

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

**Fabiano Vargas da Costa**

**ENVOLVIMENTO DAS POLIAMINAS NO ATAQUE AGUDO DE GOTA  
EM CAMUNDONGOS**

**Santa Maria, RS, Brasil 2016**

**Fabiano Vargas da Costa**

**ENVOLVIMENTO DAS POLIAMINAS NO ATAQUE AGUDO DE GOTA EM  
CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada no Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Área de Concentração em Neuropsicofarmacologia e Imunofarmacologia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Farmacologia, Área de Concentração em Neuropsicofarmacologia e Imunofarmacologia.**

**Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maribel A. Rubin**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2016**

**Fabiano Vargas da Costa**

**ENVOLVIMENTO DAS POLIAMINAS NO ATAQUE AGUDO DE GOTA EM  
CAMUNDONGOS**

**Dissertação apresentada no Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Área de Concentração em Neuropsicofarmacologia e Imunofarmacologia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Farmacologia, Área de Concentração em Neuropsicofarmacologia e Imunofarmacologia.**

**Aprovado em 26 de fevereiro de 2016:**

---

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maribel A. Rubin  
(Presidente/Orientador)**

---

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Gabriela Trevisan dos Santos (UNESC)**

---

**Prof. Dr. Denis Rosemberg (UFSM)**

Santa Maria, RS  
2016

## EPÍGRAFE

*“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu,  
mas pensar o que ninguém ainda pensou  
sobre aquilo que todo mundo vê”.*

*Arthur Schopenhauer*

*“Quanto mais aumenta nosso conhecimento,  
mais evidente fica nossa ignorância”.*

*John F. Kennedy*

*“O cientista não é o homem que fornece as verdadeiras respostas;  
é quem faz as verdadeiras perguntas”.*

*Claude Lévi-Strauss*

*“O homem que faz coisas comete erros,  
mas ele nunca comete o maior erro de todos  
- o de não fazer nada”.*

*Benjamin Franklin*

## RESUMO

### ENVOLVIMENTO DAS POLIAMINAS NO ATAQUE AGUDO DE GOTA EM CAMUNDONGOS

AUTOR: Fabiano Vargas da Costa  
ORIENTADORA: Maribel Antonello Rubin

O ataque agudo de gota é caracterizado por dor intensa e inflamação combinados com o acúmulo de cristais de urato monossódico (MSU). No entanto, a gota e os mecanismos responsáveis pelos ataques agudos ainda estão mal compreendidos, levando ao tratamento inadequado dos pacientes e reduzindo a qualidade de vida. As poliaminas (putrescina, espermidina e espermina) estão envolvidas em processos nociceptivos inflamatórios, e não foram investigadas até o momento, por conseguinte, o objetivo do presente estudo foi investigar o envolvimento das poliaminas no desenvolvimento do ataque de gota aguda em camundongos. Para isso, o escore de artrite (conjunto de somatórios de medidas que considera a formação de edema, eritema e posição da pata tratada do animal), hiperalgesia mecânica e parâmetros inflamatórios foram medidos em um modelo de ataque agudo de gota em camundongos machos, induzidos por uma injeção intra-articular de (i.a.) MSU, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, forbol 12-miristato 13-acetato (PMA), L-ornitina ou poliaminas (putrescina, espermidina, espermina). Todos os agentes algogênicos aumentaram o escore de artrite de um modo dose dependente com um DE50 de 0,73 (0,4-1,1) mg/sítio de MSU, 2,3 (1,5-3,5) µmol/sítio de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 3,5 (2,1-5,6) nmol/sítio para PMA, 0,6 (0,3-1,1) µmol/sítio para a L-ornitina, 0,8 (0,4-1,7) µmol/sítio para a putrescina, 3,6 (2,6-5,1) µmol/sítio para a espermidina e 0,1 (0,06-0,2) µmol/sítio para espermina. Todos os agentes algogênicos testados causaram edema articular e nocicepção, exceto a putrescina, que aumentou apenas o escore de artrite. α-Difluorometilornitina (DFMO; inibidor da ornitina descarboxilase - ODC) preveniu a nocicepção induzida por: MSU, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, PMA, L-ornitina, mas não o edema. Por outro lado, DFMO não preveniu a nocicepção e o edema induzido por espermina. DFMO preveniu o aumento da atividade da ODC induzido por MSU. Os nossos resultados indicam que as poliaminas estão envolvidas no ataque agudo de gota, sugerindo que os inibidores da síntese de poliaminas podem ser potenciais agentes terapêuticos para o tratamento e profilaxia da gota.

**Palavras-chave:** Urato monossódico. Hiperalgesia mecânica. Edema. Ornitina descarboxilase. Inflamação. Escore de artrite.

## ABSTRACT

### CRITICAL ROLE OF POLYAMINES ON ATTACK ACUTE OF GOUT IN MICE

Author: Fabiano Vargas da Costa  
Advisor: Maribel A. Rubin

Gout attack is characterized severe joint pain and inflammation with concomitant accumulation of monosodium urate (MSU) crystals. However, gout and the mechanisms responsible for the acute attacks are poorly understood, leading to improper treatment of the patient and reducing the quality of life. Polyamines (putrescine, spermidine and spermine) are involved in inflammatory nociceptive processes and have not been investigated to date. Therefore, the aim of the present study was to investigate the involvement of polyamines in the development of acute gout attack. Arthritis score, a compound measure of joint compromise that considers edema formation, erythema and paw position, mechanical hyperalgesia and inflammatory parameters were measured in an acute gout attack model in male mice induced by intra-articular (i.a.) injection of MSU, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), L-ornithine or polyamines (putrescine, spermidine, spermine). All these algogenic agents increased arthritis score in a dose-dependent manner with ED<sub>50</sub> of 0.73 (0.4-1.1) mg/site for MSU, 2.3 (1.5-3.5) μmol/site for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 3.5 (2.1-5.6) nmol/site for PMA, 0.6 (0.3-1.1) μmol/site for L-ornithine, 0.8 (0.4-1.7) μmol/site for putrescine, 3.6 (2.6-5.1) μmol/site for spermidine and 0.1 (0.06-0.2) μmol/site for spermine. All tested algogenic agents caused joint edema and nociception, except putrescine, which increased only arthritis score. α-Difluoromethylornithine (DFMO; ornithine decarboxylase – ODC - inhibitor, i.a.) prevented MSU-, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-, PMA-, L-ornithine-induced nociception, but not edema. On the other hand, DFMO did not prevent spermine-induced edema and nociception. DFMO prevented MSU-induced increase of ODC activity. Our results indicate that polyamines contribute to acute gout attacks, suggesting that inhibitors of polyamine synthesis may be potential therapeutic agents for the treatment and prophylaxis of gout.

**Keywords:** Monosodium urate, Mechanical hyperalgesia, Edema, Ornithine decarboxylase, Inflammation, Arthritis score.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Impacto de diferentes dietas na aquisição da gota.....	16
Figura 2 - Mecanismo de fagocitose de cristais de MSU.....	20
Figura 3 - Estrutura das poliaminas.....	21
Figura 4 - Biossíntese e catabolismo das poliaminas.....	22
Figura 5 - Sítios de modulação alostérica no receptor NMDA.....	24
Figura 6 - Possível mecanismo de ação da inflamação causada por cristais de MSU.....	58

## **LISTA DE QUADROS**

Quadro 1 - Diferentes estudos envolvendo poliaminas e nocicepção.....	27
---	----



## LISTA DE ABREVIATURAS

CFA	Adjuvante de Freund Completo
DFMO	$\alpha$ -Difluorometilornitina
EPMO	Espermina-oxidase
IASP	Associação Internacional dos Estudos da Dor
MSU	Urato monossódico
NMDA	N-metil-d-aspartato
ODC	Ornitina descarboxilase
PAO	Acetilpoliamina oxidase
PUT	Putrescina
SAMDC	S-adenosilmetionina descarboxilase
SPD	Espermidina
SPDS	Espermidina sintase
SPM	Espermina
SPMS	Espermina sintase
SSAT	N1-acetil-transferase
TRPV1	Receptores de Potencial Transitório do tipo Vanilóide 1

## SUMÁRIO

1. APRESENTAÇÃO .....	11
2. INTRODUÇÃO .....	12
2.1. DOR.....	12
2.2. GOTA.....	14
2.2.1. Histórico .....	14
2.2.2. Causas e prevalência.....	15
2.2.3. Processos inflamatórios .....	17
2.3. POLIAMINAS.....	21
2.3.1. Biossíntese e catabolismo das poliaminas.....	22
2.3.2. Regulação de canais iônicos por poliaminas .....	23
2.3.3. Poliaminas e nocicepção.....	24
2.3.4. Provável mecanismo de ação: Poliaminas e a gota .....	27
3. OBJETIVOS .....	28
3.1. OBJETIVO GERAL.....	28
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
4. MANUSCRITO .....	29
5. CONCLUSÕES .....	57
<b>5.1. Conclusões parciais</b> .....	<b>57</b>
<b>5.2. Conclusão geral</b> .....	<b>58</b>
6. BIBLIOGRAFIA .....	59

## 1. APRESENTAÇÃO

---

### 1. APRESENTAÇÃO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de manuscrito, o qual se encontra no item manuscrito. As seções Materiais e métodos, Resultados e Discussão, encontram-se no próprio manuscrito.

O item Conclusões e Referências bibliográficas encontram-se no final desta dissertação.

As Referências bibliográficas referem-se somente as citações que aparecem no item Introdução.

O artigo está estruturado de acordo com as normas da revista científica *Pflüglers Archiv - European Journal of Physiology*, a qual já foi submetido.

## 2. INTRODUÇÃO

---

## 2. INTRODUÇÃO

### 2.1. DOR

Estima-se que 80% da população mundial possui acesso limitado a medicamentos para tratamento da dor moderada a grave, provocando um profundo impacto sobre a qualidade de vida dos pacientes, acarretando consequências físicas, psicológicas, sociais e econômicas na população (FISHMAN, 2007; LOHMAN; SCHLEIFER; AMON, 2010). De acordo com a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), a dor é definida como “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada à lesão tecidual real ou potencial, ou ainda descrita em termos que sugerem tal lesão”. Sendo assim, a sua percepção é complexa e não envolve apenas a transmissão de um estímulo nocivo, mas também processos emocionais e cognitivos, o que leva a considerar a dor um fenômeno subjetivo. Por outro lado, a nocicepção é um processo fisiológico, usada para descrever os processos neurais de codificação e processamento de estímulos nocivos. Nocicepção e dor não deveriam ser confundidos, porque cada um pode ocorrer sem o outro, ou seja, pode-se haver nocicepção e não haver dor, como também haver dor sem a existência de nocicepção (LOESER; TREEDE, 2008).

A sensação dolorosa pode indicar uma lesão tecidual, o que se torna uma importante forma de defesa visando a proteção do organismo. Dessa forma, a dor aguda (nociceptiva) é de extrema importância, possuindo grande valor adaptativo, em relação à sobrevivência do organismo lesado (BASBAUM et al., 2009; WOOLF, 2010). Ao contrário destes propósitos claramente protetores, a dor pode se tornar crônica quando o organismo não é capaz de produzir resolução da lesão ou quando a plasticidade neuronal que ocorre durante a doença mantém a dor mesmo após a resolução da lesão. É o que acontece, por exemplo, em doenças inflamatórias crônicas, como a dor associada com as artrites (ASHBURN; STAATS, 1999). Durante estas síndromes, o processamento sensorial é anormal; e os estímulos ambientais que normalmente são inócuos, tais como leve toque ou pequenas

alterações na temperatura ambiente, produzem a sensação de dor, isto é, alodínia. Entretanto, alodínia está descrita como um caso especial de hiperalgesia, sendo uma sensação dolorosa em resposta a um estímulo não nocivo, esse termo só deve ser usado quando se sabe que o estímulo não é capaz de ativar nociceptores. A alodínia é considerada uma condição patológica, sendo detectada por fibras mielinizadas sensíveis ao toque do tipo A $\beta$ . Estímulos que normalmente são percebidos como dolorosos produzem percepção exagerada de dor, isto é, hiperalgesia. Finalmente, a dor pode ainda aparecer espontaneamente e sem necessidade de estimulação externa, podendo ser descrita como dor em queimação ou choque (LOESER; TREEDE, 2008). A dor crônica difere substancialmente da dor aguda não somente em relação ao seu caráter persistente, mas está principalmente associada com alterações adaptativas, tais como à neuroplasticidade em vários níveis do sistema nervoso, sendo de difícil tratamento (BESSON, 1999; MARCHAND; PERRETTI; MCMAHON, 2005; WOOLF; MANNION, 1999).

Existem diversos estímulos dolorosos, tais como, calor, frio extremo, pressão e produtos químicos, que podem ativar as terminações nervosas livres e periféricas de fibras aferentes sensoriais delgadas do tipo C e A $\delta$  (mielinizadas e não mielinizadas), chamadas de nociceptores, esta atividade elétrica é amplificada por canais de sódio desencadeando potenciais de ação. Estas fibras são formadas por neurônios cujos corpos celulares encontram-se nos gânglios da raiz dorsal (DRG) e trigeminal (TG) e que conduzem as informações nociceptivas até o corno dorsal da medula espinhal ou o núcleo trigeminal *pars caudalis* na ponte, respectivamente (BESSON, 1999; RUSSO; BROSE, 1998; WOOLF, 2010).

Nas lâminas superficiais do corno dorsal da medula espinhal, as terminações dos nociceptores liberam vários neurotransmissores que podem estimular neurônios de segunda ordem. Estes neurônios formam vias que irão distribuir informações para circuitos cerebrais responsáveis pela produção das dimensões sensoriais (discriminativa) e afetivas/motivacionais (descontentamento) da dor (HUNT; MANTYH, 2001). Os neurônios de segunda ordem formam vias supraespinhais, sendo as mais importantes a via espinotalâmica e a espinoparabraquial. A via espinotalâmica termina no tálamo ventroposterior lateral e ventrobasal, que tem projeções para o córtex e a via espinoparabraquial se projeta ao núcleo parabraquial e tem projeções para o hipotálamo, amígdala (HUNT; MANTYH, 2001). Esta

percepção supraespinal produz várias respostas autonômicas, neuroendócrinas e comportamentais relacionadas a defesa (KUNER, 2010).

## 2.2. GOTA

### 2.2.1. Histórico

A gota, também denominada artrite gotosa, é uma doença que aflige a humanidade há mais de 4500 anos, sendo considerada uma das condições agudas mais dolorosas que existem (CHOI et al., 2005). A gota atinge cerca de 1-2% dos adultos nos países desenvolvidos, com predominância nos países ocidentais (AR'EV; KUNITSKAYA; KOZINA, 2013; NUKI; SIMKIN, 2006; TERKELTAUB, 2003). Em 2640 a.C., a gota foi reconhecida pelos Egípcios e denominada Podagra e no século V a.C., foi citada por Hipócrates como “a doença incapacitante de andar”. Hipócrates também associou a doença com um estilo de vida da classe alta na época, referindo-se a podagra como a “artrite dos ricos”, já que somente a burguesia tinha condições de manter uma dieta a base de alimentos que favoreciam a aquisição da gota (carnes e álcool) (NUKI; SIMKIN, 2006). Atualmente, essa associação não é evidenciada, pois grande parte da população tem condições de manter uma dieta com alta ingestão de purinas (carnes e álcool), as quais podem elevar os níveis de urato sérico no organismo. Os Gregos foram os primeiros a formular uma teoria patogênica da gota, descrevendo-a como uma doença humoral, onde humores, denominados de “phlegme” ou catarro, teriam origem encefálica, localizando-se ao nível da articulação inflamada (HOFFMEISTER et al., 2011; NUKI; SIMKIN, 2006). Alguns séculos depois, Galeno descreveu a gota como depósitos de urato cristalizado, com conseqüente geração de nódulos (tofós) e hiperuricemia com longo tempo de duração (HOFFMEISTER et al., 2011; NUKI; SIMKIN, 2006). Até então a palavra “gota” não tinha sido mencionada e foi o monge Dominicano Randolphus de Bolding (1197-1258) que usou a palavra “gota” pela primeira vez para descrever a podagra. O termo “gota” é derivado da palavra em latim “gutta”, traduzindo um conceito humoral, que seguindo a descrição desta enfermidade, haveria um gotejar de humores de algum local do corpo às articulações (NUKI; SIMKIN, 2006).

