos do envolvimento do sistema cinina-caliceína na artrite envolvem a presença de cininas no fluido sinovial de indivíduos gotosos durante o ataque agudo, a expressão dos receptor B<sub>1</sub> em leucócitos circulantes e leucócitos presentes no fluido sinovial de indivíduos com artrite reumatóide, a eficácia da injeção intra-articular de um antagonista do receptor B<sub>1</sub> em modelo de osteoartrite e ainda, a

ativação do Fator de Hageman dependente de MSU, em fluido sinovial e plasma humano de pacientes com gota (EISEN, 1966; KELLERMEYER, 1967; MELMON et al., 1967; COUTURE et al., 2001; CASSIM et al., 2009; KAUFMAN et al., 2011). Entretanto, nenhum estudo realmente esclarece o papel do receptor B<sub>1</sub> na gota.

Portanto, após a confirmação da indução da dor e do edema pela injeção IA de MSU, nós verificamos que tanto o antagonismo farmacológico, quanto a deleção gênica do receptor B<sub>1</sub>, foram capazes de prevenir a dor e o edema induzidos pela administração IA de MSU. Ressaltamos aqui que foram testados dois antagonistas do receptor B<sub>1</sub>, um peptídico, des-Arg<sup>9</sup>-bradicinina, e outro não-peptídico, SSR240612, e o padrão de resposta de ambos foi similar em relação aos seus efeitos antinociceptivos e antiedematogênicos, fortalecendo a hipótese do envolvimento do receptor B<sub>1</sub> para cininas na gota. Uma vez que os efeitos antinociceptivos do antagonista não peptídico, SSR240612, foram mais duradouros se comparados aos efeitos do antagonista peptídico, deu-se continuidade aos estudos somente com o antagonista não peptídico. Os efeitos antinociceptivo e antiedematogênico mediados pelo antagonista do receptor B<sub>1</sub> são relevantes levando-se em consideração a importância da dor e do edema como sintomas clássicos da inflamação que ocorre durante o ataque agudo de gota. Além disso, estes resultados apontam a administração local de antagonistas seletivos dos receptores B<sub>1</sub> como uma nova ferramenta para se combater a inflamação durante o ataque agudo de gota, uma vez que medicamentos intra-articulares já são utilizados para tratar certos casos de gota (TERKELTAUB, 2010).

Clinicamente, além da dor e do edema, a resposta inflamatória iniciada pela deposição dos cristais de MSU nos espaços intra- e peri-articulares é caracterizada ainda por outros parâmetros inflamatórios como intensa infiltração celular na articulação afetada, em especial de neutrófilos (MATSUKAWA et al., 1998; MARTINON et al., 2006; TORRES et al., 2009; NEOGI, 2011).

Analizamos os efeitos do antagonismo do receptor B<sub>1</sub> em outros parâmetros inflamatórios e pudemos verificar que ocorre um aumento significativo da concentração de proteínas na articulação dos animais submetidos a injeção intra-articular de MSU em comparação aos animais injetados apenas com o veículo. Ainda, a injeção do SSR240612 foi capaz de prevenir este aumento. A inflamação é iniciada com a liberação de substâncias vasoativas levando a dilatação dos pequenos vasos locais. Esta vasodilatação é precedida de uma constrição

passageira que é fugaz e sem maiores conseqüências. Além de determinar a vasodilatação, os mediadores químicos podem modificar o revestimento endotelial provocando um aumento da permeabilidade capilar. As células endoteliais se contraem, abrindo as junções intercelulares e a permeabilidade vascular aumenta permitindo a saída de macromoléculas (ROBBINS e COTRAN, 2005). Esta poderia ser uma das maneiras de prover a entrada de substratos e enzimas formadoras de cininas no local da inflamação (AHLUWALIA e PERRETI, 1996; CASSIM et al., 2009).

Foi observado ainda que o antagonismo do receptor B<sub>1</sub> é capaz de prevenir o aumento no número total de leucócitos e da atividade da enzima mieloperoxidase induzidos pelo MSU. Interessantemente, quando avaliadas as diferentes populações celulares presentes no infiltrado induzido por MSU, observamos que até 2 horas o infiltrado é composto em sua maioria de células mononucleares, sendo que em 4 h após a injeção de MSU as porcentagens de mono- e polimorfonucleares se igualam e a partir deste tempo aumenta consideravelmente o número de polimorfonucleares, ao passo que diminuem os mononucleares (dados não mostrados). Alguns estudos sugerem que a resposta inflamatória ao MSU seja mediada primeiramente por células residentes, como os sinoviócitos tipo A (tipo macrófagos), e só mais tarde as células que infiltram na articulação passam a ser a maioria (MARTIN e HARPER, 2010). Nossos achados concordam em parte com esta hipótese. Apesar da presença de polimorfonucleares ser significativamente maior nos tempos mais tardios da reação, o antagonismo do receptor B<sub>1</sub> diminui o número total de células sem preferência por uma população em específico, ou seja, ele diminui a presença na articulação tanto de mono- como polimorfonucleares (dados não mostrados). De qualquer forma, a prevenção não apenas do edema, mas também da infiltração celular pelo antagonista B<sub>1</sub> é de grande importância, uma vez que esta é uma das características pontuais da gota, e sugere o envolvimento deste receptor na quimiotaxia frente ao MSU.

Foi observado ainda que o antagonismo do receptor B<sub>1</sub> é capaz de prevenir o aumento no número total de leucócitos e da atividade da enzima mieloperoxidase induzidos pelo MSU. Interessantemente, quando avaliadas as diferentes populações celulares presentes no infiltrado induzido por MSU, observamos que até 2 horas o infiltrado é composto em sua maioria de células mononucleares, sendo que em 4 h após a injeção de MSU as porcentagens de mono- e polimorfonucleares se igualam



e a partir deste tempo aumenta consideravelmente o número de polimorfonucleares, ao passo que diminuem os mononucleares (dados não mostrados). De tal modo, a resposta inflamatória gerada pelo MSU parece envolver a ativação tanto de neutrófilos como de células residentes da articulação ou sinoviócitos tipo A (tipo macrófagos), conforme já foi demonstrado por outros estudos (MARTIN e HARPER, 2010; MALAWISTA, 2011). Nossos achados demonstram ainda que o antagonismo do receptor B<sub>1</sub> diminui o número total de células sem preferência por uma população em específico, ou seja, ele diminui a presença na articulação tanto de mono- como polimorfonucleares (dados não mostrados). A prevenção não apenas do edema, mas também da infiltração celular pelo antagonista B<sub>1</sub> é de grande importância, uma vez que esta é uma das características pontuais da gota, e sugere o envolvimento deste receptor na quimiotaxia frente ao MSU.

A diferença entre os resultados que encontramos aqui e outro estudo demonstrando que o antagonismo do receptor B<sub>1</sub> não foi capaz de prevenir a infiltração celular induzida por MSU pode ser entendida se analisarmos alguns pontos que diferem em nossos estudos (SHAW e HARPER, 2011). O primeiro seria a utilização de diferentes modelos onde SHAW e HARPER (2011) fazem a utilização da injeção intraperitoneal de MSU, ao passo que nós realizamos a injeção intra-articular de MSU. O microambiente celular do peritônio difere bastante da articulação, considerada um ambiente estéril com pequena quantidade de células residentes, ainda mais se comparada ao peritônio. Para elucidar a relevância do sítio da inflamação, é interessante analisar um estudo de nosso grupo onde foi demonstrado que a dor e a inflamação resultantes da injeção intraplantar de MSU envolve a degranulação de mastócitos (HOFFMEISTER et al., 2011). Porém, quando o MSU passa a ser injetado na articulação verificamos que os mastócitos não mais desempenham um papel importante na dor e inflamação (HOFFMEISTER et al., 2014). Adicionalmente, há diferenças entre os tempos de início da infiltração celular, uma vez que Shaw e Harper (2008) observaram um aumento significativo de leucócitos 8 horas após a injeção de MSU, ao passo que nós detectamos uma infiltração celular significativa tão cedo quanto uma hora após a injeção do MSU, o que fortalece a ideia da influência do microambiente na geração da resposta inflamatória. Ainda, o antagonista utilizado no estudo aqui citado se tratava de um antagonista peptídico, o qual pode ter sido degradado ao longo do experimento.

Alguns estudos primeiramente indicaram que o bloqueio do receptor B<sub>1</sub> é capaz de reduzir interações entre os leucócitos e as células endoteliais diminuindo o rolamento, a adesão e a migração de leucócitos (MCLEAN et al., 2000; DUCHENE et al., 2007). Recentemente, um estudo sugeriu que o receptor B<sub>1</sub>, uma vez ativado, seria capaz de regular a expressão da molécula de adesão intercelular (ICAM-1) em células endoteliais, e das integrinas Mac-1 e LFA-1 em neutrófilos, aumentando a adesividade entre estas células, o que facilitaria a aderência e a migração (FIGUEROA et al., 2014). Ainda, sugeriu-se que a ativação do receptor B<sub>1</sub> aumentaria a expressão da molécula de adesão leucócito-endotélio (ELAM) em neutrófilos, e esta molécula facilitaria o processo de rolamento que precede a aderência e migração (FIGUEROA et al., 2014). Nós observamos que o MSU aumenta o rolamento e a aderência de neutrófilos via ativação do receptor B<sub>1</sub>, efeito que pode ser explicado pela interação leucócito-endotélio reguladas pelo receptor. Neste sentido, identificamos que o MSU é capaz de aumentar a expressão da molécula de adesão P-selectina, e que este aumento seria prevenido pelo tratamento com o antagonista não peptídico do receptor B<sub>1</sub>, SSR240612, comprovando a capacidade deste receptor em modular algumas das moléculas responsáveis pelas interações leucócito e endotélio. Todavia, um estudo mais detalhado a respeito destas interações deve ser realizado para o completo entendimento de quais seriam todas as moléculas envolvidas neste processo.

Como citado anteriormente, o processo inflamatório induzido pelo MSU tem como característica marcante o grande infiltrado celular e o aumento significativo dos níveis de IL-1 $\beta$  (DALBETH e HARKARD, 2005; BUSSO e SO, 2010; MITROULIS et al., 2013). Dados da literatura demonstram que a inibição da IL-1 $\beta$  diminui a dor e a inflamação em resposta ao MSU em modelo animal de gota e em humanos, sendo que a citocina está aumentada no fluido sinovial de pacientes com gota e o bloqueio farmacológico da via da IL-1 $\beta$  é uma ferramenta que começa a ser utilizada clinicamente (TORRES et al., 2009; SO et al., 2007; CRONSTEIN e SUNKUREDDI, 2013). Interessantemente, o receptor B<sub>1</sub> para cininas exerce um papel chave no recrutamento de leucócitos, incluindo o recrutamento ocorrido em resposta a liberação da IL-1 $\beta$ , que por sua vez é capaz de modular a expressão do receptor B<sub>1</sub> (MCLEAN et al., 2000; DUCHENE et al., 2007). Neste contexto, observamos que houve um aumento de IL-1 $\beta$  no lavado sinovial dos animais injetados com MSU, e que este aumento foi significativamente prevenido pelo

antagonismo seletivo do receptor B<sub>1</sub>, sugerindo que possa estar ocorrendo alguma regulação entre os dois neste modelo.

Após identificarmos que o receptor B<sub>1</sub> medeia as respostas inflamatórias resultantes da injeção de MSU, acreditamos ser importante a elucidação de mais componentes desta cascata de eventos. Assim, nosso próximo passo foi investigar como estaria a atividade da enzima cininase I e a formação de agonistas do receptor no ambiente sinovial. Verificamos que o inibidor enzimático Mergepta previniu a dor e o edema induzidos pelo MSU, e demonstramos que a atividade da enzima cininase I e os níveis de des-Arg<sup>9</sup>-bradicinina estavam aumentados no fluido sinovial após a injeção IA de MSU. Estes resultados estão de acordo com estudos que demonstraram o aumento da atividade desta enzima em fluido sinovial de um paciente durante o ataque agudo de gota, e outros que observaram aumento de cininas em diferentes tipos de artrites, incluindo a gota (MELMON et al., 1967; CHERCUITE et al., 1987; CASSIM et al., 2002). Ainda, o aumento da atividade da enzima pode ser interpretado como um indicativo da formação do agonista do receptor B<sub>1</sub>, des-Arg<sup>9</sup>-bradicinina.

A identificação de moléculas que sustentem a ativação do receptor é importante, assim como a comprovação da presença do próprio receptor no sítio da inflamação, principalmente considerando as características induzíveis de expressão deste receptor. Alguns estudos já sugeriram, porém sem comprovação experimental, a presença do receptor B<sub>1</sub> nas articulações após verificarem que a administração de agonistas e antagonistas do receptor foram capazes de modular respostas inflamatórias e nociceptivas em diferentes modelos de artrite (CRUWYS et al., 1994; KAUFMAN et al., 2011). Adicionalmente, há estudos que observaram a expressão do receptor B<sub>1</sub> em neutrófilos circulantes e no fluido sinovial de pacientes com artrite reumatóide (CASSIM et al., 2009). Neste sentido, demonstramos que há expressão do receptor B<sub>1</sub> para cininas na articulação do tornozelo de animais naive, e que esta expressão é aumentada após a injeção IA de MSU nestes animais. Este achado aponta para a presença do receptor B<sub>1</sub> no local da inflamação e demonstra, pela primeira vez, que sua expressão é alterada em resposta à injeção de MSU.