Em 1679, Antoni van Leeuwenhoek (1632–1723), cientista holandês considerado o pai da microscopia, identificou a aparência dos cristais de um tofo de gota como sendo partículas pequenas e transparentes com extremidades pontiagudas. Alguns anos depois Freudweiler demonstrou que a administração intra-articular de micro cristais de urato monossódico eram capazes de desencadear uma inflamação com as características da gota aguda (BRILL; MCCARTY, 1964; NUKI; SIMKIN, 2006). Por fim, em 1962 Faires e MacCarty demonstraram através da injeção de cristais de urato monossódico (MSU) intra-articular nas próprias articulações, que a presença de MSU estava relacionada à dor e inflamação, pois a injeção deu início a um rápido processo inflamatório que apresentava os mesmos sintomas de uma crise aguda de gota (FAIRES; MCCARTY, 1962; MARTINON, 2010). Após um histórico de mais de 2500 anos a gota ainda é considerada uma das doenças mais antigas conhecidas, porém, os mecanismos associados à doença ainda não estão completamente elucidados, o que o torna de grande importância para a descoberta de novos fármacos e tratamentos para os sintomas associados a esta artrite (MARTINON, 2010; NUKI; SIMKIN, 2006; SMITH; BRACKEN; SMITH, 2011).

### **2.2.2. Causas e prevalência**

O aumento da concentração sérica de ácido úrico é um dos fatores de risco mais importantes para a gota. Em um estudo envolvendo 2046 participantes saudáveis com mais de 14 anos de idade, foi verificado que 22% deles que apresentavam níveis séricos iniciais de urato maiores do que 9 mg/dL, desenvolveram gota em um período de seis anos (AR'EV et al., 2013).

Devido ao alto número de pessoas com níveis de ácido úrico maiores que 9 mg/dL, foram criadas algumas recomendações gerais para o gerenciamento de fatores associados ao aumento de ácido úrico no sangue (hiperuricemia), incluindo perda de peso, restrição a ingestão de proteínas de origem animal (carne e frutos do mar), e também álcool e bebidas açucaradas (Figura 1) (CHOI et al., 2005; PEREZ-RUIZ; HERRERO-BEITES, 2012; RICHETTE; BARDIN, 2010).

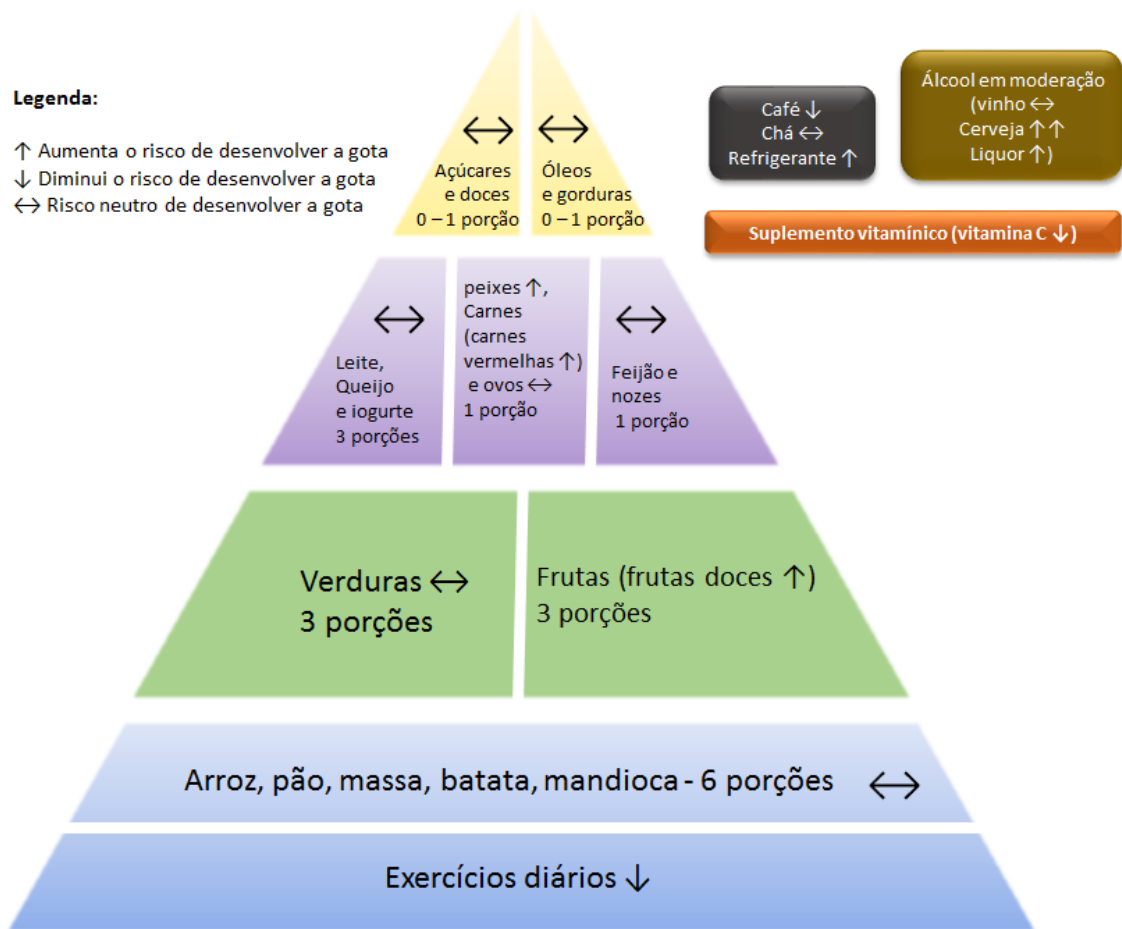


Figura 1- Impacto de diferentes dietas na aquisição da gota (CHOI, 2010).

O ácido úrico é um ácido fraco, formado pela ação da enzima xantina oxidase sobre as purinas adenosina e guanina. Em pH fisiológico esse ácido é chamado de urato (HOFFMEISTER et al., 2011; PEREZ-RUIZ; HERRERO-BEITES, 2012). Seres humanos e primatas apresentam uma mutação na enzima uricase, que é responsável pela degradação do ácido úrico em uma forma mais solúvel, a alantoína. Devido a essa mutação, a enzima perdeu sua função. Portanto as concentrações de urato são mais elevadas em humanos do que em outras espécies, levando a concentração fisiológica de urato ao seu limite de solubilidade (CHOI; CURHAN, 2008; WORTMANN, 2002).

A dieta humana consiste na ingestão de pouco ácido úrico, sendo produzido principalmente no fígado e em menor grau no intestino delgado. Sua produção está associada com o equilíbrio entre ingestão de purinas, síntese de novas células, reciclagem e a degradação pela enzima xantina oxidase. Uma das principais causas do excesso de produção de ácido úrico, está associada com a degradação do ATP



em AMP, que é um precursor do ácido úrico (RICHETTE; BARDIN, 2010; TERKELTAUB, 2003).

A gota também está associada com um número de diferentes medicamentos, incluindo diuréticos, baixas doses de aspirina, e drogas utilizadas em transplante de órgãos (SAAG; CHOI, 2006). O aumento da expectativa de vida da população em países desenvolvidos industrialmente também é um fator que contribui para o aumento da incidência da gota (AR'EV et al., 2013; PEREZ-RUIZ; HERRERO-BEITES, 2012). As manifestações clínicas da gota ocorrem com maior frequência com o aumento de condições como trauma ou irritação das articulações, redução da temperatura corpórea (extremidades do corpo podem ser mais afetadas e ataques noturnos são mais comuns), alterações no pH (observado em pacientes com cetose pós cirúrgicos), e por fim, em doenças prévias de alguma articulação como osteoartrite (CHOI et al., 2005; NEOGI, 2011; RICHETTE; BARDIN, 2010).

### **2.2.3. Processos inflamatórios**

Compreender as fases da gota, assim como a formação dos cristais de urato monossódico (MSU) e também o andamento dos fenômenos inflamatórios e patogênicos causados pelos cristais de MSU é fundamental para melhor entender os mecanismos inflamatórios envolvidos na gota.

Os cristais de MSU se formam quando os níveis séricos de ácido úrico estão acima do limite de solubilidade. Quando isso acontece, moléculas de urato são depositadas nas articulações ou em tecidos periarticulares e quando em contato com moléculas do ânion sódio, encontrado em altas concentrações no compartimento extracelular são cristalizadas, formando os cristais de urato monossódico (MSU). Como mencionado acima, fatores como redução do pH e da temperatura, força iônica e ligação a macromoléculas plasmáticas facilitam a cristalização do ácido úrico (RICHETTE; BARDIN, 2010; TERKELTAUB, 2003; WORTMANN, 2002). O desenvolvimento da gota pode ser dividido em 4 fases: a primeira fase é denominada hiperuricemia assintomática, uma anormalidade comum, onde concentrações de ácido úrico no sangue superam levemente o limite de solubilidade. Notavelmente, a maioria das pessoas com hiperuricemia permanecem assintomáticos. A segunda fase é caracterizada por ataques periódicos agudos de gota com duração média de 10 dias, seguido por períodos sintomáticos esporádicos.

Neste período os sintomas inflamatórios e a dor desaparecem mesmo sem tratamento, e tem início uma nova fase assintomática denominada período intercrítico. Por fim, com a falta de um tratamento adequado, ou então, a ausência de um tratamento, têm-se início a quarta fase, denominada gota tofácea crônica, que é caracterizada pelo inchaço e pela rigidez das articulações (MANDELL, 2008; MARTINON, 2010).

Todas as 4 fases da gota estão envolvidas em um complexo sistema de defesa do organismo, onde o sistema imunológico possui ferramentas que são capazes de realizar o monitoramento e detecção de moléculas sinalizadoras de lesões celulares e desse modo criam respostas apropriadas quando necessário, auxiliando no reparo do tecido danificado. Algumas moléculas são consideradas sinalizadores de perigo ou ainda citadas como padrões moleculares associados ao dano. Uma dessas moléculas é o cristal de MSU, sendo citado como uma das mais potentes substâncias capazes de iniciar um estímulo pró-inflamatório e uma resposta inflamatória imune inata (POPA-NITA; NACCACHE, 2010; ROCK; KATAOKA; LAI, 2013).

Alguns estudos demonstram que os cristais de MSU têm a capacidade de iniciar um processo inflamatório de duas formas distintas: 1- ativação do sistema do complemento, o que acarretará na produção de enzimas extracelulares e produção de mediadores pró-inflamatórios (DOHERTY; WHICHER; DIEPPE, 1983; RICH et al., 1985; TRAMONTINI et al., 2004); 2- através do mecanismo de fagocitose de cristais de MSU, estimulando a produção de eicosanoides, neurotransmissores, espécies reativas de oxigênio ( $H_2O_2$ ) e também citocinas pró-inflamatórias (ABRAMSON; HOFFSTEIN; WEISSMANN, 1982; CHEN et al., 2006; WEBSTER et al., 1972).

O Influxo e ativação de neutrófilos são importantes eventos na inflamação gotosa, pois já foi demonstrado que vários agentes responsáveis por suprimir a atividade dos neutrófilos são capazes de amenizar o processo inflamatório induzido por cristais de MSU (TRAMONTINI et al., 2004). A quimiotaxia positiva, ou seja, o recrutamento de células de defesa para o local de inflamação é crucial para o desenvolvimento do processo inflamatório. A ativação do sistema complemento já foi observada em fluidos sinoviais de humanos com gota (KIM et al., 1980; MANTHEY et al., 2009; WEBSTER et al., 1972) alternativamente, está descrito que cristais de MSU promovem a ativação das vias clássica (GICLAS; GINSBERG; COOPER,

1979; POPA-NITA; NACCACHE, 2010) e alternativa do sistema complemento *in vitro* (FIELDS et al., 1983).

Embora a quantidade de proteínas do sistema complemento no fluido articular normal seja baixa (MARTIN; HARPER, 2010; PEKIN; ZVAIFLER, 1964), algumas proteínas envolvidas no sistema complemento (C5a e C5a desArg; C5a desArg é uma molécula semelhante a C5a, porém menos potente) são conhecidas por exercerem efeitos quimiotáticos em concentrações baixas (HIGAZI; BARGHOUTI, 1994; MARTIN; HARPER, 2010). C5a desempenha um papel importante no aumento da migração e da adesão dos neutrófilos e monócitos às paredes dos vasos (MANTHEY et al., 2009). O papel do sistema complemento na gota começa a partir da clivagem direta de C5 para C5a e C5b, desencadeada pela formação da C5 convertase estável sobre a superfície do cristal de MSU (TRAMONTINI et al., 2004), a C5a é então liberada, restando a C5b, fixada no cristal de MSU, por fim, a C5b liga-se a C6, C7, C8 e C9 (C5b-9) formando o complexo de ataque a membrana (MAC) (KUBI et al., 2009). Estudos realizados em coelhos deficientes de C6, e conseqüentemente, incapazes de produzir a MAC, que foram tratados com uma injeção intra-articular de MSU no joelho direito, tiveram seus níveis de IL-8 diminuídos em 80% em comparação com animais sadios tratados com uma injeção de MSU intra-articular no joelho direito (TRAMONTINI et al., 2004).

Assim como a sinalização e a formação do complexo de ataque a membrana do cristal de MSU, um dos principais eventos ocorridos na inflamação gotosa é o reconhecimento e a internalização dos cristais de MSU pelas células de defesa presentes nas articulações, as quais são responsáveis por iniciar uma cascata inflamatória aguda, mas autolimitada (Figura 2). Dentre os mecanismos responsáveis pela internalização dos cristais de MSU estão os receptores de membrana do tipo Toll (TLRs) 2 e 4, que são responsáveis pelo reconhecimento e fagocitose dos cristais de MSU, juntamente com as proteínas CD14, que auxiliam no reconhecimento e iniciam o processo inflamatório propriamente dito (MARTIN; HARPER, 2010; SCOTT et al., 2006). Os receptores TLR 2 e 4 são proteínas de membrana que apresentam uma porção extracelular e uma porção intracelular. A porção extracelular contém repetições ricas em leucina (LLRs), responsáveis por fazer a ligação de vários ligantes, já sua porção intracelular contém um domínio TIR, onde apresentam regiões altamente conservadas denominadas box 1, 2 e 3, essas regiões servem como locais de ligações para proteínas auxiliaadoras, tais como a

MyD88, responsável por dar início a transdução de sinal, culminando na ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B e ativação de um conjunto de proteínas conjugadas chamada inflamossoma NLRP3. A ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B e inflamossoma NLRP3, resulta na produção de diversas citocinas e quimiocinas, tais como, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$  e espécies reativas de oxigênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (MARTINON, 2010; RICHETTE; BARDIN, 2010; TERKELTAUB, R., 2009).

A produção e liberação dessas citocinas inflamatórias no meio extracelular induzem o recrutamento e ativação de neutrófilos, através da estimulação do endotélio vascular a expressão de moléculas de adesão para leucócitos. Devido a essa ativação as células endoteliais conferem um aumento da permeabilidade vascular causada principalmente pelo aumento do fluxo sanguíneo e também da vasodilatação (MARTINON, 2010; RICHETTE; BARDIN, 2010).