Pela utilização de uma técnica de marcação retrógrada de neurônios sensoriais em fibras aferentes primárias que inervam o tornozelo, foi possível ainda verificar que há expressão do receptor B<sub>1</sub> em neurônios cujo corpo celular está presente nos gânglios das raízes dorsais das lâminas 3, 4 e 5, ispi-laterais ao local

da injeção. A expressão do receptor  $B_1$  se dá de maneira similar em todos os gânglios analisados, sendo que o maior número de receptores foi localizado em neurônios cujo corpo celular é considerado como sendo de pequeno ou médio diâmetro. Esta característica é importante uma vez que os neurônios sensoriais de pequeno e médio diâmetro dão origem a maioria dos nociceptores, incluindo as fibras desmielinizadas e condutoras lentas de estímulos denominadas fibras C, e as fibras A $\delta$  que são pouco mielinizadas e condutoras de estímulos um pouco mais rápidos, reforçando a importância do receptor  $B_1$  para a geração da dor articular (JULIUS E BASBAUM, 2001). A confirmação da expressão dos receptores  $B_1$  para cininas em neurônios sensoriais de fibras que inervam a articulação, onde são encontrados ainda os receptores TRPV1 e TRPA1, aponta para mais um provável mecanismo mediado pelo  $B_1$  neste local. Os receptores TRPV1 e TRPA1 estão envolvidos com o processo inflamatório nociceptivo induzido pelo MSU (HOFFMEISTER et al., 2014; TREVISAN et al., 2014). Portanto, a ativação do receptor  $B_1$  nestes neurônios, através da liberação de  $Ca^{++}$  intracelular, pode levar a sensibilização do receptor TRPV1, que por sua vez, promove influxo de  $Ca^{++}$ , importante para a ativação do TRPA1. A expressão do receptor  $B_1$  já havia sido demonstrada em neurônios de pequeno e médio diâmetro dos gânglios da raiz dorsal de ratos naive, entretanto foi a primeira vez que se demonstrou que parte destes neurônios são advindos de fibras sensoriais que inervam a articulação (MA et al., 2000). Todavia, é importante observar que o receptor  $B_1$  pode ser expresso por diferentes células neuronais e não neuronais encontradas na articulação e estudos mais detalhados devem ser realizados para identificarmos exatamente os locais da expressão deste receptor encontrado na articulação.

Os resultados discutidos até o momento indicam claramente que o receptor  $B_1$  medeia os efeitos inflamatórios decorrentes da injeção IA de MSU. Além disso, o receptor  $B_1$  está envolvido em outros efeitos do organismo, como os efeitos cardioprotetores induzidos pelo tratamento com inibidores da enzima conversora de angiotensina (iECA). Como abordado anteriormente, CHOI et al. (2012) demonstraram que há uma correlação positiva entre o risco de desenvolver um ataque agudo de gota e o uso de alguns anti-hipertensivos, entre eles os iECA (CHOI et al., 2012). Este cenário apontava o receptor  $B_1$  como um possível mediador destes efeitos facilitadores de um ataque de gota por parte dos iECA.

Desta forma, utilizamos uma baixa dose de MSU (0.0125 mg/articulação), que por si só não foi capaz de induzir dor ou edema, e verificamos que, quando administrada em animais pré-tratados com iECA esta mesma dose passava então a causar nocicepção e edema. O tratamento com o iECA facilitou a ocorrência dos eventos característicos do ataque agudo de gota por mecanismos que envolvem a ativação do receptor B<sub>1</sub>. Estudos propõem que inibidores da ECA, como o enalapril, são capazes de promover a ativação direta dos receptores B<sub>1</sub> para cininas, agindo como agonistas alostéricos do receptor (IGNJATOVIC et al., 2002; STANISAVLJEVIC et al., 2006). Ainda, a inibição da ECA parece causar um aumento na sinalização via receptor B<sub>1</sub> por facilitar a formação de agonistas do receptor via atividade da cininase I. De fato, foi observado um aumento dos níveis de des-Arg<sup>9</sup>-bradicinina na articulação destes animais, assim como da enzima formadora, a cininase I.

É necessário se ter em mente que milhões de indivíduos fazem uso de inibidores da ECA para o tratamento da hipertensão, falência congestiva cardíaca e problemas renais (ERDOS et al., 2010). Se analisarmos este fato associado à ocorrência de diversas comorbidades em indivíduos gotosos, onde cerca de 78% possui ainda hipertensão, o que corresponde a 6,1 milhões de pessoas apenas nos Estados Unidos, percebemos a importância de nossos achados. Desta forma, o uso de iECA deve ser feito com certa cautela em indivíduos gotosos, pois além dos efeitos cardíacos benéficos destes medicamentos, eles podem, por outro lado, facilitar a ocorrência de um ataque agudo de gota.

---

## **5. CONCLUSÕES**

## 5. Conclusões

Tendo em vista os resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que:

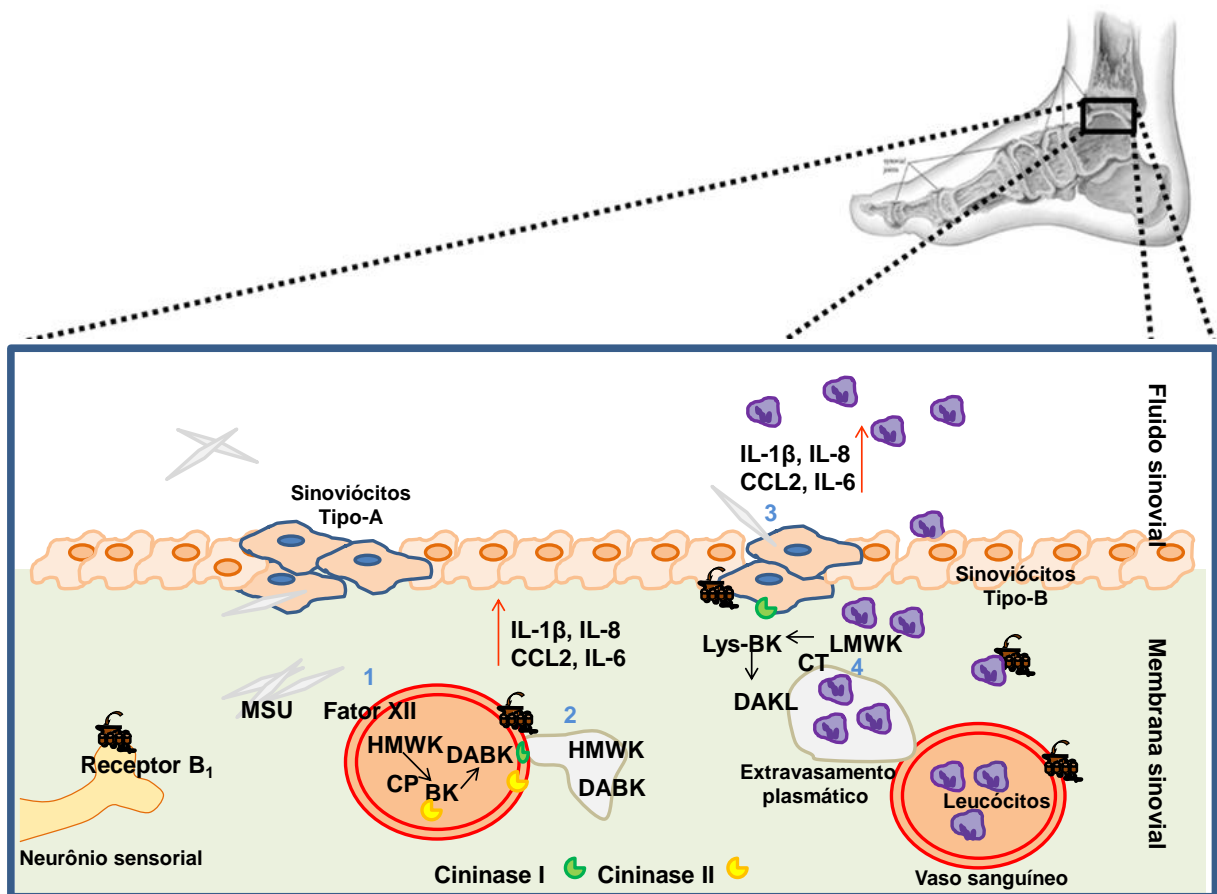
▶ O receptor  $B_1$  para cininas está envolvido em diferentes respostas inflamatórias (dor, edema, extravasamento plasmático, infiltração leucocitária e aumento da IL-1 $\beta$ ) induzidas pela administração intra-articular de MSU, sugerindo um importante papel deste receptor na gota;

▶ O receptor  $B_1$  para cininas está expresso na articulação de animais naive e esta expressão é aumentada com a injeção intra-articular de MSU, demonstrando que o receptor pode estar presente no sítio da inflamação na gota. Um dos locais de expressão do receptor é o neurônio sensorial que inerva esta articulação, porém mais células não neuronais podem ainda expressar este receptor;

▶ A inibição da enzima conversora de angiotensina facilita a ocorrência de respostas nociceptivas e inflamatórias em animais que receberam uma baixa dose de MSU, que por si só não apresenta efeitos, indicando a necessidade de cautela quando da prescrição de inibidores da ECA em indivíduos gotosos;

▶ O receptor  $B_1$  para cininas está envolvido na facilitação da ocorrência de respostas nociceptivas e inflamatórias induzidas pelo inibidor da enzima conversora de angiotensina em animais injetados com uma baixa dose de MSU, que por si só não apresenta efeitos, demonstrando que apesar de estar envolvido nos efeitos cardioprotetores da inibição da enzima, na gota, o receptor tem um importante papel pró-inflamatório iniciado por esta inibição;

Logo, o antagonismo dos receptores  $B_1$  poderia ser um alvo interessante para o desenvolvimento de novas terapias para o tratamento da inflamação durante o ataque agudo de gota, assim como o desenvolvimento de terapias associadas ao uso de inibidores da enzima conversora de angiotensina.



**Abreviaturas:** MSU (cristais de urato monossódico), Fator XII (fator de Hageman ou fator XII do sistema complemento), CP (calicreína plasmática), CT (calicreína tecidual), BK (bradicinina), DABK (des-Arg<sup>9</sup>-bradicinina), HMWK (cininogênio de alto peso molecular), LMWK (cininogênio de baixo peso molecular), IL-1 $\beta$  (interleucina 1 $\beta$ ), IL-8 (interleucina 8), CCL2 (proteína quimioatrativa para monócitos 2), IL-6 (interleucina 6)

**Figura 3 – Proposta para a participação do receptor B<sub>1</sub> nos mecanismos envolvidos na dor e inflamação induzidos pela administração intra-articular de cristais de MSU em roedores.** Inicialmente os cristais de MSU se depositam no ambiente articular (articulação tíbio-tarsal) podendo então ocorrer a ativação do sistema complemento e formação intravascular de cininas por ação da calicreína plasmática (1). Tanto as cininas, como os componentes do sistema das cininas, podem ser liberados durante o extravasamento plasmático (2). Os cristais podem ainda ser fagocitados pelos sinoviócitos (tipo macrófago - tipo A) que também apresentam alguns componentes do sistema cinina-calicreína como calicreína tecidual e enzima cininase I, podendo contribuir para a formação de cininas (3). Além disso, podem ser geradas cininas pela ação da calicreína tecidual liberada por neutrófilos que infiltram na articulação durante o processo inflamatório (4). Em uma situação onde a enzima conversora de angiotensina esteja inibida, a BK pode ser utilizada como substrato para a formação de DABK. As cininas geradas podem agir



ativando os receptores B<sub>1</sub> expressos nas células endoteliais regulando a expressão de moléculas de adesão, favorecendo o recrutamento e infiltração de leucócitos. Ainda, podem ser ativados receptores B<sub>1</sub> expressos diretamente nos neurônios sensoriais, nas células residentes (sinoviócitos tipo macrófagos) e leucócitos que infiltram na articulação. A ativação dos receptores B<sub>1</sub> pode atuar na regulação da liberação de diferentes citocinas, amplificando a resposta inflamatória.

---

## **6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 6. Referências Bibliográficas

ADAMS F. Hippocrates: The Genuine Works of Hippocrates, vol I and II. Adams F. New York: Wood; 1886.

AHLUWALIA A, PERRETTI M. Involvement of bradykinin B1 receptors in the polymorphonuclear leukocyte accumulation induced by IL-1 beta in vivo in the mouse. **J Immunol.** 1996. 156:269-74.

ÁLVAREZ-LARIO B, MACARRÓN-VICENTE J. Uric acid and evolution. **Rheumatology.** v. 49, p. 2010-2015. 2010.

ANNEMANS L. et al. Gout in the UK and Germany: prevalence, comorbidities and management in general practice 2000 – 2005. **Ann Rheum Dis.** v. 67, p. 960–966. 2008.

BASBAUM A. I. et al. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell.** v. 139, p. 267-284. 2009.

BASCANDS JL. et al. Bradykinin receptors: towards new pathophysiological roles. **Med Sci.** 2003. 19, p. 1093-1100. 2003.

BEAUBIEN G. et al. Gene structure and chromosomal localization of plasma kallikrein. **Biochemistry.** v. 30, p. 1628-35. 1991.

BECKER MA. et al. Quality of life and disability in patients with treatment-failure gout. **J rheumatol.** v. 36, p. 1041-8. 2009.

BENEDEK TG. History of rheumatic diseases. Primer on the rheumatic diseases. Atlanta, arthritis foundation: JH Klippel. v. 11, p. 1–5. 1997.

BENNETT GJ. What is spontaneous pain and who has it? **J Pain.** v. 13, p. 921-9. 2012.

BHoola KD, Figueroa CD, Worthy K. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. **Pharmacol Rev.** v. 44, p. 1-44. 1992.

BLAUKAT A. Structure and signalling pathways of kinin receptors. **Andrologia.** v. 35, p. 17-23. 2003.

BUCHANAN, W.W.; Daqueker, J. History of Rheumatic Diseases, 3rd ed. Edinburgh: Mosby, 2003. Pg 1-8.

BUSSO N, SO A. Mechanisms of inflammation in gout. **Arthritis Res Ther.** v. 12, p. 206. 2012.