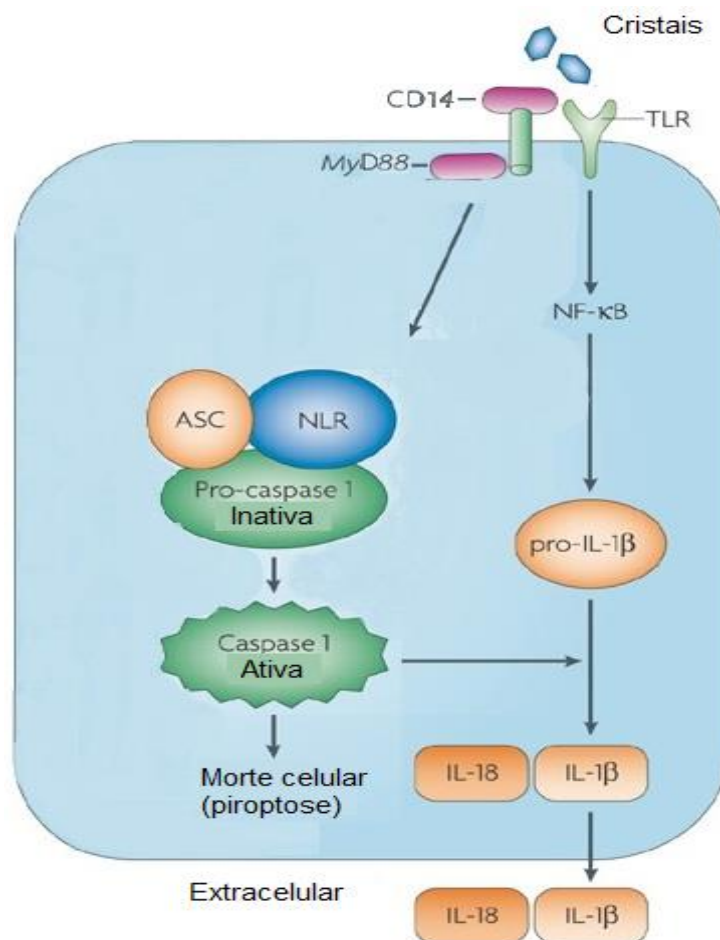


Figura 2- Mecanismo de fagocitose de cristais de MSU, adaptado de (DIACOVICH; GORVEL, 2010). Receptores de membrana do tipo Toll (TLRs), Receptores semelhantes a NOD (NLR), Cluster de diferenciação 14 (CD14), Gene principal de diferenciação a resposta mielóide 88 (MyD88). Partícula associada a apoptose como a proteína contendo domínios de recrutamento de caspase (ASC).

### 2.3. POLIAMINAS

As poliaminas foram descobertas em 1678 pelo holandês Antonie van Leeuwenhoek, contudo apenas em 1924 foi deduzida sua fórmula empírica, sendo somente em 1926 sintetizada *in vitro*. As poliaminas (putrescina, espermidina e espermina; Figura 3) são policações orgânicos com grupamentos aminos primários e secundários, os quais são protonados em pH fisiológico. Elas fazem parte de uma classe essencial de metabólitos encontrados em todas as células eucariotes e procariontes e são fundamentais para a proliferação celular (CASERO; MARTON, 2007; KUSANO et al., 2008).

Devido ao seu caráter catiônico, as poliaminas apresentam uma característica muito importante, que é sua capacidade de interagir (de forma reversível) muito mais forte e com alta especificidade com ácidos nucleicos e macromoléculas ácidas, do que com alguns cátions inorgânicos ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) (BACHRACH, 2005; CASERO; MARTON, 2007).

Diversos estudos têm apontado o papel das poliaminas como importantes no crescimento celular, envelhecimento, na melhora da memória, em doenças neurodegenerativas, desordens metabólicas e cânceres. Apesar de estudos abrangentes envolvendo poliaminas, existe uma carência de um conceito unificador para interpretar seu papel à nível molecular (MILLER-FLEMING et al., 2015).

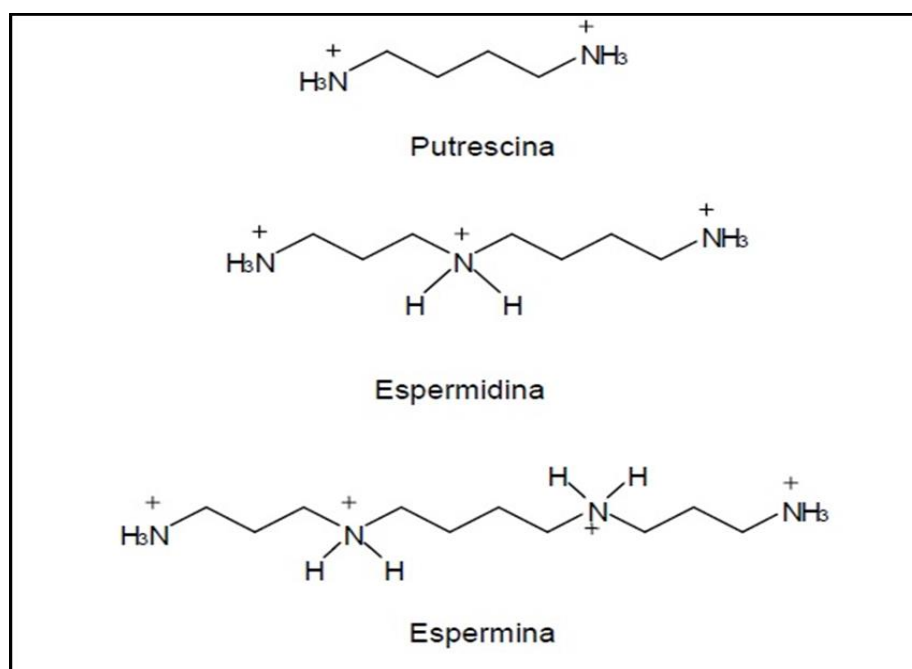


Figura 3- Estrutura das poliaminas.



Além da via direta de síntese das poliaminas a partir dos aminoácidos arginina e ornitina, a sua síntese também pode ocorrer de forma inversa, onde à partir da espermina será formada a espermidina e à partir desta a putrescina. Para isso existem três enzimas responsáveis pela síntese inversa das poliaminas. A espermina-oxidase (EPMO) é responsável por catalisar a conversão direta da espermina em espermidina, e as enzimas espermidina/espermina N1-acetil-transferase (SSAT) e acetilpoliamina oxidase (AcPAO) catalisam a conversão indireta de espermina em espermidina e espermidina a putrescina (CASERO; PEGG, 1993; JANNE et al., 2004; VUJCIC et al., 2002). Para contrabalancear a síntese de poliaminas, existe uma molécula responsável para controlar negativamente o aumento das poliaminas, a proteína chamada antizima (AZ). A antizima inibe diretamente a atividade de ODC e também estimula a sua degradação (COFFINO, 2001; IGARASHI; KASHIWAGI, 2010). A antizima também aumenta a excreção de poliaminas (SAKATA; KASHIWAGI; IGARASHI, 2000; SUZUKI, T. et al., 1994).

### **2.3.2. Regulação de canais iônicos por poliaminas**

As poliaminas estão envolvidas em vários processos biológicos, incluindo o controle da excitabilidade neuronal, a melhoria da memória e da aprendizagem no sistema nervoso central. Tem sido demonstrado que uma dieta deficiente em poliaminas e suplementada com um antibiótico (para reduzir o nível de poliaminas derivadas de microflora intestinal) reduz a hiperalgesia induzida por incisões, inflamação ou neuropatia em ratos (RIVAT et al., 2008). Além disso, tem sido mostrando que as poliaminas, em particular a espermina, se ligam, ativando alguns tipos de canais iônicos como o receptor N-metil-d-aspartato (NMDA) e mais recentemente com receptores de potencial transitório vanilóide 1 (TRPV1) (GEWEHR et al., 2011; IGARASHI; KASHIWAGI, 2010).

Mony e colaboradores (2011) mostraram através de técnicas moleculares e eletrofisiológicas, que as poliaminas se ligam na interface das subunidades GluN1/GluN2B do receptor NMDA (Figura 5) (MONY et al., 2011). No modelo proposto, a espermina liga-se na interface formada pelos lóbulos inferiores do domínio N-terminal (NTD) das subunidades GluN1/GluN2B do receptor NMDA. O

dímero formado pelo NTD das subunidades GluN1/GluN2B que possuem formato de concha, pode alternar entre dois estados conformacionais: um estado ativo e outro estado “tipo dessensibilizado”. No estado ativado, a região NTD das duas subunidades está aberta, o que mantém os lóbulos inferiores próximos e aumenta a probabilidade de ligação do agonista. Já no estado dessensibilizado, cargas eletrostáticas mantêm os lóbulos inferiores de GluN1 e GluN2B separados, o que provoca o fechamento da região NTD. A espermina e a espermidina agem estabilizando o receptor em um estado ativado, aliviando a repulsão eletrostática que separa os lóbulos inferiores das subunidades GluN1 e GluN2B (MONY et al., 2011).

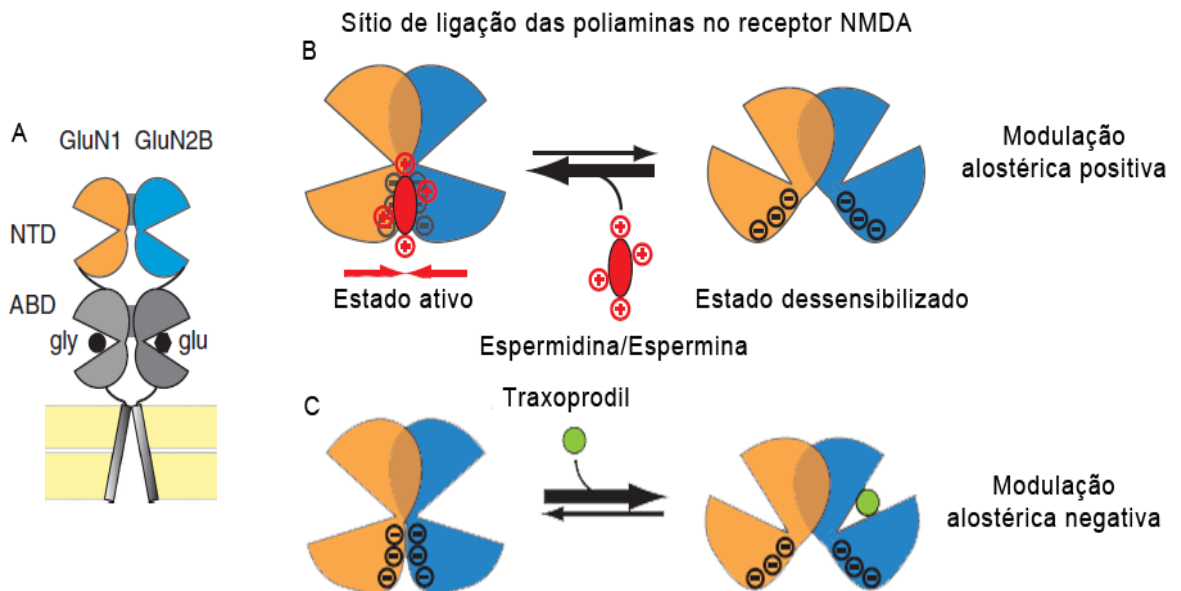


Figura 5 - Sítios de modulação alostérica no receptor NMDA. A) Visão esquemática do heterodímero formado pelas subunidades GluN1 e GluN2B. B) Sítio de ligação das poliaminas no receptor NMDA. C) Sítio de ligação de antagonistas da subunidade GluN2B do receptor NMDA. Adaptado de (MONY et al., 2011).

Além dos receptores NMDA, as poliaminas também modulam positivamente outros receptores ionotrópicos, tais como o TRPV1, um canal iônico importante para o desenvolvimento e processamento de nocicepção (YUKIOKA et al., 1992).

### 2.3.3. Poliaminas e nocicepção

Vários estudos têm demonstrado os efeitos das poliaminas relacionados com a nocicepção. Os próximos parágrafos descreverão alguns estudos relacionados



com poliaminas e nocicepção, seguido de um resumo geral em forma de quadro (Quadro 1).

Em 1996, em um dos primeiros estudos relacionando poliaminas com nocicepção, Kergozien e colaboradores constataram que a privação de poliaminas na dieta provoca um efeito analgésico. No estudo ratos Wistar foram submetidos a uma dieta de duas semanas contendo menos de 10 µg/kg de poliaminas, com intuito de desenvolver um possível efeito analgésico. Como resultados os pesquisadores observaram uma redução da nocicepção mecânica e térmica nos animais, indicando que as poliaminas poderiam potencializar a nocicepção (KERGOZIEN et al., 1996). Mais tarde outros pesquisadores também mostraram que uma dieta livre de poliaminas produz um efeito analgésico em ratos Sprague-Dawley (ESTEBE et al., 2006). Esta analgesia foi encontrada tanto em modelo de dor inflamatória como neuropática (ESTEBE et al., 2006) (RIVAT et al., 2008). Além disso, Ferrier e colaboradores descreveram que uma dieta livre de poliaminas impediu um aumento tanto da hiperalgesia mecânica quanto da hiperalgesia térmica em experimentos pré-clínicos (FERRIER et al., 2013).

Em 2011, Silva e colaboradores, observaram que as poliaminas sintetizadas endogenamente (putrescina, espermidina e espermina) contribuem para o desenvolvimento da nocicepção e edema em um modelo de dor inflamatória (SILVA et al., 2011).

Em 2011, Gewehr e colaboradores, avaliaram a participação de diversos receptores ionotrópicos (TRPV1, NMDA, AMPA/cainato, receptores de canais de íons sensíveis a ácido (ASIC)) na dor induzida pela administração subcutânea de poliaminas (putrescina, espermidina e espermina). Os pesquisadores concluíram que as poliaminas estão envolvidas na nocicepção através da ativação do TRPV1 (GEWEHR et al., 2011). Porém, até o momento não foi avaliado o papel das poliaminas no ataque agudo de gota.

Concluindo, devido às diversas evidências demonstrando a participação das poliaminas na nocicepção, através da modulação positiva de receptores ionotrópicos, e observando que mecanismos propostos para a patofisiologia da gota estariam induzindo a produção de poliaminas, neste estudo avaliamos o papel das poliaminas na nocicepção aguda induzida por um modelo de ataques agudos de gota em camundongos.

Quadro 1. Diferentes estudos envolvendo poliaminas e nocicepção.

Via de administração	Linhagem Animal	Testes realizados	Doses utilizadas	Resultados	Referências
Administração via oral (dieta livre de poliaminas).	Ratos Wistar 250 – 300g.	Randal-Sellito Tail-flick	Ração livre de poliaminas.	A administração via oral de uma dieta livre de poliaminas foi capaz de induzir um efeito analgésicos nos animais testados.	(KERGOZIE N et al., 1996)
Administração via oral (dieta livre de poliaminas). Injeção subcutânea (carragenina).	Ratos Sprague-Dawley 270 – 320g.	Randal-Sellito	Ração livre de poliaminas. 0.2 mL a 2% de carragenina.	A administração via oral de uma dieta livre de poliaminas foi capaz de reverter o efeito nociceptivo causado por carragenina.	(ESTEBE et al., 2006)
Administração via oral (dieta livre de poliaminas). Injeção subcutânea (carragenina) Injeção intra-articular (CFA).	Ratos Sprague-Dawley 300 – 400g.	Randal-Sellito (modificado) Teste de sustentação de peso	Ração livre de poliaminas. 0.2 mL a 1% de carragenina. 50µL CFA.	A administração via oral de uma dieta livre de poliaminas foi capaz de diminuir a dor crônica causada por carragenina e CFA.	(RIVAT et al., 2008)
Administração via oral (dieta livre de poliaminas). Administração intraperitoneal (Oxaliplatina).	Ratos Sprague-Dawley 150 – 175g.	Von-frey (eletrônico) Chapa Fria	Ração livre de poliaminas. Oxaliplatina (6 mg/kg)	Dieta livre de poliaminas foi capaz de criar um efeito analgésico induzido por carragenina.	(FERRIER et al., 2013)
Injeção subcutânea de poliaminas (putrescina, espermidina e espermina).	Camundongos Swiss, 25 – 30g.	Teste de lambidas (licking) Western Blot	Poliaminas 20µL, 0,1 - 10 µmol/pata. Glutamato (10,000 nmol/pata). Capsaicina (0,01–3 nmol/pata).	Graças ao caráter catiônico das poliaminas, elas podem estar aumentando a atividade de receptores envolvidos na dor.	(GEWEHR et al., 2011)
Injeção subcutânea de poliaminas (putrescina, espermidina e espermina).	Ratos Wistar 250 – 300g.	Von Frey Edema Western Blot	Poliaminas 50µL, 0,003 – 10µmol/pata. CFA 50µL	A Administração de poliaminas foi capaz de aumentar tanto nocicepção quanto edema.	(SILVA et al., 2011)

#### 2.3.4. Provável mecanismo de ação: Poliaminas e a gota

Alguns estudos têm demonstrado o envolvimento de poliaminas em processos inflamatórios, como descrito acima (ESTEBE et al., 2006; FERRIER et al., 2013; KERGOZIEN et al., 1996; RIVAT et al., 2008). Por outro lado, não existe qualquer outro estudo demonstrando o papel das poliaminas no ataque agudo de gota.