CAMPBELL DJ. The renin-angiotensin and the kallikrein-kinin systems. **Int J Biochem Cell Biol.** v. 35, p. 784-91. 2003.

CASSIM B, Mody G, Bhoola K. Kallikrein cascade and cytokines in inflamed joints. **Pharmacol Ther.** v. 94, p. 1-34. 2002.

CASSIM B. et al. Kallikreins, kininogens and kinin receptors on circulating and synovial fluid neutrophils: role in kinin generation in rheumatoid arthritis. **Rheumatology.** v. 48, p. 490-6. 2009.

CHAPMAN PT. et al. Endothelial activation in monosodium urate monohydrate crystal-induced inflammation: in vitro and in vivo studies on the roles of tumor necrosis factor  $\alpha$  and interleukin-1. **Arthritis Rheum.** v. 40, p. 955–965. 1997.

CHERCUITTE F. et al. Carboxypeptidase N (kininase I) activity in blood and synovial fluid from patients with arthritis. **Life Sci.** v. 41, p. 1225-32. 1987.

CHOHAN S. Safety and efficacy of febuxostat treatment in subjects with gout and severe allopurinol adverse reactions. **J Rheumatol.** v. 38, p. 1957-9. 2011.

CHOI HK, Mount DB, Reginato AM. American College of Physicians, American Physiological Society, Pathogenesis of gout. **Ann Intern Med.** v. 143, p. 499-516. 2005a.

CHOI HK. et al. Antihypertensive drugs and risk of incident gout among patients with hypertension: population based case-control study. **Br. Med. J.** v. 344, p. d8190. 2012.

COPEMAN WSC. A Short History of the Gout and the Rheumatic Diseases. Los Angeles, CA: University of California Press. 1964.

COSTEROUSSE O. et al. Angiotensin converting enzyme (kininase II). Molecular and physiological aspects. **C R Seances Soc Biol Fil.** v. 186, p. 586-98. 1992.

COUTURE R. et al. Kinin receptors in pain and inflammation. **Eur J Pharmacol.** v. 429, p. 161-76. 2001.

CRITTENDEN DB, Pillinger MH. New therapies for gout. **Annu Rev Med.** v. 64, p. 325-37. 2013.

CRONSTEIN BN, Sunkureddi P. Mechanistic aspects of inflammation and clinical management of inflammation in acute gouty arthritis. **J Clin Rheumatol.** v. 19, p. 19-29. 2013.

CRUWYS SC. et al. The role of bradykinin B1 receptors in the maintenance of intra-articular plasma extravasation in chronic antigen-induced arthritis. **Br J Pharmacol.** v. 113, p. 940-4. 1994.

DALBETH N, HASKARD DO. Mechanisms of inflammation in gout. **Rheumatology.** v. 44, p. 1090-6. 2005.

DALBETH N, LINDSAY K. The patient's experience of gout: new insights to optimize management. **Curr Rheumatol Rep.** v. 14, p. 173-8. 2012.

DAMAS J, Remacle-Volon G, Adam A. Inflammation in the rat paw due to urate crystals. Involvement of the kinin system. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.** v. 325, p. 76-9. 1984.

DAMAS J, REMACLE-VOLON G. Influence of a long-acting bradykinin antagonist, Hoe 140, on some acute inflammatory reactions in the rat. **Eur J Pharmacol.** v. 211, p. 81-6. 1992.

DEDDISH PA. et al. Differences in the hydrolysis of enkephalin congeners by the two domains of angiotensin converting enzyme. **Biochem Pharmacol.** v. 53, p. 1459-63. 1997.

DUCHENE J. et al. A novel inflammatory pathway involved in leukocyte recruitment: role for the kinin B1 receptor and the chemokine CXCL5. **J Immunol.** v. 179, p. 4849-56. 2007.

DUNÉR T. et al. Cloning, structural characterization and functional expression of a zebrafish bradykinin B2-related receptor. **Biochem J.** v.364, p. 817-24. 2002.

EHRENFELD P. et al. Activation of kinin B1 receptors induces chemotaxis of human neutrophils. **J Leukoc Biol.** v. 80, p. 117-24. 2006.

EISEN V. Urates and kinin formation in synovial fluid. **Proc R Soc Med.** v. 59, p. 302-7. 1966.

ENQUIST J. et al. Kinins promote B2 receptor endocytosis and delay constitutive B1 receptor endocytosis. **Mol Pharmacol.** v. 71, p. 494-507. 2007.

ENQUIST J. et al. Kinin-Stimulated B1 Receptor Signaling Depends on Receptor Endocytosis Whereas B2 Receptor Signaling Does Not. **Neurochem Res.** v. 39, p. 1037-47. 2014.

ERDOS EG, Tan F, Skidgel RA. Angiotensin I–Converting Enzyme Inhibitors Are Allosteric Enhancers of Kinin B1 and B2 Receptor Function. **Hypertension.** v. 55, p. 214-220. 2010.

FAIRES JS, MCCARTY JRDJ. Acute arthritis in man and dog after intrasynovial injection of sodium urate crystals. **Lancet.** v. 2, p. 682–685. 1962.

FEIG DI, Kang DH, Johnson RJ. Uric acid and cardiovascular risk. **N. Engl. J. Med.** v. 359, p. 1811–1821. 2008.

FERREIRA J. et al. Evidence for the participation of kinins in Freund's adjuvant-induced inflammatory and nociceptive responses in kinin B1 and B2 receptor knockout mice. **Neuropharmacology.** v. 41, p. 1006-12. 2001.

FERREIRA J. et al. Reduced nerve injury-induced neuropathic pain in kinin B1 receptor knock-out mice. **J. Neurosci.** v. 25, p. 2405e2412. 2005.

FIGUEROA CD. et al. Kinin B1 receptor regulates interactions between neutrophils and endothelial cells by modulating the levels of Mac-1, LFA-1 and intercellular adhesion molecule-1. **Innate Immun.** 2014 Apr 11. [Epub ahead of print]

FOX A. et al. Regulation and function of spinal and peripheral neuronal b1 bradykinin receptors in inflammatory mechanical hyperalgesia. **Pain.** 2003. 104:683–691. 2003.

GARROD AB: The Nature and Treatment of Gout and Rheumatic Gout. London: Walton and Maberly; 1859.

GINSBERG MH. et al. Urate crystal--dependent cleavage of Hageman factor in human plasma and synovial fluid. **J Lab Clin Med.** v. 95, p. 497-506. 1980.

GUIMARÃES JA. et al. Kinin-converting aminopeptidase from humn serum. **Biochem. Pharmacol.** v. 22, p. 3157-3172. 1973.

GUTOWSKI S. et al. Antibodies to the alpha q subfamily of guanine nucleotide-binding regulatory protein alpha subunits attenuate activation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis by hormones. **J Biol Chem.** v. 266, p. 20519-24.1991.

HARROLD L New developments in gout. Current opinion pharmacology. **Curr Opin Rheumatol.** v. 25, p. 304-9. 2013.

HESS JF. et al. Molecular and pharmacological diversity of the kinin B1 receptor. **Int Immunopharmacol.** v. 2, p. 1747-54. 2002.

HOFFMEISTER C. et al. Participation of the TRPV1 receptor in the development of acute gout attacks. **Rheumatology.** v. 53, p. 240-9. 2014.

HOFFMEISTER C. et al. Role of TRPV1 in nociception and edema induced by monosodium urate crystals in rats. **Pain.** v. 152, p. 1777-88. 2011.

IGNJATOVIC T. et al. Novel mode of action of angiotensin I converting enzyme inhibitors: direct activation of bradykinin B1 receptor. **J Biol Chem.** v. 277, p. 16847-52. 2002.

IWANAGA T. et al. Morphology and functional roles of synoviocytes in the joint. **Arch Histol Cytol.** v. 63, p. 17-31. 2000.

JOSHI VR. Rheumatology, Past, Present and Future. **J Assoc Physicians India.** v. 60, p. 21-24. 2012.

KANG DS. et al. Spontaneous formation of a proteolytic B1 and B2 bradykinin receptor complex with enhanced signaling capacity. **J Biol Chem.** v. 279, p. 22102-7. 2004.

KAPLAN AP, Joseph K, Silverberg M. Pathways for bradykinin formation and inflammatory disease. **J Allergy Clin Immunol.** v. 109, p. 195-209. 2012.

KAPLAN AP, SILVERBERG M. The coagulation-kinin pathway of human plasma. **Blood.** v. 70, p. 1-15. 1987.

KASHUBA E. et al. The kinin-kallikrein system: physiological roles, pathophysiology and its relationship to cancer biomarkers. **Biomarkers.** v. 18, p. 279-96. 2013

KAUFMAN GN. et al. Nociceptive tolerance is improved by bradykinin receptor B1 antagonism and joint morphology is protected by both endothelin type A and bradykinin receptor B1 antagonism in a surgical model of osteoarthritis. **Arthritis Res Ther.** v. 13, p. R76. 2011.

KEENAN RT. et al. Prevalence of contraindications and prescription of pharmacologic therapies for gout. **Am J Med.** v. 124, p. 155-163. 2011.

KEITH MP, GILLILAND WR. Updates in the Management of Gout. **Am. J. Med.** v. 120, p. 221-224. 2007.

KELLERMEYER RW. Activation of Hageman factor by sodium urate crystals. **Arthritis Rheum.** v. 8, p. 741-3. 1965.

KELLERMEYER RW. Inflammatory process in acute gouty arthritis. Vascular permeability-enhancing activity in normal human synovial fluid; induction by Hageman factor activators; and inhibition by Hageman factor antiserum. **J Lab Clin Med.** v. 70, p. 372-83. 1967.

KHANNA D. et al. 2012 American College of Rheumatology guidelines for management of gout. Part 1: systematic nonpharmacologic and pharmacologic therapeutic approaches to hyperuricemia. **Arthritis Care Res.** v. 64, p. 1431-46. 2012.

KHUN CG. Galen. Claudii Galeni Opera Omni. Germany: Leipzig. p1821–1833. 1964.

KUTZING MK, FIRESTEIN BL. Altered uric acid levels and disease states. **J Pharmacol Exp Ther.** v. 324, p. 1–7. 2008.

LANDIS RC, HASKARD DO. Pathogenesis of crystal-induced inflammation. **Curr Rheumatol Rep.** v. 3, p. 36-41. 2001.

LEE SJ, TERKELTAUB RA. New developments in clinically relevant mechanisms and treatment of hyperuricemia. **Curr Rheumatol Rep.** v. 8, p. 224-30. 2006.

LEEB-LUNDBERG LM. et al. International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. **Pharmacol Rev.** v. 57, p. 27-77. 2005.

LOESER JD, TREEDE RD. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain.** v. 137, p. 473-477. 2008.

MA Q.-P, HEAVENS R. Basal expression of bradykinin B(1) receptor in the spinal cord in humans and rats. **Neuroreport.** v. 12, p. 2311–2314. 2001.

MA Q.-P, Hill R, Sirinathsinghi D. Basal expression of bradykinin B(1) receptor in peripheral sensory ganglia in the rat. **Neuroreport.** 2000. 11:4003–4005.

MA Q.-P. The expression of bradykinin B1 receptors on primary sensory neurones that give rise to small calibre sciatic nerve fibres in rats. **Neuroscience.** 2001. 107:665–673.

MACNEIL T. et al. Cloning and pharmacological characterization of a rabbit bradykinin B receptor. **Biochim Biophys Acta.** v. 126, p. 223-228. 1995.

MALAWISTA SE, de Boisleury AC, Naccache PH. Inflammatory gout: observations over a half-century. **FASEB J.** v. 25, p. 4073-8. 2011.

MANDELL BF. Clinical manifestations of hyperuricemia and gout. **Cleve Clin J Med.** v. 75 Suppl 5:S5-8. 2008.

MANDLE RJ, Colman RW, Kaplan AP. Identification of prekallikrein and high-molecular-weight kininogen as a complex in human plasma. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 73, p. 4179-83. 1976.

MARCEAU F, REGOLI D. Bradykinin receptor ligands: therapeutic perspectives. **Nat Rev Drug Discov.** v. 3, p. 845-52. 2004.

MARCEAU F. et al. Kinin receptors: functional aspects. **Int Immunopharmacol.** v. 2, p. 1729-39. 2002.

MARTIN WJ, HARPER JL. Innate inflammation and resolution in acute gout. **Immunol Cell Biol.** v. 88, p. 15-9. 2010.

MARTIN WJ. et al. Differences in MSU-induced superoxide responses by neutrophils from gout subjects compared to healthy controls and a role for environmental inflammatory cytokines and hyperuricemia in neutrophil function and survival. **J Rheumatol.** v. 37, p. 1228-35. 2010.

MARTINON F, GLIMCHER LH. Gout: new insights into an old disease. **J Clin Invest.** v. 116, p. 2073-5. 2006.

MARTINON F. Mechanisms of uric acid crystal-mediated autoinflammation. **Immunol Rev.** v. 233, p. 218-32. 2010.



MATSUKAWA A, YOSHINAGA M. Sequential generation of cytokines during the initiative phase of inflammation, with reference to neutrophils. **Inflamm Res.** v. 47(Suppl 3):S137–S144. 1998.

MCCARTY DJ Jr, Kohn NN, Faires JS. The significance of calcium phosphate crystals in the synovial fluid of arthritic patients: the 'pseudogout syndrome'. I. Clinical aspects. **Ann Intern Med.** v. 56, p. 711-737. 1962.

MCCARTY DJ, Hollander JL. Identification of urate crystals in gouty synovial fluid. **Ann Intern Med.** v. 54, p. 452-460. 1961.

MCDOUGALL JJ. arthritis and pain: neurogenic origin of joint pain. **Arthritis Res Ther.** v. 8, p. 220. 2006

MCEACHERN AE. et al. Expression cloning of a rat B2 bradykinin receptor. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 88, p. 7724-8. 1991.

MCLEAN PG, A Ahluwalia, Perretti M. Association between kinin B1 receptor expression and leukocyte trafficking across mouse mesenteric post -capillary venules. **J. Exp. Med.** v. 192, p. 367–380. 2000.

MELMON KL. et al. The presence of a kinin in inflammatory Synovial Effusion from Arthritides of Varying Etiologies. **Arthritis Rheum.** v. 10, p. 13-20. 1967.

MENKE JG. et al. Expression cloning of a human B1 bradykinin receptor. **J Biol Chem.** v. 269, p. 21583–21586. 1994.

MITROULIS I, Kambas K, Ritis K. Neutrophils, IL-1 $\beta$ , and gout: is there a link? **Semin Immunopathol.** v. 35, p. 501-12. 2013.

MOREAU ME. et al. The kallikrein-kinin system: current and future pharmacological targets. **J Pharmacol Sci.** v. 99, p. 6-38. 2005.

MORI K, Sakamoto W, Nagasawa S. Studies on human high molecular weight (HMW) kininogen. III. Cleavage of HMW kininogen by the action of human salivary kallikrein. **J Biochem** v. 90, p. 503-9. 1981

MORISSETTE G, MARCEAU F. Molecular identification and pharmacological profile of the bovine kinin B1 receptor. **Biol Chem.** v. 387, p. 211-5. 2006.

MURRAY SR. et al. Kallikrein multigene families and the regulation of their expression. **J Cardiovasc Pharmacol.** v. 15, S7-S15. 1990.

NEOGI T. Clinical practice. Gout. **N Engl J Med.** v. 364, p. 443-52. 2011.

NG G. et al. Receptor-independent, direct membrane binding leads to cell-surface lipid sorting and Syk kinase activation in dendritic cells. **Immunity.** v. 29, p. 807-18. 2008.

NI A. et al. Molecular cloning and expression of rat bradykinin B1 receptor. **Biochim Biophys Acta.** v. 1442, p. 177-85. 1998.

NUKI G, SIMKIN PA. A concise history of gout and hyperuricemia and their treatment. **Arthritis Res Ther.** v. 8 Suppl 1:S1. 2006.

PEKIN JR TJ, ZVAIFLER NJ. Hemolytic complement in synovial fluid. **J Clin Invest.** v. 43, p. 1372–1382. 1964.

PERKINS MN, Campbell E, Dray A. Antinociceptive activity of the bradykinin B1 and B2 receptor antagonists, des-Arg9, [Leu8]-BK and HOE 140, in two models of persistent hyperalgesia in the rat. **Pain.** v. 53, p. 191-7. 1993.

PESQUERO JB, BADER M. Molecular biology of the kallikrein-kinin system: from structure to function. **Braz J Med Biol Res.** v. 31, p. 1197-203. 1998.

PESQUERO JB. et al. Hypoalgesia and altered inflammatory responses in mice lacking kinin B1 receptors. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 97, p. 8140-5. 2000.

PESQUERO JB. et al. Molecular cloning and functional characterization of a mouse bradykinin B1 receptor gene. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 220, p. 219-25. 1996.

POPA-NITA O, NACCACHE PH. Crystal-induced neutrophil activation. **Immunol Cell Biol.** v. 88, p. 32-40. 2010.

RASHID MH. et al. Switching of bradykinin-mediated nociception following partial sciatic nerve injury in mice. **J Pharmacol Exp Ther.** v. 308, p. 1158–1164. 2004.

REGOLI D, Barabé J, Park WK. Receptors for bradykinin in rabbit aortae. **Can J Physiol Pharmacol.** v. 55, p. 855-67. 1977.

REGOLI D, BARABÉ J. Pharmacology of bradykinin and related kinins. **Pharmacol Rev.** v. 32, p. 1-46. 1980.

RICHETTE P, BARDIN T. Gout. **Lancet.** v. 375, p. 318-28. 2010.

ROCK KL, Kataoka H, Lai JJ. Uric acid as a danger signal in gout and its comorbidities. **Nat Rev Rheumatol.** v. 9, p. 13-23. 2013.

RUSSELL IJ. et al. Activation of the fifth component of human complement (C5) induced by monosodium urate crystals: C5 convertase assembly on the crystal surface. **Clin Immunol Immunopathol.** v. 24, p. 239–250. 1982.

SANDÉN C, LEEB-LUNDBERG LM. Kinin B1 receptor homo-oligomerization is required for receptor trafficking to the cell surface. **Int Immunopharmacol.** v. 15, p. 121-8. 2013.

SCANU A. et al. Cytokine levels in human synovial fluid during the different stages of acute gout: role of transforming growth factor  $\beta$ 1 in the resolution phase. **Ann Rheum Dis.** v. 71, p. 621-4. 2012.

SCHAEFFER P. et al. Detection of bradykinin B1 receptors in rat aortic smooth muscle cells. **Biochem Pharmacol.** v. 61, p. 291-8. 2001.

SCHLESINGER N. Anti-interleukin-1 therapy in the management of gout. **Curr Rheumatol Rep.** v. 16, p. 398. 2014.

SCHLESINGER N. Diagnosis of gout. **Minerva Med.** 2007. 98:759-67. 2007.

SCHLESINGER N. Difficult-to-treat gouty arthritis: a disease warranting better management. **Drugs.** v. 71, p. 1413-1439. 2011.

SCHLESINGER N. Treatment of chronic gouty arthritis: it is not just about urate-lowering therapy. **Semin Arthritis Rheum.** v. 42, p. 155-65. 2012.

SCHMAIER AH. The elusive physiologic role of Factor XII. **J Clin Invest.** v. 118, p. 3006-9. 2008.

SCHREMMER-DANNINGER E. et al. Visualisation of tissue kallikrein, kininogen and kinin receptors in human skin following trauma and in dermal diseases. **Biol Chem.** v. 385, p. 1069-76. 2004.

SCHROEDER C, Beug H, Müller-Esterl W. Cloning and functional characterization of the ornithokinin receptor. Recognition of the major kinin receptor antagonist, HOE140, as a full agonist. **J Biol Chem.** v. 272, p. 12475-81. 1997.

SCHRODER K, TSCHOPP J. The inflammasomes. **Cell.** v. 140, p. 821-32. 2010

SCOTT P. et al. Engagement of CD14 mediates the inflammatory potential of monosodium urate crystals. **J Immunol.** v. 177, p. 6370–6378. 2006.

SEABROOK GR. et al. Expression of B1 and B2 bradykinin receptor mRNA and their functional roles in sympathetic ganglia and sensory dorsal root ganglia neurones from wild-type and B2 receptor knockout mice. **Neuropharmacology.** v. 36, p. 1009-17. 1997.

SEEGMILLER JE, MALAWISTA SE. The effect of pretreatment with colchicine on the inflammatory response to microcrystalline urate: a model for gouty inflammation. **Ann Intern Med.** v. 62, p. 648-657. 1965.

SHAW OM, HARPER JL. Bradykinin receptor 2 extends inflammatory cell recruitment in a model of acute gouty arthritis. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 416, p. 266-9. 2011.

SHI Y, Evans JE, Rock KL. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. **Nature.** v. 425, p. 516-21. 2003.

SHOJI A, Yamanaka H, Kamatani N. A retrospective study of the relationship between serum urate level and recurrent attacks of gouty arthritis: Evidence for reduction of recurrent gouty arthritis with antihyperuricemic therapy. **Arthritis Rheum.** v. 51, p. 321-5. 2004.

SHUGHRUE PJ, Ky B, Austin CP. Localization of b1 bradykinin receptor in the primate brain and spinal cord: an in situ hybridization study. **J. Comp. Neurol.** v. 465, p. 372–384. 2003.

SO A, THORENS B. Uric acid transport and disease. **J Clin Invest.** v. 120, p. 1791–1799. 2010.

SO A. et al. A pilot study of IL-1 inhibition by anakinra in acute gout. **Arthritis Res Ther.** v. 9(2):R28. 2007.

STANISAVLJEVIC S. et al. Angiotensin I-converting enzyme inhibitors block protein kinase C epsilon by activating bradykinin B1 receptors in human endothelial cells. **J Pharmacol Exp Ther.** v. 316, p. 1153-8. 2006.

STEIGER S, HARPER JL. Neutrophil cannibalism triggers transforming growth factor  $\beta$ 1 production and self regulation of neutrophil inflammatory function in monosodium urate monohydrate crystal-induced inflammation in mice. **Arthritis Rheum.** v. 65, p. 815-23. 2013.

SUNDY JS. The rheumatology of gout. **Best Pract Res Clin Rheumatol.** v. 24, p. 723-32. 2010.

SYDENHAM T. Tractatus de Podagra et Hydrope. London, England: G Kettilby; 1683.

TANIGUCHI A, KAMATANI N. Control of renal uric acid excretion and gout. **Curr Opin Rheumatol.** v. 20, p. 192-7. 2008.

TAUSCHE AK. et al. Severe gouty arthritis refractory to anti-inflammatory drugs: treatment with anti-tumour necrosis factor alpha as a new therapeutic option. **Ann Rheum Dis.** v. 63, p. 1351-1352. 2004.

TERKELTAUB R, Bushinsky DA, Becker MA. Recent developments in our understanding of the renal basis of hyperuricemia and the development of novel antihyperuricemic therapeutics. **Arthritis Res Ther.** v. 8 Suppl1:S4. 2006.

TERKELTAUB R. et al. Monocyte-derived neutrophil chemotactic factor/interleukin-8 is a potential mediator of crystal-induced inflammation. **Arthritis Rheum.** v. 34, p. 894–903. 1991.

TERKELTAUB R. Gout: fresh insights into an ancient disease. **Science & Medicine.** v. 3, p. 22-31. 1996.

TERKELTAUB R. Update on gout: new therapeutic strategies and options. **Nat Rev Rheumatol.** v. 6, p. 30-8. 2010.

TORRES R. et al. Hyperalgesia, synovitis and multiple biomarkers of inflammation are suppressed by interleukin 1inhibition in a novel animal model of gouty arthritis. **Ann Rheum Dis.** v. 68, p. 1602-8. 2009.

TREVISAN G. et al. TRPA1 receptor stimulation by hydrogen peroxide is critical to trigger hyperalgesia and inflammation in a model of acute gout. **Free Radic Biol Med.** v. 72, p. 200-9. 2014.

VIANA DE QUEIROZ M. Reumatologia Clínica. Lisboa: Lidel. 1996.

WEBSTER ME. et al. Urate crystal induced inflammation in the rat: evidence for the combined actions of kinins, histamine and components of complement. **Immunol Commun.** v. 1, p. 185-98. 1972.

Who Scientific Group. The burden of musculoskeletal conditions at the start of the new millennium. **World health organ tech rep ser.** v. 919, p. 1-218. 2003.

WILLIAMS RJ. Et al. Immunocytochemical analysis o f tissue kallikrein and the kinin moiety in rheumatoid synovial fluid neutrophils. **Br J Rheumatol.** v. 36, p. 420-5. 1997.

WOOLASTON WH. On gouty and urinary concretions. **Philosoph Trans R Soc Lond.** 1787. 87:386-415.

WOOLF AD, Vos T, March L. How to measure the impact of musculoskeletal conditions. **Best pract res clin rheumatol.** v. 24, p. 723-32. 2010.

WOOLF CJ. What is this thing called pain? **J Clin Invest.** v. 120, p. 3742-3744. 2010.

WOTHERSPOON G, WINTER J. Bradykinin B1 receptor is constitutively expressed in the rat sensory nervous system. **Neurosci. Lett.** v. 294, p. 175–178. 2000.

YOUSEF GM, Kishi T, Diamandis EP. Role of kallikrein enzymes in the central nervous system. **Clin Chim Acta.** v. 329, p. 1-8. 2003.

ZHANG X, Tan F, Skidgel RA. Carboxypeptidase M is a positive allosteric modulator of the kinin B1 receptor. **J Biol Chem.** v. 288, p. 33226-40. 2013b.

ZHANG X. et al. Carboxypeptidase M augments kinin B1 receptor signaling by conformational crosstalk and enhances endothelial nitric oxide output. **Biol Chem.** v. 394, p. 335-45. 2013a.

ZHANG X. et al. Characterization of dual agonists for kinin B1 and B2 receptors and their biased activation of B2 receptors. **Cell Signal.** v. 24, p. 1619-31. 2012.

ZHANG X. et al. Cross-talk between carboxypeptidase M and the kinin B1 receptor mediates a new mode of G protein-coupled receptor signaling. **J Biol Chem.** v. 286, p. 18547-61. 2011.

ZYCHOWICZ ME, Pope RS, Graser E. The current state of care in gout: Addressing the need for better understanding of an ancient disease. **J Am Acad Nurse Pract.** v. 1, p. 623-36. 2010.

## APENDICE A – Artigo publicado na revista Journal of Ethnopharmacology, requisito necessário para obtenção do título de doutor

Journal of Ethnopharmacology 145 (2013) 205–213



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Ethnopharmacology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jep](http://www.elsevier.com/locate/jep)



### The antinociceptive and anti-inflammatory effects of the crude extract of *Jatropha isabellei* in a rat gout model

Cássia R. Silva<sup>a</sup>, Janaina K. Fröhlich<sup>b</sup>, Sara M. Oliveira<sup>a</sup>, Thaíssa N. Cabreira<sup>a</sup>, Mateus F. Rossato<sup>a</sup>, Gabriela Trevisan<sup>a</sup>, Amanda L. Froeder<sup>b</sup>, Guilherme V. Bochi<sup>c</sup>, Rafael N. Moresco<sup>c</sup>, Margareth L. Athayde<sup>b,\*\*</sup>, Juliano Ferreira<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Neurotoxicidade e Psicofarmacologia, Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

<sup>b</sup> Laboratório de Fitoquímica, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil

<sup>c</sup> Laboratório de Bioquímica Clínica, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

#### ARTICLE INFO

##### Article history:

Received 2 July 2012

Received in revised form

24 October 2012

Accepted 27 October 2012

Available online 2 November 2012

##### Keywords:

Alkaloid  
Euphorbiaceae  
Urate crystal  
Nociception  
Oedema  
Uric acid

#### ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance: *Jatropha isabellei* Müll Arg. (Euphorbiaceae) is a medicinal plant that has been used in South American folk medicine for the treatment of arthritic diseases, particularly gout. *Aim of the study:* This study was designed to verify the antinociceptive, anti-inflammatory and hypouricemic potential of *Jatropha isabellei*.