Está bem descrito que a injeção i.a. de MSU gera nocicepção e edema. Isto ocorre porque as células que residem nas articulações (sinoviócitos), apresentam um comportamento semelhante a macrófagos, sendo capaz de fagocitar cristais de MSU, resultando na produção de  $H_2O_2$ , juntamente com várias citocinas inflamatórias (MALAWISTA; DE BOISFLEURY; NACCACHE, 2011; MARTINON, 2010; SCHLESINGER, 2014). Além disso, tem sido descrito que a injeção i.a. de  $H_2O_2$  causa o aumento na nocicepção e edema de maneira semelhante a injeção i.a. de MSU (TREVISAN et al., 2014). O  $H_2O_2$  é uma espécie reativa de oxigênio, capaz de ativar receptores, proteínas e algumas células envolvidas na dor inflamatória (CSATO et al., 2014; TREVISAN et al., 2014).

Um dos componentes ativados pelo  $H_2O_2$  é a proteína cinase C (PKC) (CSATO et al., 2014). A PKC pertence ao grupo de serina e tirosina cinase e é responsável por vários fenômenos celulares, tais como a proliferação e a diferenciação celular (HADLEY; BAHIA; TAYLOR-CLARK, 2013; MARTIN-LIBERAL et al., 2014). A PKC é uma molécula composta por duas unidades diferentes, ou seja, é um heterodímero, onde precisa ser fosforilada para ficar ativa. A PKC pode ser fosforilada e conseqüentemente ativada pela molécula de diacilglicerol. Outra molécula responsável pela ativação da PKC é o miristato de forbol 12-13-acetato (PMA) (LIU; HECKMAN, 1998; ZHAO et al., 2009).

Após a fosforilação da PKC e conseqüente ativação, inicia-se vários processos, tais como a ativação de fatores de transcrição (NISHIZUKA, 1984) e a ativação de enzimas como a ornitina descarboxilase (ODC), responsável pela síntese de poliaminas, a qual é ativada pela PKC (ZHAO et al., 2009). A ODC é uma enzima de curta duração (menos de 1 hora) e está ativa na forma de dímero (OLSEN; ZETTER, 2011). Baseado nestes dados, no presente estudo avaliamos a possibilidade das poliaminas estarem envolvidas no ataque agudo de gota.

## 3. OBJETIVOS

---

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVO GERAL

- Avaliar o envolvimento das poliaminas na dor induzida pela administração intra-articular de MSU em camundongos.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

**3.2.1.** Investigar se a administração intra-articular de MSU, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), L-ornitina, putrescina, espermidina e espermina induzem nocicepção;

**3.2.2.** Investigar a participação da enzima ODC na nocicepção e edema induzida por MSU, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, PMA, L-ornitina e espermina;

**3.2.3.** Avaliar se a injeção intra-articular de  $\alpha$ -Difluorometilornitina (DFMO), inibidor da síntese de poliaminas, altera os parâmetros inflamatórios (infiltração celular e produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) induzidos por MSU;

**3.2.4.** Avaliar se a administração intra-articular MSU causa alterações na atividade da enzima ODC.

## 4. MANUSCRITO

---

### 4. MANUSCRITO

Título:

**Critical role of polyamines on attack acute of gout**

Manuscrito submetido para publicação no periódico:

**Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**

Comprovante de submissão do manuscrito:

05/02/2016






Editorial Manager®



HOME LOGOUT HELP REGISTER UPDATE MY INFORMATION JOURNAL OVERVIEW  
MAIN MENU CONTACT US SUBMIT A MANUSCRIPT INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

#### Submissions Being Processed for Author Maribel Antonello Rubin, Ph.D

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

<input type="checkbox"/> Action 	Manuscript Number  	Title  
<a href="#">View Submission</a> <a href="#">View Reference Checking Results</a>	PAEJ-D-16-00032	Critical role of polyamines in

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

## **Critical role of polyamines in the development of acute gout attack in mice**

Fabiano V. Costa<sup>1</sup>, Mateus F. Rossato<sup>2</sup>, Sara M. Oliveira<sup>3</sup>, Maribel A. Rubin<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Graduate Program in Pharmacology, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil

<sup>2</sup>Center of Innovation and Pre-clinical Pharmacology – CIEnP, Florianopolis, SC, Brazil

<sup>3</sup>Graduate Program in Biological Sciences: Toxicological Biochemistry, Center of Exact and Natural Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil

Correspondence to: Maribel A. Rubin, Department of Biochemistry and Molecular Biology, CCNE, Federal University of Santa Maria, Avenida Roraima 1000, Camobi, ZIP 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil. Tel.: +55 55 3220 8053.

E-mail: [maribel.rubin@gmail.com](mailto:maribel.rubin@gmail.com)

Short title: Role of polyamines in the acute gout attack

## Abstract

**Objective.** The aim of the present study was to investigate the involvement of polyamines in the development of acute gout attack in mice.

**Methods.** Arthritis score, a compound measure of joint compromise that considers edema formation, erythema and paw position, mechanical hyperalgesia and inflammatory parameters were measured in an acute gout attack model in male mice induced by intra-articular (i.a.) injection of monosodium urate (MSU), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), L-ornithine or polyamines (putrescine, spermidine, spermine).

**Results.** All these algogenic agents increased arthritis score in a dose-dependent manner with ED<sub>50</sub> of 0.73 (0.4-1.1) mg/site for MSU, 2.3 (1.5-3.5) μmol/site for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 3.5 (2.1-5.6) nmol/site for PMA, 0.6 (0.3-1.1) μmol/site for L-ornithine, 0.8 (0.4-1.7) μmol/site for putrescine, 3.6 (2.6-5.1) μmol/site for spermidine and 0.1 (0.06-0.2) μmol/site for spermine. All tested algogenic agents caused joint edema and nociception, except putrescine, which increased only arthritis score. α-Difluoromethylornithine (DFMO; ornithine decarboxylase – ODC - inhibitor, i.a.) prevented MSU-, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-, PMA-, L-ornithine-induced nociception, but did not prevent edema. On the other hand, DFMO did not prevent spermine-induced edema and nociception. DFMO prevented MSU-induced increase of ODC activity.

**Conclusion.** Our results indicate that polyamines contribute to acute gout attacks, suggesting that inhibitors of polyamine synthesis may be potential therapeutic agents for the treatment and prophylaxis of gout.

**Key words:** monosodium urate, mechanical hyperalgesia, edema, ornithine decarboxylase, inflammation, arthritis score.

## Introduction

Gout is a disease that afflicts humanity for over 4,500 years, being considered one of the most painful acute conditions afflicting humans, reaching about 1-2% of adults in developed countries, with predominance in western countries (1-5). It has been shown that the excess of uric acid in the body leads to the deposit of monosodium urate (MSU) crystals in the joint, and this is the main cause of gout (6, 7). Acute gout attacks are accompanied by severe joint pain and articular/periarticular inflammation and, specifically, the presence of MSU crystals in the interior of phagocytic cells (8).

The uric acid is a weak acid formed by the action of the enzyme xanthine oxidase on the purines adenosine and guanine (9). Humans and primates have a mutation in the enzyme called uricase, which is responsible for degradation of uric acid to a more soluble form, the allantoin, due to this mutation, the enzyme eventually lost function. Therefore, the concentration of urate in humans is higher than in other species, leading to physiologic urate concentration to their solubility limit (10, 11).

The main drugs clinically used to gout treatment are nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), steroids, or colchicine (12). However, it is known that these drugs can cause collateral effects that often limit their use and none is ideal for alleviating the inflammatory phenomena (4, 13). Thus, studying the mechanisms involved in the acute attack of gout is a useful means of identifying new targets to better treat the inflammatory and nociceptive symptoms induced by MSU.

Recent studies from our group demonstrated that hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) contribute substantially to painful and inflammatory responses induced by MSU injection (14, 15). At the same time, we also demonstrated the importance of protein kinase C (PKC) in an inflammatory painful condition (16, 17).  $H_2O_2$  may act as a PKC activator, which in turns activate ornithine decarboxylase (ODC), responsible for the synthesis of polyamines (18, 19).

The polyamines, putrescine, spermidine and spermine, are simple aliphatic amines, present in all eukaryotic cells (20, 21). Putrescine is formed from the decarboxylation of ornithine by ODC (rate limiting step), which may be converted into spermidine and spermine by spermidine synthase and spermine synthase, respectively (20-22). Previous studies demonstrated that polyamines produce spontaneous nociception through the stimulation of receptor transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) and trigger inflammatory processes (23-25). In line with this view, it has been shown that a polyamine-free diet attenuates the hypersensitivity in chronic arthritis animal models and prevents the increased nociception (23, 24, 26).



Considering these studies, we hypothesized that polyamines are involved in the acute attack of gout. Therefore, in the current study, we investigated whether the i.a. administration of polyamines causes nociception and whether DFMO, a polyamine synthesis inhibitor, prevents the nociception induced by MSU, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, L-ornithine, spermine and phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, an activator of PKC).

## Methods

### Animals

Swiss adult male mice (25-30 g) were used in all experiments. All animals were housed in a room maintained at a constant temperature of  $22 \pm 1$  °C under a 12-h light/dark cycle with food and water available *ad libitum*. Animals were acclimatized to the laboratory for at least 1h before testing. The number of animals and the nociceptive stimuli used were the minimum necessary to demonstrate the consistent effects of drug treatments. All experimental procedures were conducted in accordance with the policies on the use of animals and humans in neuroscience research, revised and approved by the Society for Neuroscience Research in January 1995. All protocols were also approved by the Ethics Committees of the Federal University of Santa Maria (process number: 5369110315/2015).

### Drugs

Synthetic crystals of monosodium urate (MSU) were prepared as previously described (27). 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, leaving inert for 12 hours, and then washed and dried. Needle-like crystals were recovered and suspended in endotoxin-free phosphate buffered saline (PBS). For the analysis of the crystals was used polarized light microscopy, confirming 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).

Putrescine (1,4-Butanediamine dihydrochloride), Spermidine (N-(3-aminopropyl)-1,4-butanediamine trihydrochloride), Spermine (N, N'-bis (3-aminopropyl) 1,4-butanediamine), PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate), L-Ornithine monohydrochloride, DFMO (DL- $\alpha$ -Difluoromethylornithine hydrochloride hydrate), DTT

(Dithiothreitol), EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid), Tris (hydroxymethyl) aminomethane and L-[<sup>14</sup>C]-ornithine were purchased from Sigma (St Louis, MO, USA). Hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) was purchased from local suppliers and diluted in PBS.

### **Intra-articular (i.a.) injection**

The animals received intra-articularly (i.a.) injections of 20 µl of MSU crystals (0.3 -1.25 mg/site), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.0003-10 µmol/site), PMA (1-30 nmol/site), L-ornithine (0.0003-10 µmol/site), putrescine (0.0003-10 µmol/site), spermidine (0.0003-10 µmol/site) or spermine (0.0003-10 µmol/site), to induce inflammatory and painful responses. The control group received i.a. injection of the vehicle alone (PBS, 20 µl). To evaluate the participation of polyamines on the arthritis score, mechanical hyperalgesia and edema induced by the compounds, DFMO (10 nmol/site, i.a.), inhibitor of ODC, was co-administered with all drugs (28). All drugs were injected i.a. into the medial side of the left tibio-tarsal joint (28).

### **Nociception assessment**

#### *Arthritis score assessment*

To evaluate the progression of the arthritic response elicited by i.a. compounds injection, animals were placed in high apparatus with free access to the left joint for easy evaluation. The following signs of inflammation were observed and classified according to the following scale: edema formation (0 - normal; 1 - slight swelling at the injection site; 2 - swelling at the injection site and toes or joint; 3- swelling at the injection site, toes and joint), redness (0 - normal; 1- slightly red/purple; 2 - red/purple), and claw position (0 - normal; 1- slightly curved; 2 - almost closed). Individual scores were added to give the total arthritis score (maximum score: 8 points) (29, 30).

#### *Mechanical hyperalgesia*

The mechanical hyperalgesia was evaluated using the up-and-down method described previously using von Frey filaments (31). Briefly, animals were placed in cages with a wire mesh bottom, permitting unobstructed access to the paws. A paw was touched with one of a series of seven von Frey hairs in logarithmic increments (0.02-10 g)

(15). The mechanical paw withdrawal threshold (PWT) response was calculated from the resulting scores and expressed in grams (g). The PWT was evaluated several times before and after treatments or i.a. injections of algogenic agents. A significant decrease in PWT compared to the baseline values was considered as mechanical hyperalgesia.

### **ODC activity assessment *ex vivo***

The ODC activity, we evaluated as previously described (32). Briefly, animals received vehicle (PBS, 20  $\mu$ l) plus vehicle, vehicle plus DFMO (10 nmol/site), MSU (1.25 mg/site) plus vehicle or MSU plus DFMO. Four hours after, the mice were killed, and the tissue around the joint ankles were removed and homogenized in buffer (2.5 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5), centrifuged at 5000 x g for 10 min at 4 °C. The supernatants were collect for analysis and its protein content was adjusted to 0.5 mg/mL (using Bradford method (33)). The reaction was started mixing sample, assay buffer (250 mM DTT, 2 mM of pyridoxal phosphate, 20 mM of L-ornithine, 1 M Tris-HCl, pH 7.5), and L-[<sup>14</sup>C]-ornithine, in capped-glass tubes with a filter paper piece soaked in 1 M hyamine hydroxide. The mixtures were incubated at 37 °C for 30 min, than we added sulphuric acid and incubated for 30 min at 37 °C. The filter papers were then collected to measure the CO<sub>2</sub> released from [<sup>14</sup>C]-ornithine. ODC activity was expressed as nmol ([<sup>14</sup>C]CO<sub>2</sub>)/mg protein/min.

### **Inflammatory parameters assessment**

#### *Assessment of Edema*

The diameter of the joint was measured using a digital caliper (34). An increase in the joint diameter (mm) as compared with baseline values was used as an index of edema. The edema caused by i.a. injections of edematogenic agents was assessed from 0.25 up to 24 h, when necessary.

#### *Myeloperoxidase (MPO) assay*

To assess the leukocyte infiltration in joint tissue after MSU i.a. injections, we verified the MPO activity, a neutrophil infiltration marker (35). Briefly, animals received vehicle (PBS, 20  $\mu$ l) plus vehicle, vehicle plus

DFMO (10 nmol/site), MSU (1.25 mg/site) plus vehicle or MSU plus DFMO. Four hours after injections, the animals were anesthetized with sodium pentobarbital (100 mg/kg, i.p.) and perfused to avoid blood interference and the joint tissue samples were collected and frosted until analysis. The samples were homogenized with sodium acetate buffer (pH 5.4) plus hexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB) and centrifuged (11,200 x g at 4 °C for 20 min), and the supernatants were collected. For the evaluation of MPO activity, the supernatant were incubated with acetate buffer (8 mM, pH 5.4) and 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) (18.4 mM) at 37 °C for 3 minutes. The reaction was stopped with acetic acid in a cold bath, and the enzyme activity value was assessed colorimetrically at 630 nm using a microplate reader. Values were expressed as optical densities and corrected by homogenized tissue grams (g).