*Materials and methods:* Rats were orally administered with the crude extract (100–300 mg/kg) or a fraction that is rich in alkaloids (0.15 mg/kg) of *Jatropha isabellei*. An intra-articular (i.a.) injection of 50 µl of monosodium urate (MSU) crystals (1.25 mg/site) was used to generate the gout model to assess the effect of the treatment on nociception (thermal and mechanical hyperalgesia) and inflammation (oedema and neutrophil infiltration). The effect of *Jatropha isabellei* on the serum levels of uric acid was evaluated in a model of hyperuricaemia induced by the intraperitoneal injection of potassium oxonate (250 mg/kg). The side effects were analysed using an open-field test, gastric lesion assessment and by measuring the levels of the ALT and AST enzymes.

*Results:* Our study demonstrated that the crude extract of *Jatropha isabellei* and a fraction rich in alkaloids were able to prevent the thermal hyperalgesia, mechanical allodynia, oedema and neutrophil infiltration induced by intra-articular MSU injection in rats. On the other hand, treatment with *Jatropha isabellei* did not alter the uric acid levels increased by potassium oxonate in the hyperuricaemia model. In addition, *Jatropha isabellei* did not induce gastric lesions or liver damage and did not alter spontaneous locomotor activity.

*Conclusion:* The crude extract of *Jatropha isabellei* and its fraction rich in alkaloid presents antinociceptive and anti-inflammatory effects in a rat gout model, similar to that observed after treatment with colchicine, supporting the traditional use of this plant in gouty patients.

© 2012 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

#### 1. Introduction

Gout is a metabolic disorder associated with an excess of circulating uric acid resulting in the deposition of monosodium

urate crystals (MSU) in tissues. This hyperuricaemia can occur via uric acid under-excretion or overproduction, and can be readily determined in most patients. A number of reversible factors contribute to increased urate production, including a high-purine diet, obesity and regular alcohol consumption (Bieber and Terkeltaub, 2004; Choi et al., 2004). After formation, the MSU crystals may be deposited in joints, usually in the big toe or ankle, causing neutrophil infiltration, swelling and excruciating pain (Desaulniers et al., 2001). Estimations from the Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III) indicate that 0.5% of the total population has suffered from a gout attack. In addition, gout is currently considered to be the most common form of inflammatory arthritis in men over 40 years old,

\* Corresponding authors at: Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria, Avenida Roraima 1000, Bairro Camobi, Santa Maria, RS, Brazil. Tel.: +55 55 32208053; fax: +55 55 32208031.

\*\* Corresponding authors at: Departamento de Farmácia Industrial, Universidade Federal de Santa Maria, Avenida Roraima 1000, Bairro Camobi, Santa Maria, RS, Brazil. Tel.: +55 55 32208950; fax: +55 55 32208248.

E-mail addresses: [margareth@smail.ufsm.br](mailto:margareth@smail.ufsm.br) (M.L. Athayde), [ferreira99@gmail.com](mailto:ferreira99@gmail.com) (J. Ferreira).

exceeding rheumatoid arthritis (Lawrence et al., 1998; Weaver, 2008).

The options for the treatment of chronic gout are allopurinol, which is an inhibitor of the xanthine oxidase enzyme, probenecide, which is a uricosuric drug that stimulates the renal excretion of uric acid, and non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), such as indomethacin, that inhibit COX enzyme activity (Cronstein and Terkeltaub, 2006; Terkeltaub, 2010). Another drug that has been used to treat gout attacks is colchicine, which is an alkaloid derived from the autumn crocus *Colchicum autumnale* (Roberge et al., 1993). However, approximately 50% of patients are noncompliant with the prescribed medication, especially if they are having recurring gout flares (Gaffo and Saag, 2010). Moreover, each of these agents is associated with risks, potentially severe adverse effects and drug–drug interactions. Thus, many gout patients end up opting for treatments based on folk medicine (Terkeltaub, 2010).

In South American folk medicine, such as Paraguayan and Brazilian traditional medicine, dried slices of the rhizome of *Jatropha isabellei* Müll Arg. (Euphorbiaceae) are empirically used as an infusion or decoction to treat different types of arthritis, especially gout (Basualdo et al., 1995; Pertino et al., 2007). However, until now, there are not scientific pre-clinical studies supporting the traditional use of this plant in gouty patients, neither as analgesic-anti-inflammatory on attacks of gout nor as lowering the increased serum levels of uric acid. Thus, the aim of this work was to confirm the popular use of this plant by assessing the antinociceptive, anti-inflammatory and hypouricemic effects of the crude extract and of a fraction rich in alkaloids obtained from *Jatropha isabellei* in animal models of acute attack of gout and hyperuricaemia.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

The present study was conducted in accordance with the internationally accepted principles for laboratory animal use and care, and all procedures were approved by our Institutional Ethics Committee (process number 94/2010). The number of animals and nociceptive stimuli used were the minimum necessary to demonstrate the consistent effects of drugs treatments. The behavioural evaluation was performed blindly with respect to drug administration. All experiments were performed using adult male Wistar rats weighing 250–300 g. The animals were housed under a controlled temperature ( $22 \pm 1$  °C) on a 12 h light/12 h dark cycle with standard lab chow and water *ad libitum*. The animals were acclimated to the experimental room for at least 1 h before the experiments.

### 2.2. Drugs and reagents

Synthetic monosodium urate (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<sub>2</sub>O 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. The needle-like crystals were recovered and suspended in phosphate-buffered solution (PBS, 10.71 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 6.78 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 120.4 mM NaCl; pH 7.4). Polarised light microscopy was used to confirm that the crystals were rod-shaped and varied in length ( $12 \pm 2$  µm). The preparation was endotoxin-free, as determined by an amebocyte cell lysate assay (Sigma, St Louis, MO, USA).

The crude extract of *Jatropha isabellei* and the fraction rich in alkaloids were prepared in dimethylsulphoxide (DMSO, 5%), polyethylene glycol (PEG, 20%) and PBS, 75% for oral administration (p.o.). Allopurinol and colchicine were purchased from Sigma (USA), dissolved in PBS and administered by oral route. Potassium oxonate was purchased from Sigma (USA) and administered intraperitoneally (i.p.). In addition, 5-(*N,N*-diethylamino)-pentyl-3,4,5-trimethoxybenzoate (TMB), hexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB), xanthine oxidase (XO) from bovine milk and pterine were purchased from Sigma (USA).

Dragendorff's reagent was prepared by dissolving 8 g of bismuth subnitrate in 20 mL of nitric acid 30% (v/v). This solution precipitated approximately 22.8 g of potassium iodide, which was solubilised in a small amount of distilled water. The volume was adjusted to 100 mL and filtered.

Ethyl alcohol, acetone, chloroform, ammonium hydroxide and ethyl ether were purchased from Vetec (Brazil). The Silica Gel 60 F254 coated plates used for thin layer chromatography (TLC) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany).

### 2.3. Plant collection and extraction

To prepare the plant material for animal treatment, the underground parts of *Jatropha isabellei* Müll Arg. were collected in Cacequi (Rio Grande do Sul, Brazil, coordinates: latitude 29°53'01" south and longitude 54°49'30" west) in May of 2008. A exsiccate was archived as a voucher specimen in the herbarium of the Biology Department at UFSM (SMDB 11816). The underground plant parts were dried at room temperature and powdered in a knife mill. The powder was macerated with ethanol (70%) for ten days at room temperature. After filtration, the extract was evaporated under reduced pressure to remove the solvent using a rotary evaporator, resulting in crude extract. This procedure was repeated seven times, and the extracts were combined.

### 2.4. Alkaloid extraction

The crude extract of *Jatropha isabellei* was resuspended in hydrochloric acid (2 N) and washed with ethyl ether three times. The aqueous fraction resulting from the partition was alkalisied with ammonium hydroxide and washed again with ethyl ether three times. The ethereal fraction was dried, resulting in a purified fraction of alkaloids.

The residue from the extraction of alkaloids was dissolved in ethanol and investigated by chromatography. A quantity of 2 µL was placed on plates and eluted with acetone:ammonium

**Table 1**  
Substances characterised by TLC technique.

Mobile phase	Characteristic	Rf
Acetone: ammonium hydroxide (97:3)	254 nm: orange stain	0.82
	365 nm: blue fluorescent stain	0.18
	365 nm: yellow fluorescent	0.12
Chloroform: ethanol ammonium hydroxide (93:6.5:0.5)	254 nm: orange stain	0.59
	365 nm: blue fluorescent stain	0.17
	365 nm: yellow fluorescent stain	0.14



hydroxide (97:3) and chloroform:ethanol:ammonium hydroxide (93:6.5:0.5). The plates were observed under UV light (254 and 365 nm) and sprayed with Dragendorff's reagent. According Wagner et al. (2006), blue and yellow fluorescent stains in 365 nm as well as orange stains in 254 nm and after sprayed with Dragendorff's reagent, are positive results to alkaloids. So, the thin layer chromatography showed the presence of at least three types of alkaloids classes (Table 1).

#### 2.5. Estimation of alkaloids precipitable with Dragendorff's reagent

To evaluate the amount of alkaloids precipitable with Dragendorff's reagent, we used the spectrophotometric method described by Sreevidya and Mehrotra (2003). This method is based on the formation of a yellow bismuth complex in a nitric acid medium with thiourea that corresponds to the amount of alkaloids present in the plant. Briefly, 2 g of the crude extract were solubilised in ethanol and hydrochloric acid (1%) to a concentration of 60 mg/mL, and the pH was maintained at 2–2.5. The extract solution (5 mL) was added to 2 mL of Dragendorff's reagent, and the precipitate that formed was centrifuged (2400 rpm for 30 min). The residue was washed with ethanol then treated with 2 mL of disodium sulfide solution. The brownish-black precipitate that formed was then centrifuged and dissolved in 2 mL of concentrated nitric acid. This solution was diluted to 10 mL in a standard flask with distilled water. A 3% thiourea solution (5 mL) was added to 1 mL of this solution. The absorbance was measured at 435 nm against a blank containing nitric acid and thiourea. The quantification procedure showed the percentage of alkaloids to be 0.048%. The amount of alkaloids present was calculated by the absorbance of the sample and the calibration curve ( $y=2.2783x+0.0361$ ,  $r=0.9996$ ). The crude extract of the underground parts of *Jatropha isabellei* showed and alkaloid content of 0.048%.

#### 2.6. MSU crystals-induced arthritic gout

To investigate the possible antinociceptive effect of *Jatropha isabellei*, we used the arthritic gout model induced by intra-articular injections of MSU according to the method described by Coderre and Wall (1987), with some modifications. Briefly, we injected 50  $\mu$ L of vehicle (PBS) or MSU suspension (1.25 mg/site) to the tibio-tarsal joint (ankle) of isoflurane anesthetised animals. Separate groups of animals received oral administrations of vehicle (PBS), colchicine (30 mg/kg, used as a positive control according Chang, 1975), *Jatropha isabellei* crude extract (100–300 mg/kg) or a fraction rich in alkaloids (0.15 mg/kg) 1 h before the crystal injections. The doses of *Jatropha isabellei* were chosen in pilot experiments and the maximum dose was determined by its maximum solubility. The oedema and nociceptive parameters were observed until finishing the antioedematogenic and antinociceptive effects of the crude extract of *Jatropha isabellei*. For the group treated with the fraction rich in alkaloids the parameters were tested at 2 h after the MSU injections only, because at this time we can observe either antinociceptive effects on mechanical and thermal hyperalgesia as antioedematogenic effects. Myeloperoxidase (MPO) activity was analysed in the ankle tissue 6 h after the crystal injection.

#### 2.7. Nociceptive parameters

##### 2.7.1. Mechanical hyperalgesia

The measurement of the mechanical paw withdrawal threshold (PWT) was carried out using the Up-and-Down paradigm as described previously by Chaplan et al. (1994). Briefly, rats were first acclimatised (1–2 h) in individual clear Plexiglas boxes

(9 × 7 × 11 cm) on an elevated wire mesh platform to allow access to the plantar surface of the hind paws. Von Frey filaments of increasing stiffness (6–100 g) were applied to the rat hind paw plantar surface with enough pressure to bend the filament. The absence of paw lifting after 3 s led to the use of the next filament with increasing stiffness, and paw lifting indicated a positive response and led to the use of the next weakest filament. This paradigm continued until a total of six measurements were taken or until four consecutive positive or four consecutive negative responses had occurred. The 50% mechanical PWT response was then calculated from the resulting scores as described previously by Dixon (1980). The PWT is expressed in grams (g) and was evaluated before and several times after the i.a. injection of MSU. A significant decrease in PWT compared to baseline values was considered as mechanical hyperalgesia.

##### 2.7.2. Thermal hyperalgesia

To measure the paw withdrawal latency (PWL) to radiant heat, the rats were placed on a glass plate surrounded by a clear plastic chamber (Hargreaves et al., 1988). A radiant heat stimulus was applied with a high-intensity projector lamp bulb (60 W) underneath the glass floor, and the withdrawal latency was measured using an electronic timer. The heat stimulus was focused on the plantar surface of each hind paw. The intensity of the heat stimulus was adjusted to obtain an average baseline of approximately 9–12 s in naive rats. A 20-s cut-off was used to prevent tissue damage. This parameter allows for the observation of the development of thermal hyperalgesia, indicating increased pain sensitivity. Only rapid hind paw movements that occurred close to the heat stimulus were counted as withdrawal responses. When rats showed locomotion or rearing, the measurements were stopped until the animal completely settled down.

#### 2.8. Oedema measurement

Oedema formation was assessed as an increase in ankle thickness (in millimeter (mm)) and was measured before and after MSU injection using a digital calliper (Hoffmeister et al., 2011). The results are expressed as the baseline and test value of the ankle thickness.

#### 2.9. Myeloperoxidase (MPO) assay

To assess the neutrophil infiltration in ankle tissue, 6 h after MSU-induced gout, we evaluated the MPO activity according to the method of Suzuki et al. (1983), with some modifications. Vehicle (PBS), colchicine (30 mg/kg, used as a positive control), *Jatropha isabellei* crude extract (300 mg/kg) or a fraction rich in alkaloids (0.15 mg/kg) was administered 1 h before the MSU injections. Six hours after MSU injection, the animals were anesthetised with sodium pentobarbital (100 mg/kg, i.p.) and perfused to avoid blood interference. The animals were then euthanized with CO<sub>2</sub> and the ankle tissue samples were collected and frosted until analysis. The samples were homogenised with 20 volumes of 80 mM sodium acetate buffer (pH 5.4) plus 0.5% HTAB and centrifuged (11,200 × g at 4 °C for 20 min), and the supernatants were collected.

For the evaluation of MPO activity, 10  $\mu$ L of the supernatant were incubated with 200  $\mu$ L of acetate buffer (8 mM, pH 5.4) and 40  $\mu$ L of TMB (18.4 mM) at 37 °C for 3 min. The reaction was stopped with 30  $\mu$ L of acetic acid in a cold bath, and the enzyme activity value was assessed colorimetrically at 630 nm using a microplate reader. The results were expressed as the percent of leukocyte infiltration in comparison to vehicle intra-articular injected animals.

### 2.10. Potassium oxonate-induced hyperuricaemia in rats

To evaluate the existence of an anti-hyperuricemic effect of the *Jatropha isabellei* crude extract, we used an animal model of hyperuricaemia induced by the uricase inhibitor potassium oxonate, as described previously by Nguyen et al. (2005). Briefly, rats were treated with potassium oxonate (250 mg/kg; i.p.) 1 h before the oral administration of vehicle, *Jatropha isabellei* crude extract (300 mg/kg) or the xanthine oxidase inhibitor allopurinol (10 mg/kg, used as a positive control, Nguyen et al., 2005). Blood samples were taken 2 h after the drug administration's (Nguyen et al., 2005) via capillarity from the right eye of anaesthetised (90 mg/kg of ketamine plus 3 mg/kg of xylazine hydrochloride, i.p.) rats. The serum was obtained by centrifuging the blood samples for 10 min at  $1000 \times g$ . The levels of uric acid, urea, and creatinine in the serum were measured using a commercial kit. The results were expressed in mg/dL, and allopurinol was used as the positive control.

### 2.11. Xanthine oxidase assay

This method was realized according Angel et al. (1986) and Liu et al. (2008), with same modifications. Xanthine oxidase (0.5 U/ml) was incubated with pterine (20  $\mu$ M) in the presence and absence of allopurinol (10 mg/mL) or *Jatropha isabellei* crude extract (10–300 mg/mL) at 37 °C for 30 min. Then, the samples were boiled in a water bath at 100 °C for 3 min and centrifuged at  $10,000 \times g$  for 10 min. The supernatant was diluted in sodium acetate buffer (0.1 M, pH 5.5), and the xanthine oxidase activity

was determined by fluorescence at 347 nm for excitation and 405 nm for emission using a spectrofluorometer.

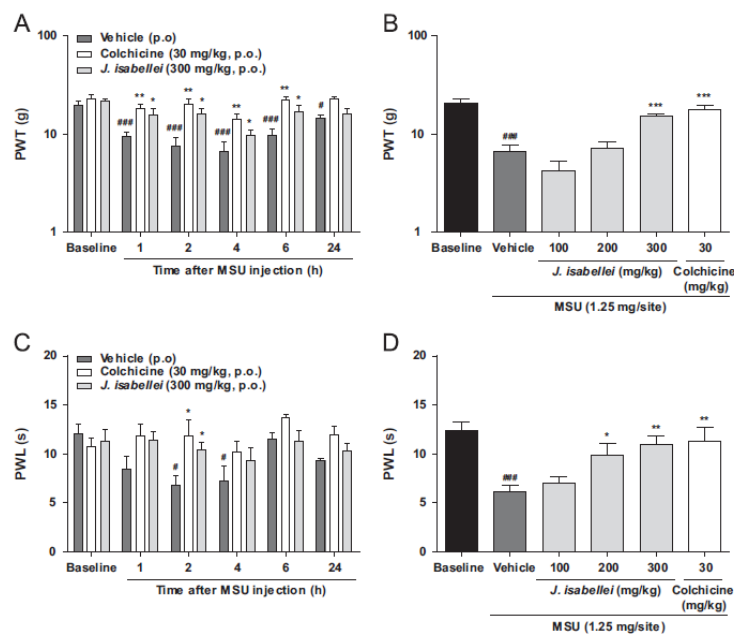
### 2.12. Assessment of side effects

#### 2.12.1. Open-field test

The effect of the *Jatropha isabellei* crude extract (300 mg/kg) or the fraction rich in alkaloids (0.15 mg/kg) on spontaneous locomotor activity and exploratory behaviour was assessed using the open-field test as previously reported by Sauzem et al. (2009). The locomotor activity after drug treatment was compared to the vehicle-treated group. The apparatus was a round arena (57 cm in diameter) with the floor divided into 21 equal areas. The number of areas crossed with all paws and the number of rearing responses were recorded for 5 min beginning 2 h after MSU injections.

#### 2.12.2. Gastric lesion assessment

To evaluate the gastric tolerability of animals after the oral administration of the *Jatropha isabellei* crude extract (300 mg/kg), the fraction rich in alkaloids (0.15 mg/kg) or sodium diclofenac (50 mg/kg, used as a positive control), the animals were treated and euthanized 6 h after the treatments. The stomachs were removed, opened by cutting along the greater curvature and washed with saline at 4 °C. The lesion index was immediately assessed using a magnifying glass. The length (mm) of each lesion was measured, and the lesion index is expressed as the sum of the length of all lesions (Pertino et al., 2007).



**Fig. 1.** The effect of the oral administration of the crude extract of *Jatropha isabellei* or colchicine on the nociception induced by an intra-articular MSU injection (1.25 mg/site). The time course (A) and (C) and dose–response curves (B) and (D) of the antinociceptive effect of *Jatropha isabellei*. For the dose–response curves, the PWT and PWL were obtained 2 h after MSU injections. Each column represent the mean  $\pm$  standard errors of the mean (A) and (B),  $n=7$  to all groups; (C) and (D),  $n=9$  to baseline, vehicle/MSU and Colchicine/MSU;  $n=7$  for *Jatropha isabellei* 100 and 200 mg/kg and  $n=8$  for *Jatropha isabellei* 300 mg/kg). Vertical lines show the SEM. # $P < 0.05$  and \*\*\* $P < 0.001$  represent significant differences compared to the baseline level, and \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$  represent significant differences compared to the vehicle-treated group. The statistical analysis was performed using a one-way ANOVA followed by the Student–Newman–Keuls' test (B and D) or a two-way ANOVA followed by Bonferroni's post-hoc test (A) and (C).

### 2.12.3. Biochemical markers of toxicity

The activities of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) are sensitive indicators of liver, muscle and kidney injury. To biochemically evaluate the occurrence of toxicity, vehicle (PBS), *Jatropha isabellei* crude extract (300 mg/kg) or the fraction rich in alkaloids (0.15 mg/kg) were administered. Six hours after treatment, the animals were euthanized in a CO<sub>2</sub> chamber, and the serum levels of ALT and AST were assessed spectrophotometrically according to the standard procedures provided with the commercially available diagnostic kits (BioClin diagnostics Quibasa Química Básica Ltd., Belo Horizonte, Brazil).

### 2.13. Statistical analysis

All values are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M., except for the ED<sub>50</sub> values (the dose required to elicit 50% of the response relative to the control value) and the ID<sub>50</sub> values (the dose required to elicit 50% of the prevention response relative to the control value), which are given as geometric means accompanied by their respective 95% confidence limits and calculated for the maximal developed responses obtained after the injection of MSU in comparison with vehicle-treated animals. The statistical significance between groups was assessed by Student's *t*-test or a one- or two-way analysis of variance (ANOVA) when appropriate. Post-hoc tests (Student-Newman-Keuls'-SNK for a one-way ANOVA or Bonferroni's test for a two-way ANOVA) were also carried out when appropriate. *P* values lower than 0.05 (*P* < 0.05) were considered to be indicative of significance. The ED<sub>50</sub> and ID<sub>50</sub> values were determined by non-linear regression analysis with a sigmoid dose-response equation using the GraphPad Software 5.0 (Graph Pad, USA).

## 3. Results

### 3.1. The effects of *Jatropha isabellei* crude extract on the nociception and oedema induced by MSU

Animals that received an intra-articular injection of MSU crystals (1.25 mg/site) developed mechanical hyperalgesia, characterised by a significant reduction in the PWT when the von Frey filaments were applied to the injected ankle from 1 up to 24 h (Fig. 1A). The *Jatropha isabellei* crude extract (300 mg/kg, p.o.) prevented the mechanical hyperalgesia induced by MSU from 1 to 6 h after administration, with a complete reversal at 2 h (Fig. 1A). The PWT diminished from 22.6  $\pm$  7.1 g at baseline to 6.8  $\pm$  3.7 g two hours after the MSU injection, and treatment with the *Jatropha isabellei* crude extract (300 mg/kg) prevented this PWT decrease (15.4  $\pm$  4 g) (Fig. 1B). The lower doses of crude extract (100 or 200 mg/kg) did not alter the MSU-induced mechanical hyperalgesia (Fig. 1B). The ED<sub>50</sub> value (and the 95% confidence limits) calculated for the crude extract of *Jatropha isabellei* antinociception was 217 (176–268) mg/kg (Fig. 1B).

Likewise, we also observed the development of thermal hyperalgesia after an intra-articular injection of MSU crystals, indicated by the decrease in the PWL from 2 to 4 h when the injected paw was exposed to radiant heat (PWL diminished from 12.8  $\pm$  5 s at baseline to 6.8  $\pm$  3 s at two hours, and 7.2  $\pm$  3 s at four hours after MSU injection; *P* < 0.001, Fig. 1C). The treatment with the *Jatropha isabellei* crude extract (200 or 300 mg/kg) partially reduced (68  $\pm$  20% of prevention with 300 mg/kg) the thermal hyperalgesia observed 2 h after MSU injection (Fig. 1D). The ED<sub>50</sub> value (and the 95% confidence limits) calculated for the antinociceptive effect of the crude extract of *Jatropha isabellei* was 102 mg/kg (Fig. 1D).

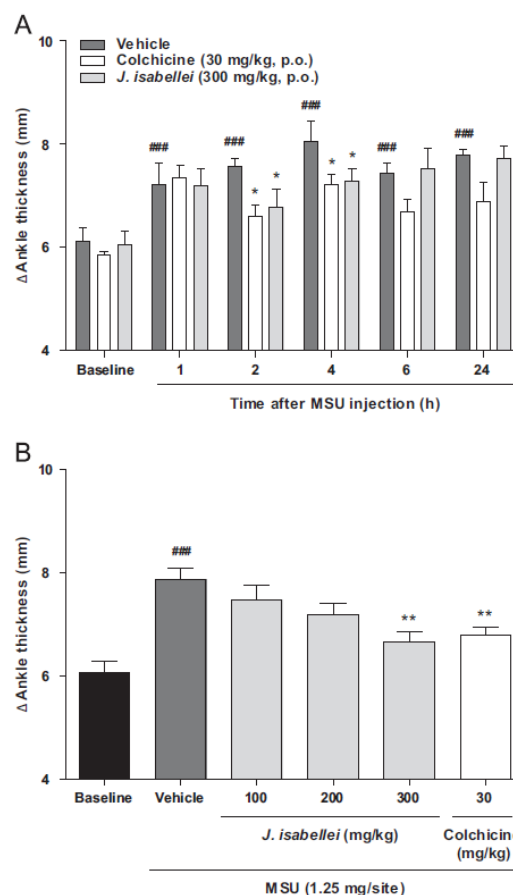


Fig. 2. The effect of the oral administration of the crude extract of *Jatropha isabellei* or colchicine on the ankle oedema induced by an intra-articular MSU injection (1.25 mg/site). The time course (A) and dose-response curve (B) of the antioedematogenic effect of the crude extract of *Jatropha isabellei*. Each column represent the mean  $\pm$  standard errors of the mean (A) *n* = 7 to all groups; (B) *n* = 9 to baseline, vehicle/MSU and Colchicine/MSU; *n* = 7 for *Jatropha isabellei* 100 and 200 mg/kg and *n* = 8 for *Jatropha isabellei* 300 mg/kg. Vertical lines show the SEM. \*\*\**P* < 0.001 represents a significant difference compared to the basal level; \**P* < 0.05 and \*\**P* < 0.01 represent significant differences compared to the vehicle-treated group. The statistical analysis was performed using a two-way ANOVA followed by Bonferroni's test (A) and a one-way ANOVA followed by the Student-Newman-Keuls' test (B).