#### *H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production assay*

The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels in paw skin after subcutaneous injection of MSU were determined by the phenol red–horseradish peroxidase (HRP) method (36). Briefly, animals received vehicle (PBS, 20 µl) plus vehicle, vehicle plus DFMO (10 nmol/site), MSU (1.25 mg/site) plus vehicle or MSU plus DFMO. Four hours after, the mice were killed, and joint ankles tissue were removed. The samples were homogenized in 50 mM phosphate buffer (pH 7.4) containing 5 mM sodium azide at 4°C for 60 seconds, and the homogenate was centrifuged (12,000xg for 20 minutes at 4°C). The resultant supernatant was used to determine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels. The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels were expressed as nmol of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on the basis of a standard curve of HRP-mediated oxidation of phenol red by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, corrected by protein content (in milligrams) of the joint ankle tissue analyzed.

#### **Statistical Analysis**

Data were analyzed by one- or two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni or Dunnett post-test. *P*-values <0.05 were considered to be significant. The ED<sub>50</sub> values were determined by nonlinear regression analysis using a sigmoid dose response. Statistical analysis was performed using GraphPad Software 6.0 (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA).

## Results

### **MSU crystal-induced arthritis score, mechanical hyperalgesia, and edema**

The i.a. MSU injection dose-dependently increased the arthritis score (0.6, 1 and 1.25 mg/site; higher doses exceeding the solubility limit of MSU) with an ED<sub>50</sub> of 0.73 (0.4-1.1) mg/site (Fig. 1A). Thus, the MSU dose of 1.25 mg/site was chosen for future experiments. The i.a. MSU injection (1.25 mg/site) caused an increase in arthritis score from 0.5 up to 6 hours after its injection with an maximum effect at 4 hours (an increase of 5 times) (Fig. 1B). Based on these findings, subsequent experiments were carried out 4 hours after i.a. MSU injection. MSU (1.25 mg/paw) also caused mechanical hyperalgesia (Fig. 1C) and joint edema (Fig. 1D).

### **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced arthritis score, mechanical hyperalgesia, and edema**

The i.a. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> injection dose-dependently increased the arthritis score (0.03-10 μmol/site) with an ED<sub>50</sub> of 2.3 (1.5-3.5) μmol/site (Fig. 2A). The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dose of 3 μmol/site was chosen to induce nociception and edema in later experiments. The i.a. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> injection (3 μmol/site) increased the arthritis score from 0.5 up to 5 hours after its injection with maximum effect at 3 hours (increase of 3 times) (Fig. 2B). Based on these findings, subsequent experiments caused by i.a. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> injection were measured 3 hours after its injection. The i.a. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> injection (3 μmol/paw) promoted mechanical hyperalgesia (Fig. 2C) and joint edema (Fig. 2D).

### **PMA-induced arthritis score, mechanical hyperalgesia, and edema**

The i.a. PMA injection dose-dependently increased the arthritis score (1-30 nmol/site) with an ED<sub>50</sub> of 3.5 (2.1-5.6) nmol/site (Fig. 3A). The PMA dose of 30 nmol/site was chosen to induce nociception and edema in future experiments. PMA (30 nmol/paw) caused an increase in arthritis score from 0.25 up to 5 hours after its injection, with effect maximum at 3 hours ( an increase of 6 times) (Fig. 3B). Subsequent experiments were evaluated 3 hours after i.a. PMA injection. The i.a. PMA injection (30 nmol/paw) caused mechanical hyperalgesia (Fig. 3C) and joint edema (Fig. 3D).

### **L-ornithine-induced arthritis score, mechanical hyperalgesia, and edema**

The i.a. L-ornithine injection dose-dependent increased the arthritis score (0.003-10  $\mu\text{mol}/\text{site}$ ) with an  $\text{ED}_{50}$  of 0.6 (0.3-1.1)  $\mu\text{mol}/\text{site}$  (Fig. 4A). The L-ornithine dose of 1  $\mu\text{mol}/\text{site}$  was chosen to induce nociception and edema in future experiments. The i.a. injection of L-ornithine (1  $\mu\text{mol}/\text{site}$ ) caused an increase in arthritis score from 1 up to 4 hours after its injection, with a maximum effect at 3 hours ( an increase of 4 times) (Fig. 4B). Based on these findings, later experiments were carried out at 3 hours after i.a. L-ornithine injection. The i.a. L-ornithine injection (1  $\mu\text{mol}/\text{paw}$ ) promoted mechanical hyperalgesia (Fig. 4C) and joint edema (Fig. 4D).

### **Polyamines-induced arthritis score, mechanical hyperalgesia, and edema**

The i.a. injection of polyamines (putrescine, spermidine or spermine) dose-dependently increased the arthritis score [0.03-10  $\mu\text{mol}/\text{site}$  to putrescine,  $\text{ED}_{50}$  of 0.8 (0.4-1.7)  $\mu\text{mol}/\text{site}$ ; 0.003-10  $\mu\text{mol}/\text{site}$  to spermidine,  $\text{ED}_{50}$  of 3.6 (2.6-5.1)  $\mu\text{mol}/\text{site}$  and 0.0003-10  $\mu\text{mol}/\text{paw}$  to spermine,  $\text{ED}_{50}$  of 0.1 (0.06-0.2)  $\mu\text{mol}/\text{site}$ ] (Fig. 5A, C and E respectively). Thus, a putrescine, spermidine and spermine dose of 10  $\mu\text{mol}/\text{site}$ , 10  $\mu\text{mol}/\text{site}$  and 1  $\mu\text{mol}/\text{site}$ , respectively, chose to induce nociception and edema in future experiments. The i.a. putrescine injection (10  $\mu\text{mol}/\text{site}$ , Fig. 5B) increased the arthritis score from 1 up to 4 hours after its injection with an effect maximum at 3 hours (an increase of 4 times). Spermidine (10  $\mu\text{mol}/\text{site}$ , Fig. 5D) and spermine (1  $\mu\text{mol}/\text{site}$ , Fig 5F) increased the arthritis score from 0.5 up to 5 hours after its injections, with a maximum effect at 3 hours (an increase of 6 times and 7 times respectively). Based on these findings, future experiments were carried out at 3 h after i.a. polyamines injection.

The i.a. injection of spermidine (10  $\mu\text{mol}/\text{site}$ ) or spermine (1  $\mu\text{mol}/\text{site}$ ) caused mechanical hyperalgesia (Fig. 5G) and joint edema (Fig. 5H) 3 hours after its injections. On the other hand, putrescine cause neither mechanical hyperalgesia (Fig. 5G) nor joint edema (Fig 5H).

### **Effect of DFMO on the nociceptive and inflammatory parameters elicited by different algogenic agents**

The co-administration of the ODC inhibitor, DFMO (10 nmol/site), prevented the increase in the arthritis score and the development of mechanical hyperalgesia caused by MSU,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , PMA, L-ornithine. On the other hand,

DFMO did not prevent the effect of spermine on arthritis score and on mechanical hyperalgesia. In addition, DFMO did not reduce the edema induced by these different algogenic agents (Table 1).

#### **Effect of DFMO and MSU on ODC activity**

The MSU injection (1.25 mg/site) increased the ODC activity and the co-administration of DFMO (10 nmol/site) prevented this effect of MSU (Supplementary Fig. S1 available as supplementary data at Rheumatology Online).

#### **Effect of DFMO and MSU on MPO levels and on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production**

The MSU injection (1.25 mg/site) increased the MPO activity, suggesting cell infiltration in the joint. DFMO (10 nmol/site) prevented the increase of the MPO activity induced by MSU (Supplementary Fig. S2-A available as supplementary data at Rheumatology Online). The MSU injection also increased the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and the DFMO was unable to prevent this effect (Supplementary Fig. S2-B available as supplementary data at Rheumatology Online).

### **Discussion**

An acute gout attack is a consequence of the deposition of MSU crystals in joints and periarticular tissues. It is characterized by the inflammation of the joints where the affected joint is red, warm, swollen and painful (2, 3, 12, 15, 28). These symptoms are the result of an acute inflammatory response, occurring intense neutrophils infiltration, phagocytosis of MSU crystals by resident cells (synovial cells) and release of pro-inflammatory mediators, including interleukin IL-1 $\beta$  into the synovial fluid (34-39).

In the current study, we showed the involvement of polyamines putrescine, spermidine and spermine and others algogenic agents in the acute gout attack in mice. The MSU injection caused nociceptive and edematogenic responses, which were prevented by DFMO co-administration. In the same manner, the polyamines (putrescine, spermine, and spermidine) injection was able to cause nociceptive and edematogenic responses. This nociception caused by spermine were not reverse by DFMO co-administration. It is well written that polyamines are important endogenous regulators of ion channels, such as TRPV1 (25, 37, 38). On the other hand, there is no other study showing the role of polyamines in the acute gout attack.

In order to investigate the peak of nociception and edema caused by i.a. MSU injection, different times and MSU doses were tested. As expected, MSU injection promoted nociception, edema and neutrophil infiltration in the joint. Our data are according to previous studies, which demonstrated that i.a. injection of MSU was able to cause edema, nociception and increased activity of the myeloperoxidase enzyme (27, 28). These results may be due to phagocytosis of MSU crystals by cell residents (as a synovial cell). These cells have Toll-like (TLRs) 2 e 4 receptors that can recognize and phagocytose MSU crystals. Additionally, cluster of differentiation 14 (CD14) proteins, which help in the recognition of MSU crystals, initiate an inflammatory process resulting in a series of events such as activation of transcription factors, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production, and inflammatory cytokines release (39-43).

Since i.a. MSU administration increased the production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, we investigate the nociceptive/inflammatory response elicited by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Here we demonstrated that i.a. administration of MSU was able to increase the production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and DFMO was not able to prevent this increase (15, 44). . These results reinforce previous work showing the importance of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in this animal model. Intra and extracellularly H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> can interact and activate different receptors, proteins and some cells involved in inflammatory pain (15, 44). Previous studies have demonstrated that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-elicited nociception and edema were inhibited by a TRPA-1 antagonist or by the combination of low doses of TRPA-1 and TRPV-1 antagonists, interestingly, these receptors are also activated by polyamines (14). Despite it, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> can also activate PKC, through association with a reverse redistribution of some PKC family members from the membrane to the cytosolic fraction (16, 45).

PKC is a monomeric enzyme responsible for phosphorylating serine/threonine residues in different targets. (45). In mammals are described 10 isoforms of PKC and its conventional isoform is comprised of four conserved regions (C1-C4) where the C1 region contains binding sites for diacylglycerols (DAG) and PMA, also known as 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA). In this study, i.a. administration of PMA was able to cause inflammation and nociception, therefore, DFMO reversed this effect (46).

Once activated, PKC can interact with different proteins, as ODC, leading to its activation [51]. ODC is a monomeric enzyme activated after its dimerization (47, 48) and is the main enzyme responsible for the synthesis of polyamines (18, 19, 25). Here we demonstrated that i.a. administration of L-ornithine (ODC enzyme substrate) caused both nociception and edema, similarly to MSU. These results may indicate that the modulation of polyamines production may be relevant for an acute gout attack.

In order to investigate the possible role of polyamines in the acute gout attack, putrescine, spermidine and spermine were administered intra-articularly. All polyamines promoted nociceptive and inflammatory



responses. Putrescine had less pro-inflammatory effect than spermidine. This pro-inflammatory potential difference were also demonstrated by Gewehr *et al.* (2011) and can be explained by structural difference of the polyamines, where spermine has a greater positive charge in relation to putrescine and spermidine, which is consistent with some studies showing that some polyamines actions on ion channels are charge dependent, being spermine (+4) was approximately twice as effective as spermidine (+3) and putrescine (+2) (49, 50).

Once polyamines are involved in inflammatory and painful conditions, causing pain and edema (25, 32) common symptoms that occur after MSU crystals injections, we infer the involvement of polyamines in the acute gout attack. To investigate it, we use DFMO, an irreversible inhibitor of ODC. The DFMO was able to inhibit nociception caused by MSU, as change some inflammatory parameters such as inhibiting the increase in ODC enzyme activity and inhibit the MPO enzyme activity; on the other hand, DFMO was not able to inhibit the edema caused by MSU.

DFMO was not able to reduce the increase of the arthritis score or the decrease of mechanical hyperalgesia induced by spermine. This result can be explained by the fact that the DFMO prevents the production of endogenous polyamines, through inhibition of the enzyme ODC. On the other hand, DFMO reduced nociceptive but not edematogenic parameters induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, PMA, and L-ornithine.

In conclusion, the i.a. administration of MSU was able to increase the production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, which in turn is initiating a cascade by activating PKC and ODC, culminating in the increase of production of polyamines. From this initial event, a possible mechanism of action can be unraveled, involving several proteins that are present in inflammatory pathways (Supplementary Fig. S3 available as supplementary data at Rheumatology Online). Thus, blocking of specific proteins such as ODC may be a pharmacological approach to completely suppress inflammation and pain in acute attacks of gout.

### **Key messages**

- Intra-articular administration of polyamines causes pain.
- DFMO prevents nociception caused by MSU.
- MSU increases the activity of the enzyme ODC.

## **Acknowledgements**

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

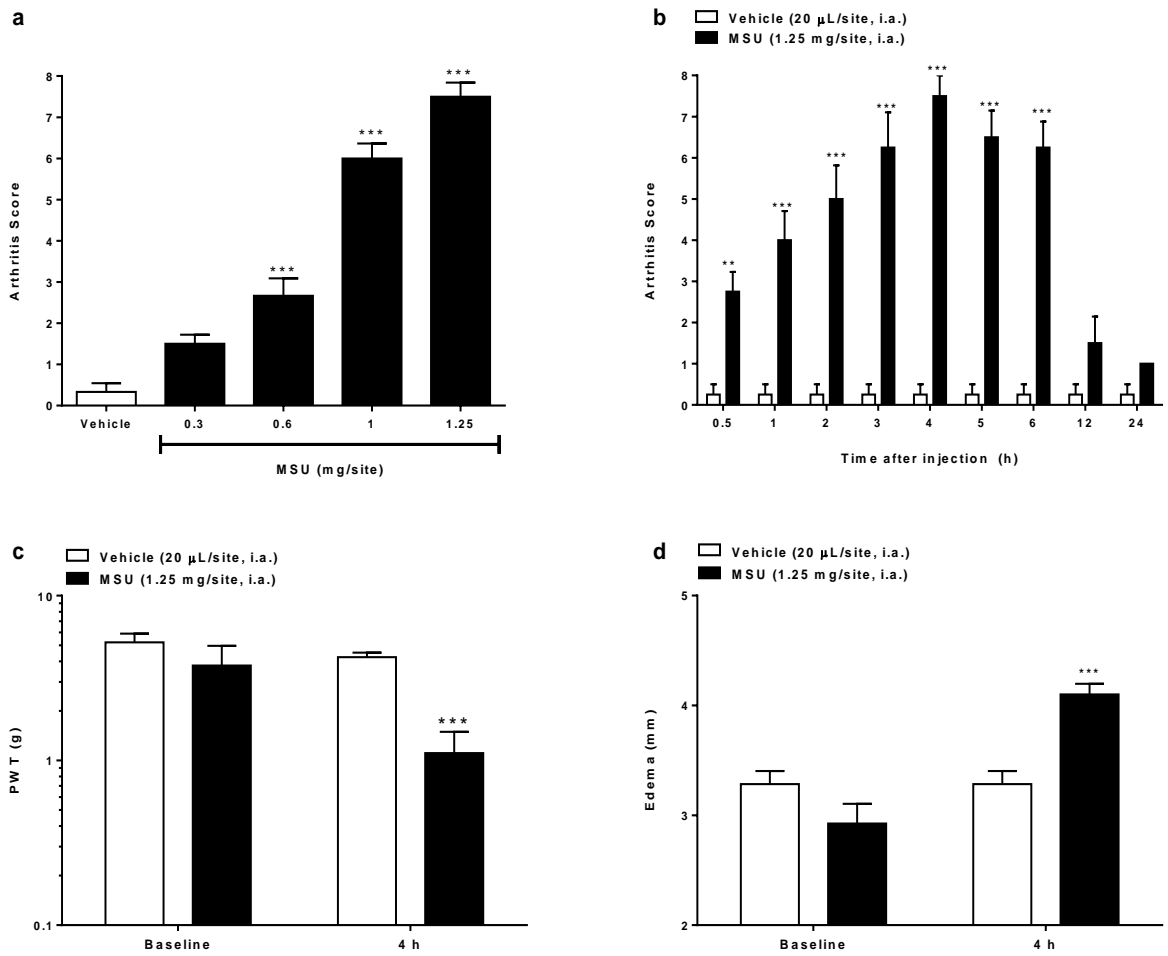
*Funding:* This work was supported by CNPq (grant number 306468/2014-0) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) (Brazil).