Similar to the *Jatropha isabellei* crude extract, the alkaloid colchicine (30 mg/kg, p.o., used as a positive control) inhibited both the mechanical and thermal hyperalgesia caused by MSU with 74  $\pm$  21% and 79  $\pm$  14% of prevention, respectively (Fig. 1B and D).

The animals that received an intra-articular injection of MSU crystals (1.25 mg/site) showed an increase in ankle thickness, indicating the development of an oedema that was sustained from 1 to 24 h after MSU injection (ankle thickness increased from 5.6  $\pm$  0.9 mm at baseline to 7.7  $\pm$  0.6 mm 2 h after MSU injection; *P* < 0.001, Fig. 2B). It was observed that the *Jatropha isabellei* crude extract (300 mg/kg, p.o.) was able to partially prevent oedema formation at 2 and 4 h after MSU injection, with 35  $\pm$  8 and 24  $\pm$  3% of prevention, respectively. The lower doses of crude extract (100 or 200 mg/kg) did not alter the MSU-induced

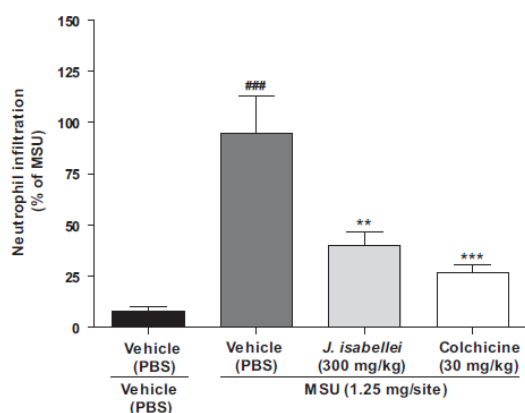


Fig. 3. The effect of the oral administration of the crude extract of *Jatropha isabellei* or colchicine on the neutrophil infiltration induced by an intra-articular MSU injection (1.25 mg/site) analysed 6 h after the MSU injections. Each column represent the mean + standard errors of the mean ( $n=9$  to all groups). Vertical lines show the SEM. ### $P < 0.001$  represents a significant difference compared to the vehicle injected group; \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$  represent significant differences compared to the MSU injected group. The statistical analysis was performed using a one-way ANOVA followed by the Student-Newman-Keuls' test.

oedema. The ED<sub>50</sub> value (and the 95% confidence limits) calculated for the antioedematogenic effect of the crude extract of *Jatropha isabellei* was 223 (149–336) mg/kg (Fig. 2B). The treatment with colchicine (30 mg/kg) prevented oedema formation ( $44 \pm 14\%$ ) 2 h after the MSU injections.

Furthermore, the *Jatropha isabellei* crude extract (300 mg/kg) did not alter PWT, PWL or ankle thickness when orally administered to animals that received intra-articular injections of vehicle, demonstrating no effect of the crude extract alone (data not shown). Because only the dose of 300 mg/kg (p.o.) was able to prevent the nociceptive and oedematogenic effects induced by MSU injection, this dose was chosen for the remaining experiments.

### 3.2. The effects of *Jatropha isabellei* crude extract on the neutrophil infiltration induced by MSU

To investigate if treatment with *Jatropha isabellei* alters neutrophil infiltration, we assess the neutrophil infiltration in articular tissue after MSU injection by analysing the MPO activity (Fig. 3). We do not observe MPO activity at 2 or 4 h after MSU injection (data not shown). We observed that the MSU crystals induced cellular infiltration in the ankle articulation when compared with the control group (animals that received intra-articular injections of vehicle). The increase in MPO activity was fully prevented by both the *Jatropha isabellei* crude extract and colchicine administration ( $80 \pm 20\%$  and  $95 \pm 25\%$  prevention, respectively).

### 3.3. The effects of *Jatropha isabellei* crude extract on potassium oxonate-induced hyperuricaemia in rats

To evaluate the existence of a hypouricemic effect of the *Jatropha isabellei* crude extract, we used a model of hyperuricaemia in rats. As shown in Fig. 4, the injection of potassium oxonate (250 mg/kg, i.p.) markedly increased the serum uric acid levels compared with the control group (Fig. 4A). Treatment with the xanthine oxidase inhibitor allopurinol (10 mg/kg, p.o., used as a positive control) significantly prevented the uric acid increase in potassium oxonate-treated animals ( $89 \pm 10\%$  prevention), while the *Jatropha isabellei* crude extract treatment did not alter the uric

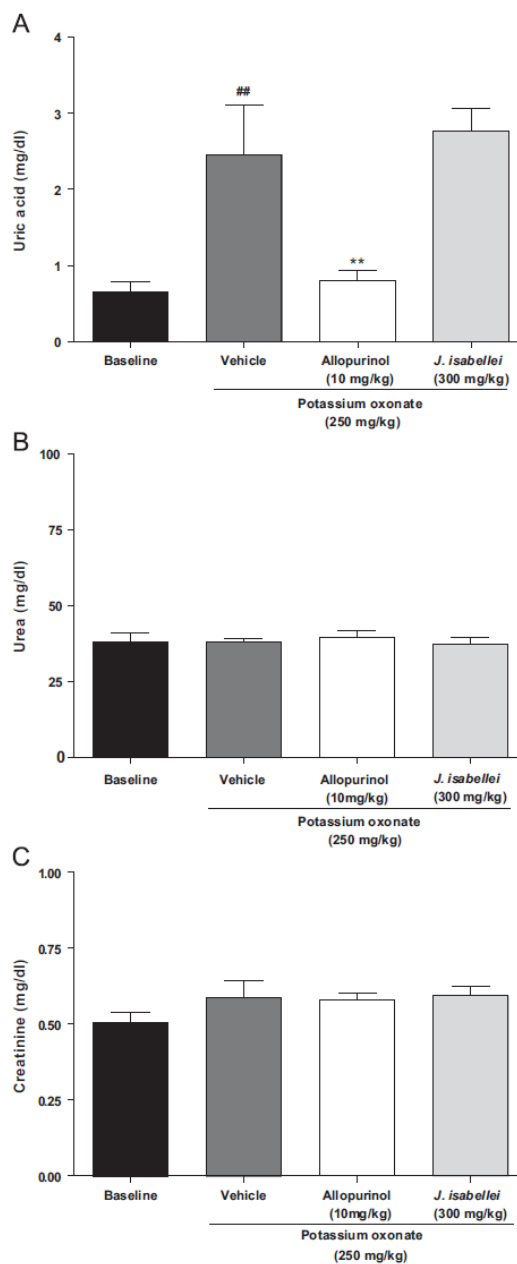


Fig. 4. The effect of the oral administration of the crude extract of *Jatropha isabellei* or allopurinol on the uric acid (A), urea (B) and creatinine (C) serum levels induced by potassium oxonate (250 mg/kg, i.p.). The samples were obtained 2 h after potassium oxonate treatment. Each column represent the mean + standard errors of the mean (A)–(C)  $n=6$  to all groups). Vertical lines show the SEM. ## $P < 0.01$  represents a significant difference compared to the basal levels, and \*\* $P < 0.01$  represents a significant difference compared to the vehicle-treated group. The statistical analysis was performed using a one-way ANOVA followed by the Student-Newman-Keuls' test. acid levels (Fig. 4A). We did not observe any differences in the serum levels of urea or creatinine among the groups (Fig. 4B and C). In addition, only the high concentration of the *Jatropha isabellei*

crude extract (300 µg/ml) was able to partially ( $18 \pm 5\%$ ) inhibit the xanthine oxidase activity *in vitro*. Allopurinol (10 µg/ml), the positive control, inhibited xanthine oxidase activity by  $54 \pm 2\%$  (Fig. 5).

#### 3.4. The effects of a fraction rich in alkaloids extracted from *Jatropha isabellei* on the nociception and articular oedema induced by MSU intra-articular injection

We hypothesised that the antinociceptive and anti-inflammatory effects demonstrated by the *Jatropha isabellei* crude extract could be

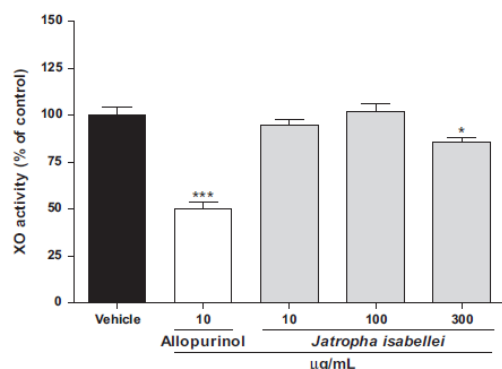


Fig. 5. The effect of different concentrations of the crude extract of *Jatropha isabellei* or allopurinol on xanthine oxidase activity *in vitro*. \* $P < 0.05$  represents a significant difference compared to vehicle. The statistical analysis was performed using a one-way ANOVA followed by the Student-Newman-Keuls' test.

partially due to the presence of alkaloids in the plant. To test this, we verified the antinociceptive and the anti-inflammatory effects of a fraction rich in alkaloids extracted from *Jatropha isabellei*. Similar to the results obtained for the crude extract, we observed that the fraction rich in alkaloids (0.15 mg/kg, p.o., a dose equivalent to the alkaloid content in the crude extract of *Jatropha isabellei*) was able to prevent the mechanical hyperalgesia ( $83 \pm 12\%$  prevention), thermal hyperalgesia ( $43 \pm 6\%$  prevention), articular oedema ( $61 \pm 11\%$  prevention) and neutrophil infiltration ( $70 \pm 9\%$  prevention) induced by MSU at 2 h after its administration (Fig. 6).

#### 3.5. Assessment of the side effects of *Jatropha isabellei* treatment

##### 3.5.1. The effects of *Jatropha isabellei* on the open-field test

Treatment with the crude extract (300 mg/kg) or the fraction rich in alkaloids (0.15 mg/kg) obtained from *Jatropha isabellei* caused no change in the locomotor coordination activity compared with the vehicle treated animals, as evaluated by both the total number of crossings and rearings in the open-field test after treatment (Table 2).

##### 3.5.2. Gastric lesion assessment

Treatment with the crude extract or the fraction rich in alkaloids obtained from *Jatropha isabellei* (300 mg/kg) did not induce gastric lesions. As expected, the positive control, sodium diclofenac, induced gastric lesions in the stomach mucosa of the rats (Table 2).

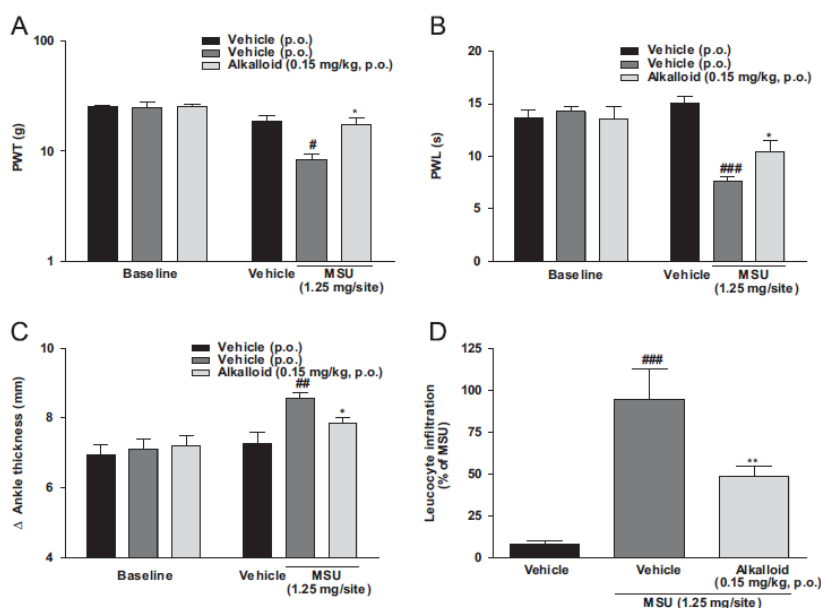


Fig. 6. The effect of the oral administration of a fraction rich in alkaloids extracted from *Jatropha isabellei* on the nociception and inflammation induced by intra-articular MSU injections (1.25 mg/site). The antinociceptive effects of the fraction rich in alkaloids observed in mechanical hyperalgesia (A) and thermal hyperalgesia (B). The anti-inflammatory effects of the fraction rich in alkaloids observed in ankle oedema formation (C) and MPO enzyme activity (D). The mechanical hyperalgesia, thermal hyperalgesia and oedema formation were analysed two hours after the MSU injections. The MPO activity was determined six hours after the MSU injections. Each column represent the mean ± standard errors of the mean (A)–(C),  $n = 4$  for vehicle/vehicle;  $n = 7$  for vehicle/MSU and alkaloid/MSU;  $D n = 5$  to all groups). Vertical lines show the SEM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$  represent significant differences compared to baseline levels; \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$  represent significant differences compared to the MSU intra-articular injected and vehicle-treated group. The statistical analysis was performed using a two-way ANOVA followed by Bonferroni's test (A)–(C) or a one-way ANOVA followed by the Student-Newman-Keuls' test (D).

**Table 2**  
The assessment of side effects after *Jatropha isabellei* treatment.

Groups (mg/kg)	Number of crossing/rearing	Gastric lesion index	AST/ALT activity (U/L)
Naïve	49 ± 8/23 ± 3	0	290 ± 20/112 ± 18
Vehicle	51 ± 6/25 ± 4	0	305 ± 2/117 ± 22
Sodium diclofenac (50 mg/kg)	ND	11 ± 3	ND
<i>Jatropha isabellei</i> crude extract (300 mg/kg)	39 ± 8/23 ± 3	0	346 ± 32/114 ± 12
<i>Jatropha isabellei</i> Fraction rich in alkaloids (0.15 mg/kg)	42 ± 7/20 ± 3	ND	244 ± 31/92 ± 9

ND=not determined.

### 3.5.3. Liver damage

Treatment with the crude extract or the fraction rich in alkaloids obtained from *Jatropha isabellei* (300 mg/kg) caused no change in AST or ALT enzyme activity when compared with the vehicle treated animals (Table 2).

## 4. Discussion

Gout is a hyperuricemic condition associated with the deposition of sodium urate crystals in the joints, leading to neutrophil infiltration and consequent swelling and pain (Martinon, 2010). The management of gout has changed relatively little in the past 50 years, despite the fact that many gout patients have contraindications to one or more of the currently available gout therapies. In South American traditional medicine, *Jatropha isabellei* is often used in the treatment of arthritic diseases, especially gout (Pertino et al., 2007). Our study demonstrated that *Jatropha isabellei* was able to prevent the nociception, oedema formation and neutrophil infiltration produced by an injection of MSU crystals in rats, confirming its traditional use. Moreover, we suggest that these effects can be attributed, in part, to the presence of alkaloid constituents in the plant.

We first analysed the antinociceptive and antioedematogenic effects of the crude extract of *Jatropha isabellei* in a rat gout model induced by MSU. We observed that the crude extract (300 mg/kg, p.o.) prevented the mechanical allodynia and thermal hyperalgesia induced by MSU injections, and its efficacy was similar to that found for colchicine. These results clearly indicate the existence of an analgesic-like effect of *Jatropha isabellei*. It is an interesting finding because pain is the most frequent and unpleasant sign of gout attacks (Martinon et al., 2006; Terkeltaub, 2010).

In addition to pain relief, gout treatment also must reduce the inflammatory reaction induced by MSU to avoid a worsening of the disease over time (Cronstein and Terkeltaub, 2006; Landis and Haskard, 2001; Sabina et al., 2010). MSU crystals may stimulate an innate immune response with the production and release of several pro-inflammatory mediators, such as kinins, interleukin and tumour necrosis factor, from the plasma and resident cells. Some of these mediators are chemotactic and amplify the inflammatory reaction by inducing leukocyte infiltration, which, if left unchecked, can lead to tissue damage (Desaulniers et al., 2001; Cronstein and Terkeltaub, 2006; Landis and Haskard, 2001; Sabina et al., 2010; Martinon, 2010; Popa-Nita and Naccache, 2010). Of note, treatment with the *Jatropha isabellei* crude extract (300 mg/kg, p.o.) was able to not only reduce the oedema but also prevent the neutrophil infiltration induced by MSU injection. This is an important finding because the reduction of leukocyte infiltration may prevent its further activation and consequent tissue injury.

The accumulation of crystals may also be an indirect result of hyperuricaemia. Although hyperuricemic is not a direct indicator of gout, it has long been considered to be the most important risk factor for the onset of gout (Osada et al., 1993; Mandell, 2008;

Gaffo et al., 2009). We demonstrated that in the hyperuricemic model, allopurinol fully prevented the uric acid increase compared with the control group. However, *Jatropha isabellei* did not show any effect on hyperuricaemia. These results suggest that this plant is unable to inhibit uric acid biosynthesis. On the other hand, we observed that only a high concentration of the *Jatropha isabellei* crude extract was capable of inhibiting xanthine oxidase activity *in vitro*. Thus, the antinociceptive and antioedematogenic effects of *Jatropha isabellei* do not occur by xanthine oxidase inhibition or alterations in the uric acid levels when the crude extract was administered. This is most likely due to a lack characteristics of absorption or the metabolism of the compounds responsible for the effect after oral administration *in vivo*. Thus, our pre-clinical study suggests that *Jatropha isabellei* could be useful to treat gout attacks, similar to colchicine or NSAID, but does not prevent them, as is the case for allopurinol.

Colchicine is an alkaloid isolated from the seed of the autumn crocus *Colchicum* and has been shown to reduce pain and inflammation in patients with acute gout attacks (Ahern et al., 1987; Richette and Bardin, 2010). Our results suggest that the crude extract of *Jatropha isabellei* is acting in a way that is similar to the alkaloid colchicine. This raises the possibility that alkaloid constituents in *Jatropha isabellei* may contribute to the effects of the crude extract. Consistent with this hypothesis, we demonstrated that a fraction rich in alkaloids extracted from this plant was able to prevent the nociception, oedema formation and neutrophil infiltration induced by MSU crystals at a dose that was equivalent to the alkaloid content of the crude extract. This result indicates that the alkaloids present in *Jatropha isabellei* may be responsible, at least in part, for the antinociceptive and anti-inflammatory effects of this plant.

Apart its beneficial effect of pain and inflammation, the use of NSAIDs in arthritic patients is limited by side effects, such as gastrointestinal lesions and renal failure (Janssens et al., 2008; Kobata et al., 2009). We observed that oral treatment with *Jatropha isabellei* did not induced gastric lesions. On the contrary, previous studies have demonstrated that the *Jatropha isabellei* crude extract is gastroprotective and has low toxicity in rats (Pertino et al., 2007). In accordance with these findings we did not detect any alteration in the activity of enzymes that indicated liver or renal injury (ALT and AST, respectively) or in the locomotor activity of rats after treatment with the *Jatropha isabellei* crude extract or a fraction rich in alkaloids. Taken together, these data indicate that the *Jatropha isabellei* crude extract has low toxicity. However, further studies investigating the toxicity of chronic treatment with this extract must be carried out to evaluate the safety of this plant.

## 5. Conclusions

The crude extract of *Jatropha isabellei* Müll Arg. presents antinociceptive and anti-inflammatory effects in a rat model of gouty arthritis without producing a hypouricemic effect.

These results further support the traditional use of this plant in gout patients.

### Acknowledgments

This study was supported by grants from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) Brazil. The fellowships from CNPq and CAPES are also acknowledged.

### References

- Ahern, M.J., Reid, C., Gordon, T.P., McCredie, M., Brooks, P.M., Jones, M., 1987. Does colchicine work? The results of the first controlled study in acute gout. *Australian & New Zealand Journal of Medicine* 17, 301.
- Angel, M.F., Narayanan, K., Swartz, W.M., Ramasastry, S.S., Basford, R.E., Kuhns, D.B., Futrell, J.W., 1986. The etiologic role of free radicals in human hematoma-induced flap necrosis. *Plastic & Reconstructive Surgery* 77, 795–801.
- Basualdo, I., Zardini, E.M., Ortiz, M., 1995. Medicinal plants of Paraguay: underground organs. II: *Economic Botany* 49, 387–394.
- Bieber, J.D., Terkeltaub, R.A., 2004. Gout: on the bring of novel therapeutic options for an ancient disease. *Arthritis & Rheumatism* 50, 2400–2414.
- Chang, Y., 1975. Mechanism of action of colchicine. I. Effect of colchicine and its analogs on the reversed passive Arthus reaction and the carrageenan-induced hindpaw edema in the rat. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 194, 154–158.
- Chaplan, S.R., Bach, F.W., Pogrel, J.W., Chung, J.M., Yaksh, T.L., 1994. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *The Journal of Neuroscience* 14, 55–63.
- Choi, H.K., Atkinson, K., Karlson, E.W., Willet, W., Curhan, G., 2004. Purine-rich foods, dairy and protein intake, and the risk of gout in men. *New England Journal of Medicine* 350, 1093–1103.
- Coderre, T.J., Wall, P.D., 1987. Ankle joint urate arthritis (AJUA) in rats: an alternative animal model of arthritis to that produced by Freund's adjuvant. *Pain* 28, 379–393.
- Cronstein, B.N., Terkeltaub, R., 2006. The inflammatory process of gout and its treatment. *Arthritis Research & Therapy* 8 (Suppl 1).
- Desautels, P., Fernandes, M., Gilbert, C., Bourgoin, S.G., Naccache, P.H., 2001. Crystal-induced neutrophil activation. VII. Involvement of Syk in the responses to monosodium urate crystals. *Journal of Leukocyte Biology* 70, 659–668.
- Dixon, W.J., 1980. Efficient analysis of experimental observations. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 20, 441–462.
- Gaffo, A.L., Edwards, N.L., Saag, K.G., 2009. Gout. Hyperuricaemia and cardiovascular disease: how strong is the evidence for a causal link? *Arthritis Research & Therapy* 11, 240–246.
- Gaffo, A.L., Saag, K.G., 2010. Febuxostat: the evidence for its use in the treatment of hyperuricaemia and gout. *Core Evidence* 15, 25–36.
- Hargreaves, K., Dubner, R., Brown, F., Flores, C., Joris, J., 1988. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain* 32, 77–88.
- Hoffmeister, C., Trevisan, G., Rossato, M.F., de Oliveira, S.M., Gomez, M.V., Ferreira, J., 2011. Role of TRPV1 in nociception and edema induced by monosodium urate crystals in rats. *Pain* 152, 1777–1788.
- Janssens, H.J., Janssens, M., van de Lisdonk, E.H., van Riel, P.L., van Weel, C., 2008. Use of oral prednisolone or naproxen for the treatment of gout arthritis: a double-blind, randomised equivalence trial. *Lancet* 371, 1854–1860.
- Kobata, Y., Yajima, H., Yamao, J., Tanaka, Y., Fukui, H., Takakura, Y., 2009. Risk factors for the development of gastric mucosal lesions in rheumatoid arthritis patients receiving long-term nonsteroidal anti-inflammatory drug therapy and the efficacy of famotidine obtained from the FORCE study. *Modern Rheumatology* 19, 629–636.
- Landis, R.C., Haskard, D.O., 2001. Pathogenesis of crystal-induced inflammation. *Current Rheumatology Reports* 3, 36–41.
- Lawrence, R.C., Helmick, C.G., Arnett, F.C., Deyo, R.A., Felson, D.T., Giannini, E.H., Heyse, S.P., Hirsch, R., Hochberg, M.C., Hunder, G.G., Liang, M.H., Pillemer, S.R., Steen, V.D., Wolfe, F., 1998. Estimates of the prevalence of arthritis and selected musculoskeletal disorders in the United States. *Arthritis & Rheumatism* 41, 778–799.
- Liu, X., Chen, R., Shang, Y., Jiao, B., Huang, C., 2008. Lithospermic acid as a novel xanthine oxidase inhibitor has anti-inflammatory and hypouricemic effects in rats. *Chemico-Biological Interactions* 176, 137–142.
- Mandell, B.F., 2008. Clinical manifestations of hyperuricemic and gout. *Cleveland Clinic Journal of Medicine* 75 (Suppl 5), S5–S8.
- Martinon, F., Pettrilli, V., Mayor, A., Tardivel, A., Tschopp, J., 2006. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature Letters* 440, 237–241.
- Martinon, F., 2010. Mechanisms of uric acid crystal-mediated autoinflammation. *Immunological Reviews* 233, 219–231.
- Nguyen, M.T., Suresh, A., Tezuka, Y., Shi, L., Zaidi, S.F.H., Ueda, J., Tran, Q.L., Murakami, Y., Matsumoto, K., Kadota, S., 2005. Hypouricemic effects of Acacetin and 4,5-o-dicaffeoylquinic acid methyl ester on serum uric acid levels in potassium oxonate-pretreated rats. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 28, 2231–2234.
- Osada, Y., Tsuchimoto, M., Fukushima, H., Takanashi, K., Kondo, S., Hasegawa, M., Komoriya, K., 1993. Hypouricemic effect of the novel xanthine oxidase inhibitor. *European Journal of Pharmacology* 241, 183–188.
- Pertino, M., Schmeda-Hirschmann, G., Rodriguez, J.A., Theodoluz, C., 2007. Gastro-protective effect and cytotoxicity of terpenes from Paraguayan crude drug 'Yagua rova' (*Jatropha isabelli*). *Journal of Ethnopharmacology* 111, 553–559.
- Popa-Nita, O., Naccache, P.H., 2010. Crystal-induced neutrophil activation. *Immunology & Cell Biology* 88, 32–40.
- Richette, P., Bardin, T., 2010. Colchicine for the treatment of gout. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 11, 2933–2938.
- Roberge, C.H., Gaudry, M., Médicis, R., Lussier, A., Poubelle, P.E., Naccache, P.H., 1993. Crystal-induced neutrophil activation. IV. Specific inhibition of tyrosine phosphorylation by colchicine. *The Journal of Clinical Investigation* 92, 1722–1729.
- Sabina, E.P., Rasool, M., Mathew, L., Ezilrani, P., Indu, H., 2010. 6-Shogaol inhibits monosodium urate crystal-induced inflammation—an *in vivo* and *in vitro* study. *Food and Chemical Toxicology* 48, 229–235.
- Sauzem, P.D., Gda, Sant'Anna, Machado, S., Duarte, P., Ferreira, M.M., Mello, J., Beck, C.F., Bonacorso, P., Zanatta, H.G., Martins, N., Rubin, M.A., M.A., 2009. Effect of 5-trifluoromethyl-4,5-dihydro-1H-pyrazoles on chronic inflammatory pain model in rats. *European Journal of Pharmacology* 616, 91–100.
- Sreevidya, D., Mehrotra, S., 2003. Spectrophotometer method for estimation of alkaloids precipitable with Dragendorff's reagent in plant materials. *Journal of AOAC International* 86, 1124–1127.
- Suzuki, K., Ota, H., Sasagawa, S., Sakatani, T., Fujikura, T., 1983. Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. *Analytical Biochemistry* 132, 345–352.
- Terkeltaub, R., 2010. Update on gout: new therapeutic strategies and options. *Nature Reviews Rheumatology* 6, 30–38.
- Wagner, H., Blatt, S., Zgainski, E.M., 2006. *Plant Drug Analysis*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo.
- Weaver, A.L., 2008. Epidemiology of gout. *Cleveland Clinic Journal of Medicine* 75 (5) S9–1.