*Disclosure statement:* The authors declare that they have no conflict of interests.

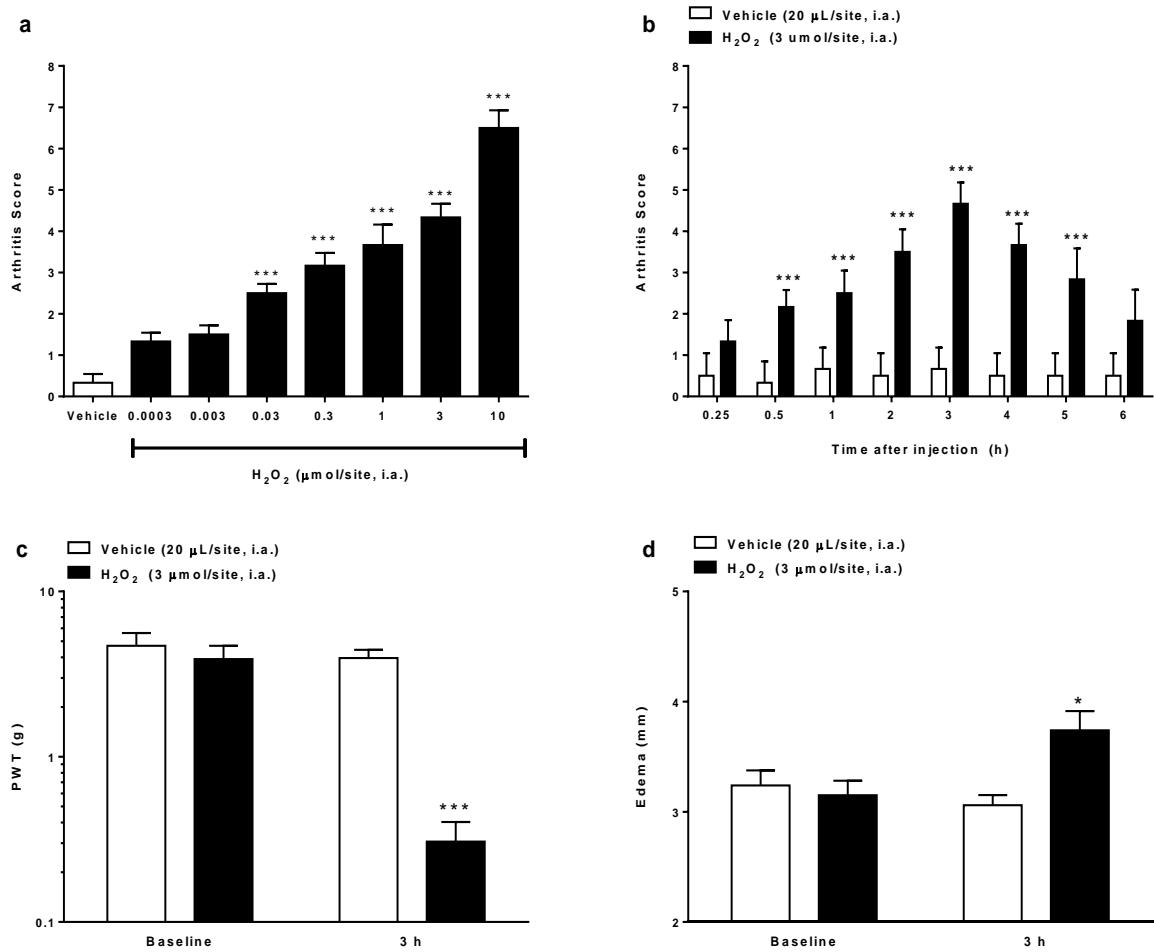
**Table 1** Effect of DFMO (10  $\mu$ mol/site) on the nociceptive and edematogenic responses elicited by intra-articular injection of different agents

<b>Treatment</b>	<b>Arthritis Score</b>	<b>Mechanical Threshold</b>	<b>Ankle thickness</b>
<b>Basal values</b>	0.33 $\pm$ 0.2	4.2 $\pm$ 0.3	3.3 $\pm$ 0.1
<b>MSU + vehicle</b>	6.0 $\pm$ 0.5 ###	1.1 $\pm$ 0.4 ###	4.1 $\pm$ 0.1###
<b>MSU + DFMO</b>	2.0 $\pm$ 0.3***	5.1 $\pm$ 0.5***	3.8 $\pm$ 0.1
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + Vehicle</b>	4.6 $\pm$ 2.1 ###	0.1 $\pm$ 0.1 ##	3.9 $\pm$ 0.2###
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + DFMO</b>	2.0 $\pm$ 0.2***	4.9 $\pm$ 1.3**	3.9 $\pm$ 0.1
<b>PMA + vehicle</b>	3.8 $\pm$ 0.2 ###	0.7 $\pm$ 0.2 ###	3.6 $\pm$ 0.1#
<b>PMA + DFMO</b>	1.9 $\pm$ 0.2***	4.5 $\pm$ 0.6***	3.5 $\pm$ 0.1
<b>ORN + vehicle</b>	3.3 $\pm$ 0.4 ###	0.5 $\pm$ 0.1 ###	3.7 $\pm$ 0.1##
<b>ORN + DFMO</b>	1.8 $\pm$ 0.3*	3 $\pm$ 0.4***	3.7 $\pm$ 0.2
<b>SPM + vehicle</b>	5.2 $\pm$ 0.3 ###	0.3 $\pm$ 0.2 ###	3.8 $\pm$ 0.1###
<b>SPM + DFMO</b>	4.5 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.3	3.5 $\pm$ 0.1

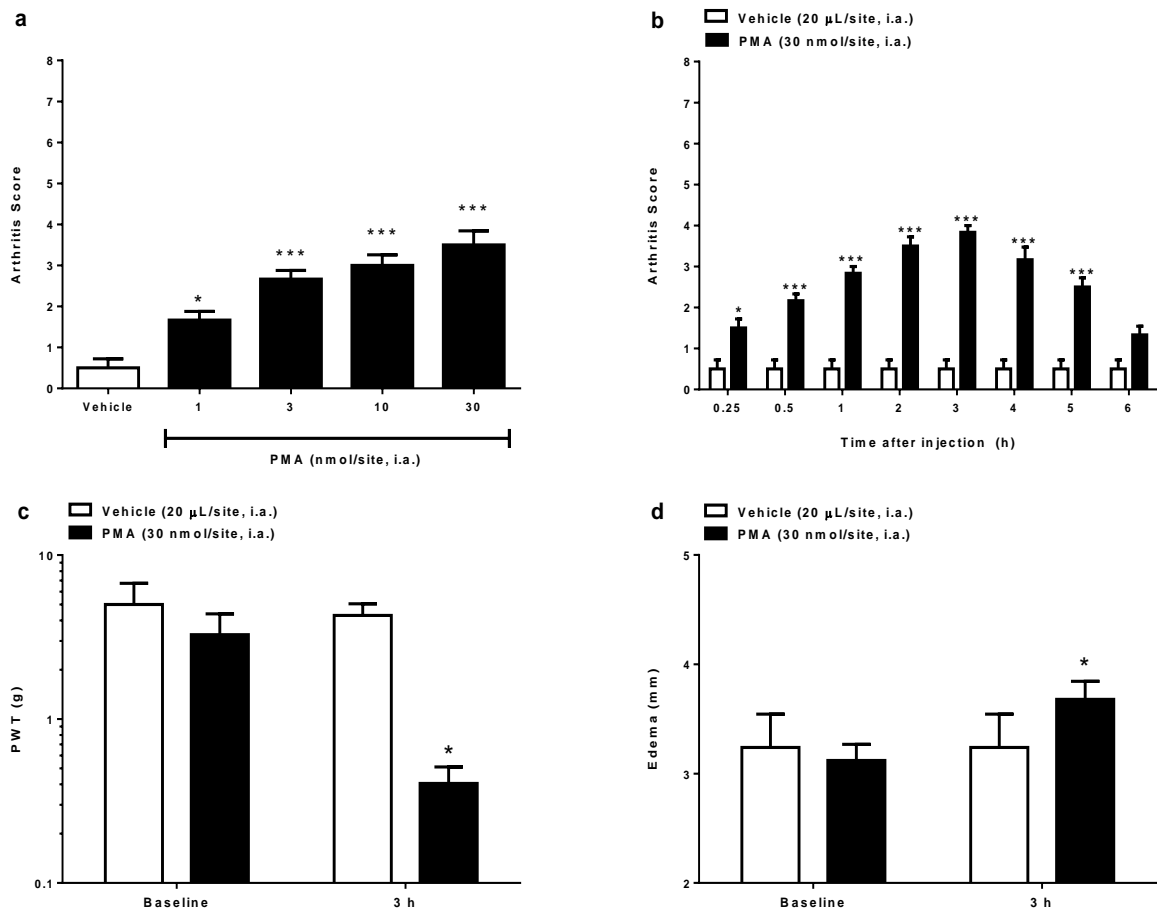
#p<0.05, ## p<0.005 and ### p<0.001 in comparison to basal values, and \*p<0.05, \*\* p<0.005 and \*\*\*p<0.001 in comparison to the respective vehicle-treated group, n=6 (animals/groups), based on one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Dunnet post-test. MSU (monosodium urate), PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate), PKC (protein kinase C), DFMO (DL- $\alpha$ -Difluoromethylornithine hydrochloride hydrate), ORN (L-ornithine) and SPM (spermine)



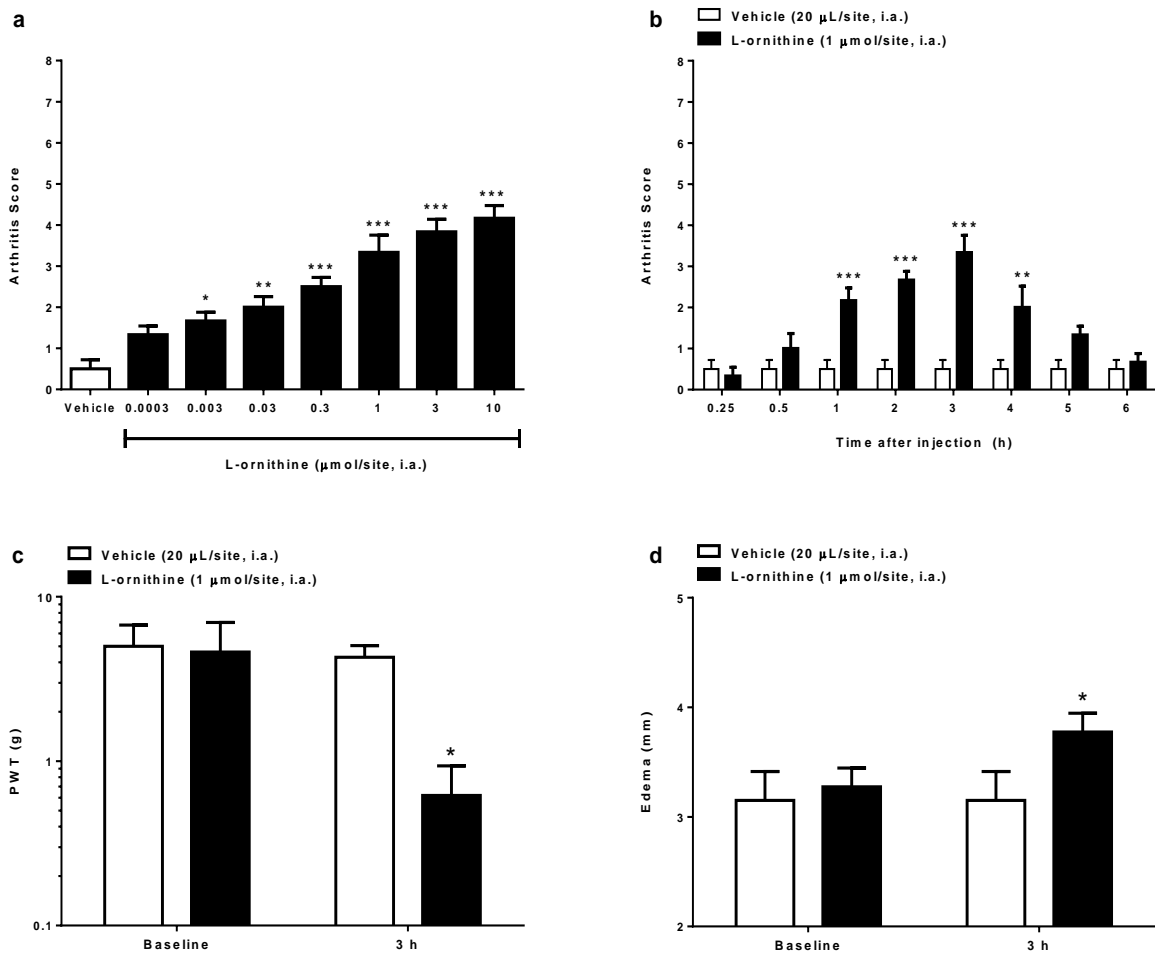
**Fig.1** Nociceptive and edematogenic responses caused by intra-articular (i.a.) injection of monosodium urate (MSU) crystals. Dose-response (a; 4 h after i.a. MSU injection) and time-course (b) curves for arthritis score (a and b), mechanical hyperalgesia (c) and ankle edema (d). Data are the means + SEM of 6 mice in each group. \*\* $P < 0.015$  and \*\*\* $P < 0.001$  when compared with the vehicle group (PBS); one-way (a) or two-way (b, c and d) ANOVA followed by Bonferroni post-test. Baseline on the x-axis represents the mechanical hyperalgesia measured immediately before i.a. MSU injection



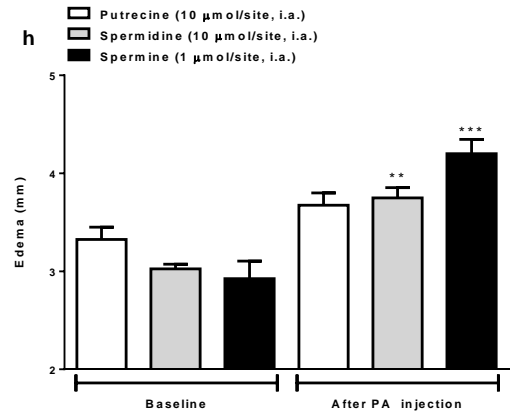
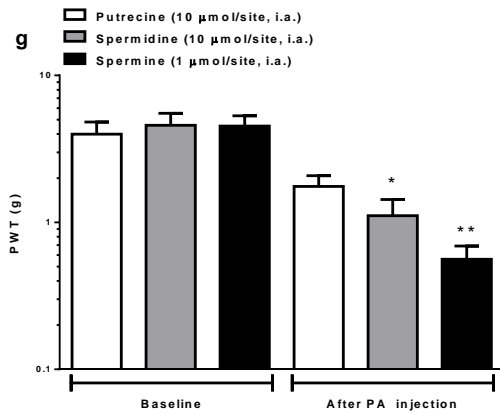
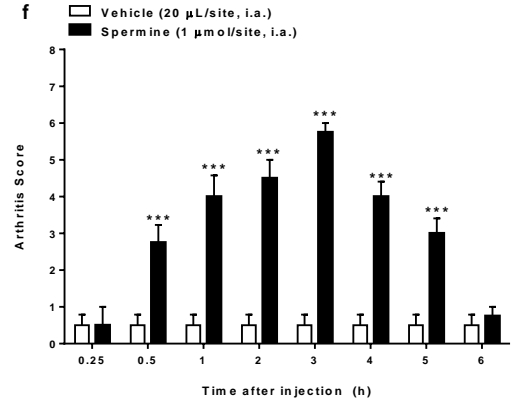
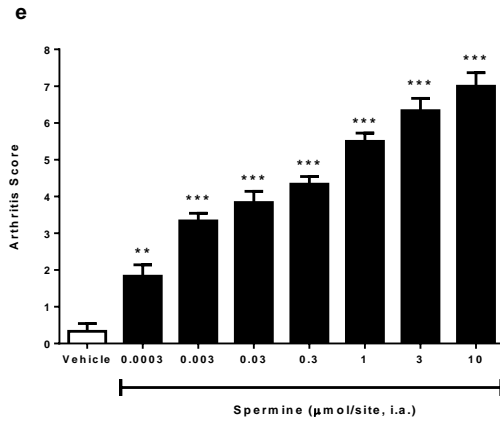
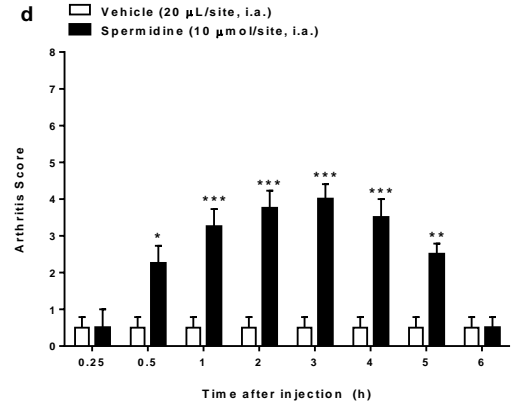
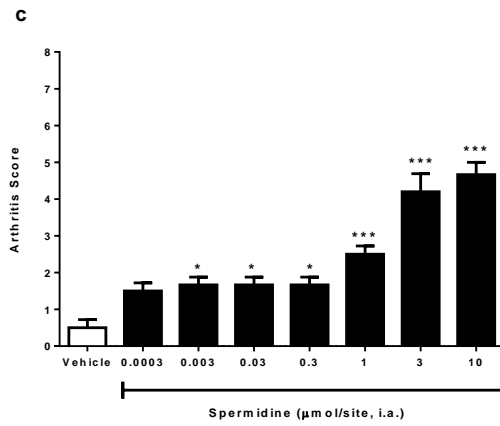
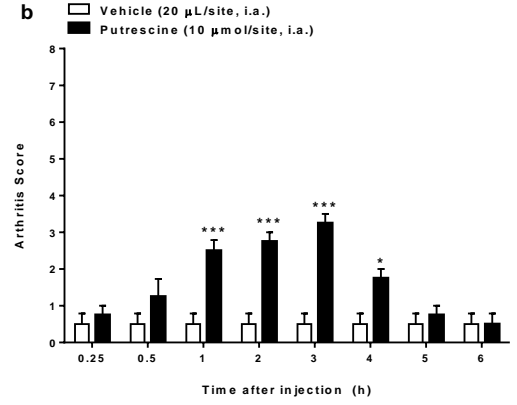
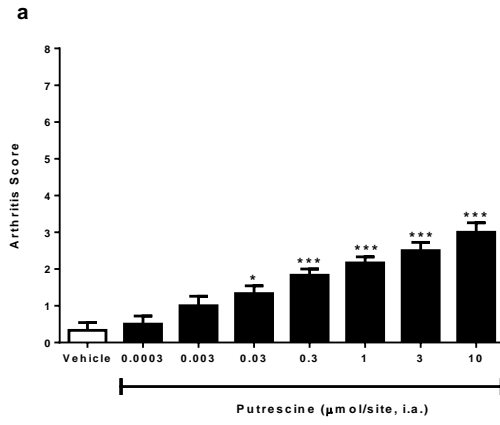
**Fig. 2** Nociceptive and edematogenic responses induced by intra-articular (i.a.) injection of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Dose-response (a; 3 h after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> injection) and time-course (b) curves for arthritis score (a and b), mechanical hyperalgesia (c) and ankle edema (d). Data are the means + SEM of 6 mice in each group. \**P*<0.05 and \*\*\**P*<0.001 when compared with the vehicle group (PBS); one-way (a) or two-way (b, c and d) ANOVA followed by Bonferroni post-test. Baseline on the x-axis represents the mechanical hyperalgesia measured immediately before i.a. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> injection



**Fig. 3** Nociceptive and edematogenic responses caused by intra-articular (i.a.) injection of Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA). Dose-response (a; 3 h after PMA injection) and time-course (b) curves for arthritis score (a and b), mechanical hyperalgesia (c) and ankle edema (d). Data are the means + SEM of 10 mice in each group. \* $P < 0.05$  and \*\*\* $P < 0.001$  when compared with the vehicle group (PBS); one-way (a) or two-way (b, c and d) ANOVA followed by Bonferroni post-test. Baseline on the x-axis represents the mechanical hyperalgesia measured immediately before i.a. PMA injection

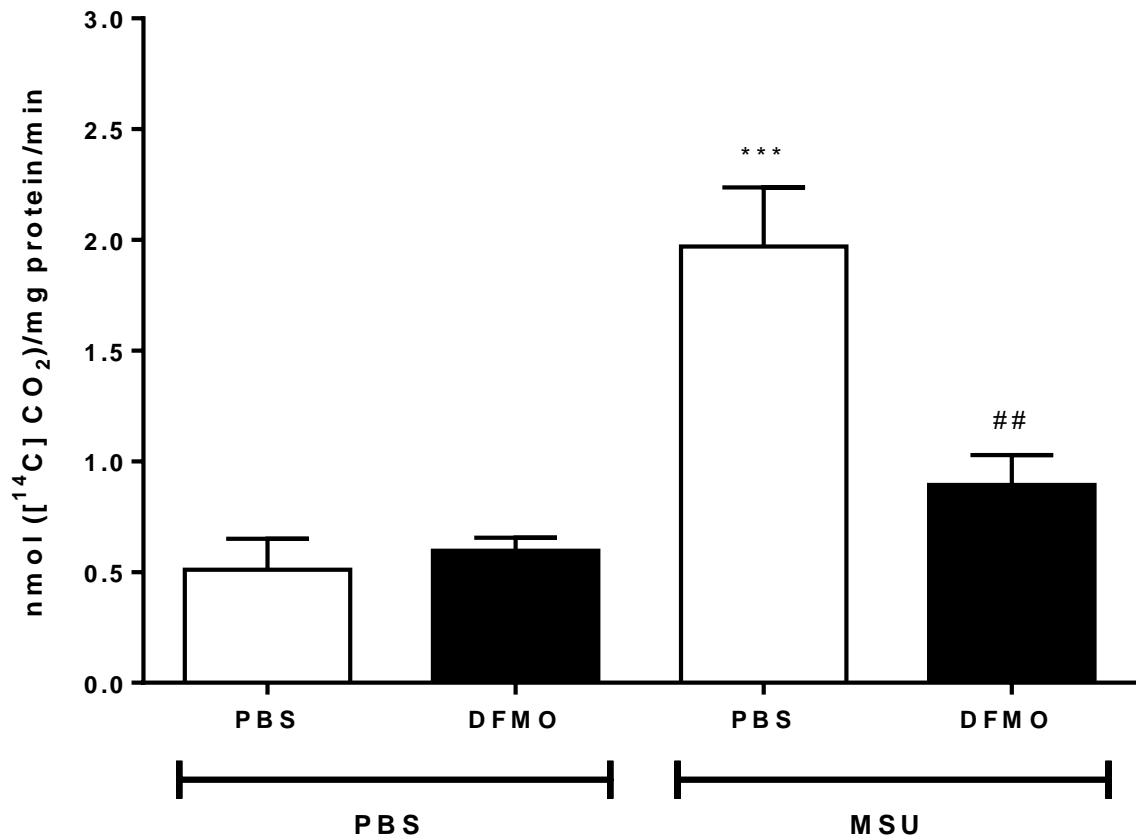


**Fig. 4** Nociceptive and edematogenic responses induced by intra-articular (i.a.) injection of L-ornithine. Dose-response (a; 3 h after L-ornithine injection) and time-course (b) curves for arthritis score (a and b), mechanical hyperalgesia (c) and ankle edema (d). Data are the means + SEM of 6 mice in each group. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$  when compared to the vehicle group (PBS); one-way (a) or two-way (b, c and d) ANOVA followed by Bonferroni post-test. Baseline on the x-axis represents the mechanical hyperalgesia measured immediately before i.a. L-ornithine injection

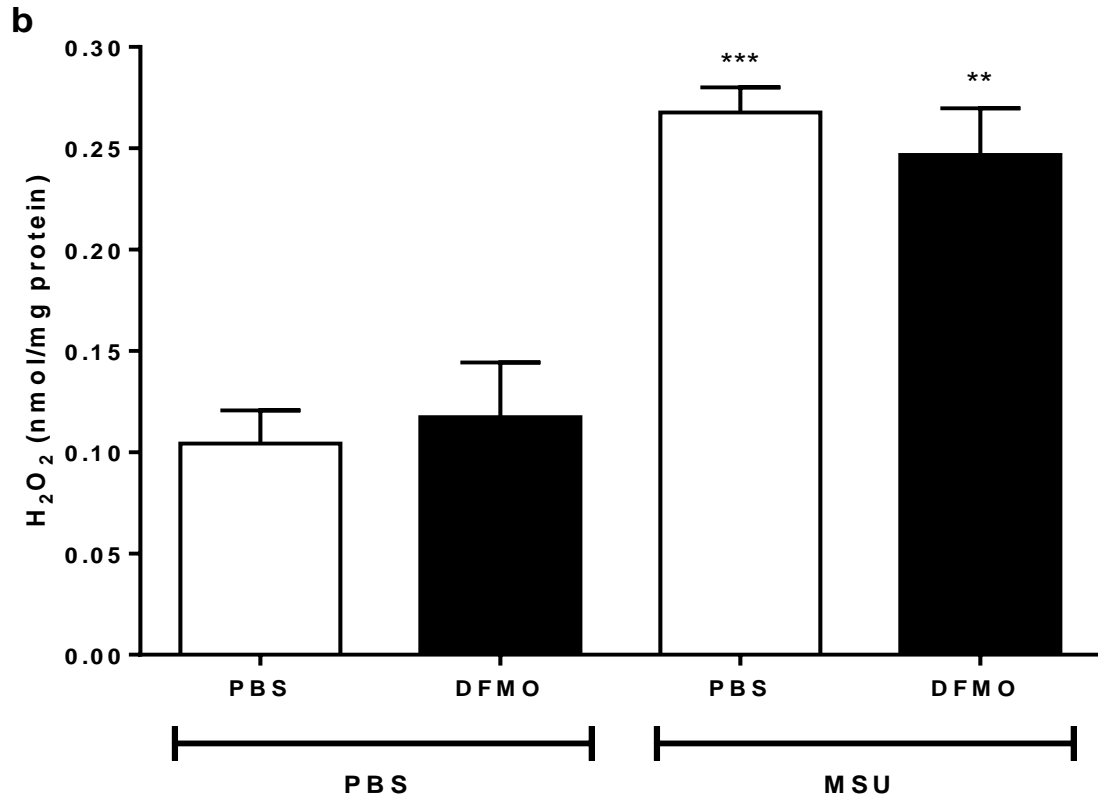
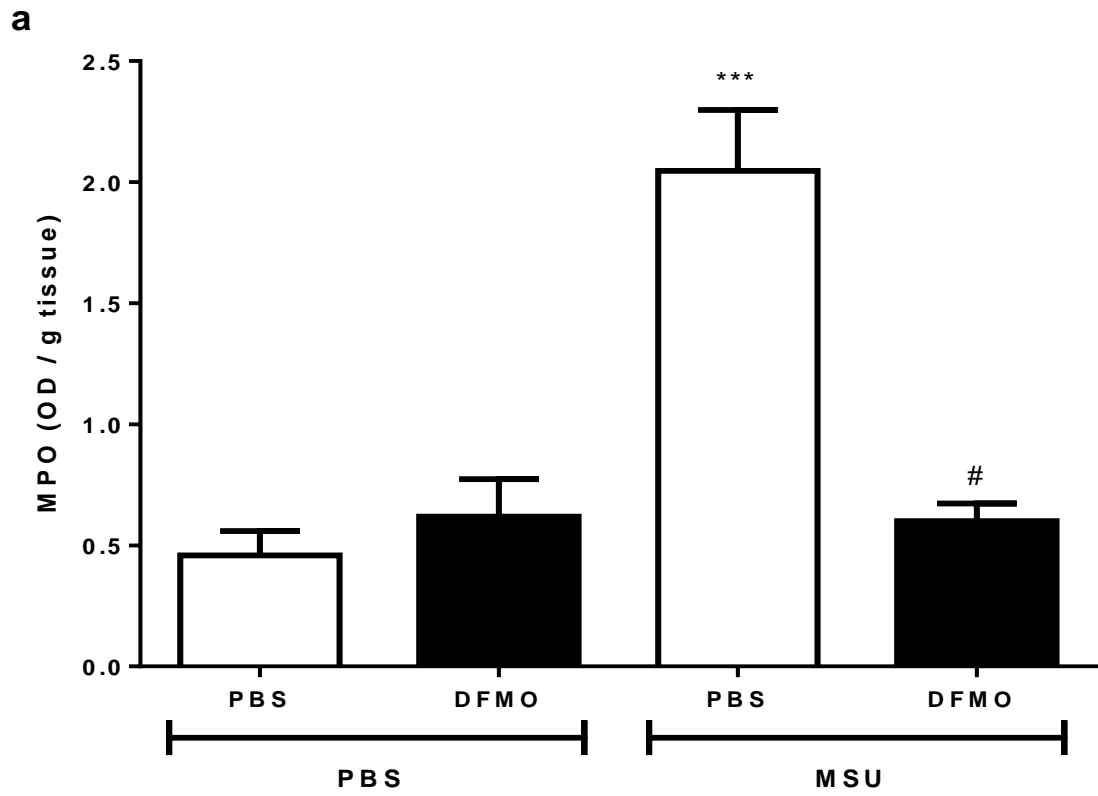




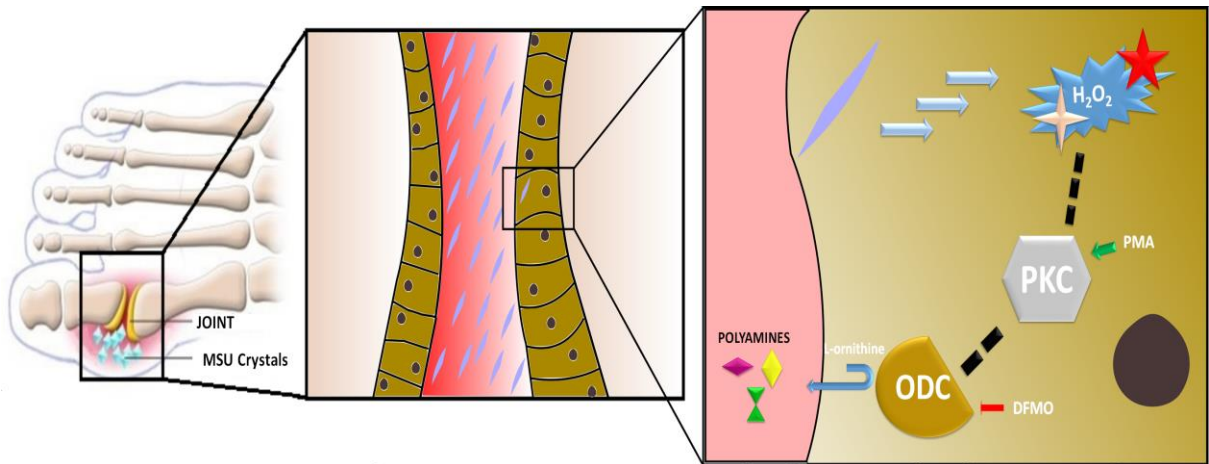
**Fig. 5** Nociceptive and edematogenic responses caused by intra-articular (i.a.) injection of polyamines (PA; putrescine, spermidine and spermine). Dose-response (a, c and e; 3 h after PA injection) and time-course (b, d and f) curves for arthritis score, mechanical hyperalgesia (g) and ankle edema (h). Data are the means + SEM of 10 mice in each group. \* $P < 0.05$  and \*\*\* $P < 0.001$  when compared with the vehicle group; one-way (a, c, e, g and h) or two-way (b, d and f) ANOVA followed by Bonferroni post-test. Baseline on the x-axis represents the mechanical threshold measured immediately before i.a. PA injection



**Fig. 6** DFMO reduces the increase of ornithine decarboxylase (ODC) activity induced by monosodium urate (MSU). The ODC activity was assessed 4h after the intra-articular injection of vehicle (PBS, 20  $\mu$ l) plus vehicle, vehicle plus DFMO (10 nmol/site), MSU (1.25 mg/site) plus vehicle or MSU plus DFMO. The data are the mean + SEM of 4 mice in each group. \*\*\* $P$ <0.001 compared to the vehicle and ## $P$ <0.005 compared to the MSU/vehicle group, based on two-way ANOVA followed by Bonferroni post-test



**Fig. 7** Effect of DFMO (10 nmol/site) on monosodium urate (MSU, 1.25 mg/kg) crystals-induced increased of inflammatory parameters. Myeloperoxidase (MPO) activity (a), and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production (b) were assessed 4 h after intra-articular (i.a.) injection of vehicle (PBS, 20 µl) plus vehicle, vehicle plus DFMO (10 nmol/site), MSU (1.25 mg/site) plus vehicle or MSU plus DFMO. Data are the means + SEM of 4-6 mice in each group. \*\*\* $P < 0.001$ , \*\* $P < 0.005$  when compared with the vehicle group and # $P < 0.05$  when compared with the MSU/vehicle group; two-way ANOVA followed by Bonfferroni post-test



**Fig. 8** The i.a. administration of MSU increased the production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, which in turn is initiating a cascade by activating PKC and ODC, culminating in the increase of production of polyamines and nociception.

## References

1. Ar'ev AL, Kunitskaya NA, Kozina LS. New Data on Gout and Hyperuricemia: Incidence Rates. *Adv Gerontol*. 2013;3(2):138–41.
2. Terkeltaub, 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*. 2006;8 Suppl 1:S4.
3. Choi HK, Mount DB, Reginato AM, American College of P, American Physiological S. Pathogenesis of gout. *Ann Intern Med*. 2005;143(7):499-516.
4. Nuki G, Simkin PA. A concise history of gout and hyperuricemia and their treatment. *Arthritis Res Ther*. 2006;8 Suppl 1:S1.
5. Richette P, Bardin T. Gout. *Lancet*. 2010;375(9711):318-28.
6. VanItallie TB. Gout: epitome of painful arthritis. *Metabolism*. 2010;59 Suppl 1:S32-6.
7. Dalbeth N, Haskard DO. Mechanisms of inflammation in gout. *Rheumatology (Oxford)*. 2005;44(9):1090-6.
8. Pascual E, Batlle-Gualda E, Martinez A, Rosas J, Vela P. Synovial fluid analysis for diagnosis of intercritical gout. *Ann Intern Med*. 1999;131(10):756-9.
9. Perez-Ruiz F, Herrero-Beites AM. Evaluation and treatment of gout as a chronic disease. *Adv Ther*. 2012;29(11):935-46.
10. Choi HK, Curhan G. Soft drinks, fructose consumption, and the risk of gout in men: prospective cohort study. *BMJ*. 2008;336(7639):309-12.
11. Wortmann RL. Gout and hyperuricemia. *Curr Opin Rheumatol*. 2002;14(3):281-6.
12. Terkeltaub. Clinical practice. Gout. *N Engl J Med*. 2003;349(17):1647-55.
13. Pillinger MH, Rosenthal P, Abeles AM. Hyperuricemia and gout: new insights into pathogenesis and treatment. *Bull NYU Hosp Jt Dis*. 2007;65(3):215-21.
14. Trevisan G, Hoffmeister C, Rossato MF, Oliveira SM, Silva MA, Ineu RP, et al. Transient receptor potential ankyrin 1 receptor stimulation by hydrogen peroxide is critical to trigger pain during monosodium urate-induced inflammation in rodents. *Arthritis Rheum*. 2013;65(11):2984-95.
15. Trevisan G, Hoffmeister C, Rossato MF, Oliveira SM, Silva MA, Silva CR, 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*. 2014;72:200-9.
16. Hadley SH, Bahia PK, Taylor-Clark TE. Sensory nerve terminal mitochondrial dysfunction activates airway sensory nerves via transient receptor potential (TRP) channels. *Mol Pharmacol*. 2013;83(5):1007-19.
17. Antal CE, Newton AC. Tuning the signalling output of protein kinase C. *Biochem Soc Trans*. 2014;42(6):1477-83.
18. Zhao YJ, Zhang WH, Xu CQ, Li HZ, Wang LN, Li H, et al. Involvement of the ornithine decarboxylase/polyamine system in precondition-induced cardioprotection through an interaction with PKC in rat hearts. *Mol Cell Biochem*. 2009;332(1-2):135-44.
19. Igarashi K, Kashiwagi K. Modulation of cellular function by polyamines. *Int J Biochem Cell Biol*. 2010;42(1):39-51.
20. Casero RA, Jr., Marton LJ. Targeting polyamine metabolism and function in cancer and other hyperproliferative diseases. *Nat Rev Drug Discov*. 2007;6(5):373-90.
21. Kusano T, Berberich T, Tateda C, Takahashi Y. Polyamines: essential factors for growth and survival. *Planta*. 2008;228(3):367-81.
22. Park MH, Igarashi K. Polyamines and Their Metabolites as Diagnostic Markers of Human Diseases. *Biomol Ther (Seoul)*. 2013;21(1):1-9.
23. Estebe JP, Legay F, Gentili M, Wodey E, Leduc C, Ecoffey C, et al. An evaluation of a polyamine-deficient diet for the treatment of inflammatory pain. *Anesth Analg*. 2006;102(6):1781-8.
24. Rivat C, Richebe P, Laboureyras E, Laulin JP, Havouis R, Noble F, et al. Polyamine deficient diet to relieve pain hypersensitivity. *Pain*. 2008;137(1):125-37.

25. Gewehr C, da Silva MA, dos Santos GT, Rossato MF, de Oliveira SM, Drewes CC, et al. Contribution of peripheral vanilloid receptor to the nociception induced by injection of spermine in mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 2011;99(4):775-81.
26. Ferrier J, Bayet-Robert M, Pereira B, Daulhac L, Eschali r A, Pezet D, et al. A polyamine-deficient diet prevents oxaliplatin-induced acute cold and mechanical hypersensitivity in rats. *PLoS One.* 2013;8(10):e77828.
27. Hoffmeister C, Trevisan G, Rossato MF, de Oliveira SM, Gomez MV, Ferreira J. Role of TRPV1 in nociception and edema induced by monosodium urate crystals in rats. *Pain.* 2011;152(8):1777-88.
28. Hoffmeister C, Silva MA, Rossato MF, Trevisan G, Oliveira SM, Guerra GP, et al. Participation of the TRPV1 receptor in the development of acute gout attacks. *Rheumatology (Oxford).* 2014;53(2):240-9.
29. Simjee SU, Jawed H, Quadri J, Saeed SA. Quantitative gait analysis as a method to assess mechanical hyperalgesia modulated by disease-modifying antirheumatoid drugs in the adjuvant-induced arthritic rat. *Arthritis Res Ther.* 2007;9(5):R91.
30. Rossato MF, Hoffmeister C, Tonello R, de Oliveira Ferreira AP, Ferreira J. Anti-inflammatory effects of vitamin E on adjuvant-induced arthritis in rats. *Inflammation.* 2015;38(2):606-15.
31. Dixon WJ. Efficient analysis of experimental observations. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1980;20:441-62.
32. Silva MA, Klafke JZ, Rossato MF, Gewehr C, Guerra GP, Rubin MA, et al. Role of peripheral polyamines in the development of inflammatory pain. *Biochem Pharmacol.* 2011;82(3):269-77.
33. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54.
34. Keeble J, Russell F, Curtis B, Starr A, Pinter E, Brain SD. Involvement of transient receptor potential vanilloid 1 in the vascular and hyperalgesic components of joint inflammation. *Arthritis Rheum.* 2005;52(10):3248-56.
35. Suzuki K, Ota H, Sasagawa S, Sakatani T, Fujikura T. Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. *Anal Biochem.* 1983;132(2):345-52.
36. Nakamura Y, Murakami A, Ohto Y, Torikai K, Tanaka T, Ohigashi H. Suppression of tumor promoter-induced oxidative stress and inflammatory responses in mouse skin by a superoxide generation inhibitor 1'-acetoxychavicol acetate. *Cancer Res.* 1998;58(21):4832-9.
37. Raisinghani M, Zhong L, Jeffry JA, Bishnoi M, Pabbidi RM, Pimentel F, et al. Activation characteristics of transient receptor potential ankyrin 1 and its role in nociception. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2011;301(3):C587-600.
38. Sirrieh RE, MacLean DM, Jayaraman V. Subtype-dependent N-methyl-D-aspartate receptor amino-terminal domain conformations and modulation by spermine. *J Biol Chem.* 2015;290(20):12812-20.
39. Martinon F. Update on biology: uric acid and the activation of immune and inflammatory cells. *Curr Rheumatol Rep.* 2010;12(2):135-41.
40. Malawista SE, de Boisfleury AC, Naccache PH. Inflammatory gout: observations over a half-century. *FASEB J.* 2011;25(12):4073-8.
41. Schlesinger N. Anti-interleukin-1 therapy in the management of gout. *Curr Rheumatol Rep.* 2014;16(2):398.
42. Martin WJ, Harper JL. Innate inflammation and resolution in acute gout. *Immunol Cell Biol.* 2010;88(1):15-9.
43. Scott P, Ma H, Viriyakosol S, Terkeltaub R, Liu-Bryan R. Engagement of CD14 mediates the inflammatory potential of monosodium urate crystals. *J Immunol.* 2006;177(9):6370-8.
44. Csato V, Peto A, Koller A, Edes I, Toth A, Papp Z. Hydrogen peroxide elicits constriction of skeletal muscle arterioles by activating the arachidonic acid pathway. *PLoS One.* 2014;9(8):e103858.
45. Steinberg SF. Mechanisms for redox-regulation of protein kinase C. *Front Pharmacol.* 2015;6:128.

46. Passos GF, Medeiros R, Marcon R, Nascimento AF, Calixto JB, Pianowski LF. The role of PKC/ERK1/2 signaling in the anti-inflammatory effect of tetracyclic triterpene euphol on TPA-induced skin inflammation in mice. *Eur J Pharmacol.* 2013;698(1-3):413-20.
47. Ramani D, De Bandt JP, Cynober L. Aliphatic polyamines in physiology and diseases. *Clin Nutr.* 2014;33(1):14-22.
48. Olsen RR, Zetter BR. Evidence of a role for antizyme and antizyme inhibitor as regulators of human cancer. *Mol Cancer Res.* 2011;9(10):1285-93.
49. Ahern GP, Wang X, Miyares RL. Polyamines are potent ligands for the capsaicin receptor TRPV1. *J Biol Chem.* 2006;281(13):8991-5.
50. Williams K. Interactions of polyamines with ion channels. *Biochem J.* 1997;325 ( Pt 2):289-97.



## 5. CONCLUSÕES

---

### 5. CONCLUSÕES

#### 5.1. Conclusões parciais

**5.1.1.** O MSU, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, PMA e L-ornitina, putrescina, espermidina e espermina induzem nocicepção em camundongos;

**5.1.2.** A inibição da ODC pelo DFMO preveniu nocicepção causada por MSU, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, PMA, L-ornitina, porém, o DFMO preveniu a nocicepção causada por espermina. O DFMO não preveniu o edema causado por nenhum agente administrado;

**5.1.3.** O DFMO preveniu um aumento da atividade da enzima MPO induzida por MSU. O DFMO preveniu um aumento da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induzida por MSU;

**5.1.4.** O MSU aumentou a atividade da enzima ODC, que por sua vez, esse aumento foi prevenido com a administração de DFMO.

## 5.2. Conclusão geral

Em conclusão, a administração i.a. de MSU foi capaz de aumentar a produção de  $H_2O_2$ , que por sua vez inicia uma cascata, ativando a PKC que ativa a ODC, culminando com o aumento da produção de poliaminas. A partir deste evento inicial, um possível mecanismo de ação pode ser desvendado, envolvendo várias proteínas que estão presentes nas vias inflamatórias. Assim, o bloqueio de proteínas específicas, tais como ODC pode ser uma abordagem farmacológica para suprimir completamente a inflamação e dor em ataques agudos de gota.

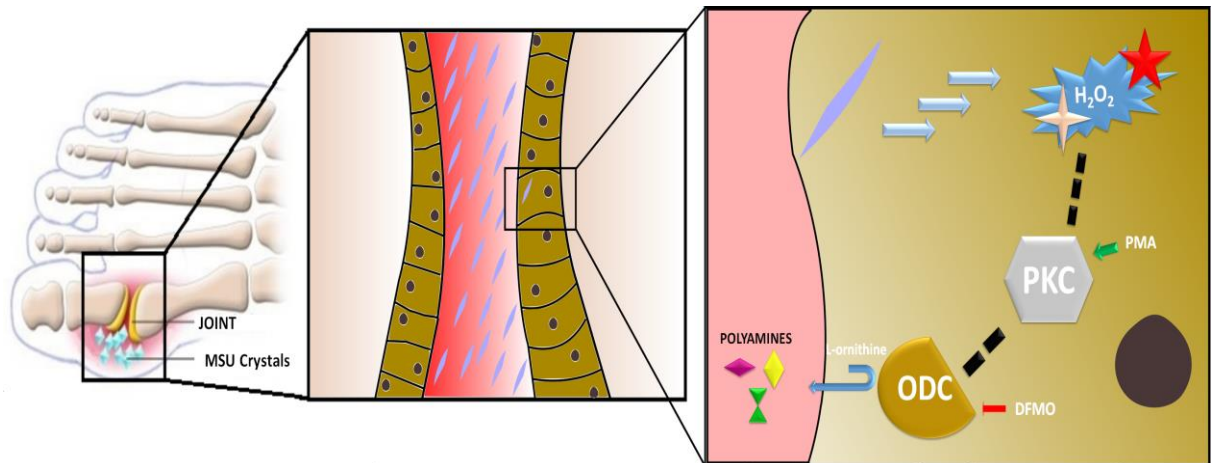


Figura 6 - Peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), Proteína cinase C (PKC), miristato de forbol 12-13-acetato (PMA) Ornitina descarboxilase (ODC),  $\alpha$ -Difluorometilornitina (DFMO).

## 6. BIBLIOGRAFIA

ABRAMSON, S.; HOFFSTEIN, S. T.; WEISSMANN, G. Superoxide anion generation by human neutrophils exposed to monosodium urate. **Arthritis Rheum**, v. 25, n. 2, p. 174-80, Feb 1982.

AHERN, G. P.; WANG, X.; MIYARES, R. L. Polyamines are potent ligands for the capsaicin receptor TRPV1. **J Biol Chem**, v. 281, n. 13, p. 8991-5, Mar 31 2006.

AR'EV, A. L.; KUNITSKAYA, N. A.; KOZINA, L. S. New Data on Gout and Hyperuricemia: Incidence Rates. **Adv Gerontol**, v. 3, n. 2, p. 138–141, 2013.

ASHBURN, M. A.; STAATS, P. S. Management of chronic pain. **Lancet**, v. 353, n. 9167, p. 1865-9, May 29 1999.

BACHRACH, U. Naturally occurring polyamines: interaction with macromolecules. **Curr Protein Pept Sci**, v. 6, n. 6, p. 559-66, Dec 2005.

BAKHAREVSKI, O. et al. Collagen induced arthritis in rats. Contrasting effect of subcutaneous versus intradermal inoculation of type II collagen. **J Rheumatol**, v. 25, n. 10, p. 1945-52, Oct 1998.

BASBAUM, A. I. et al. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 267-84, Oct 16 2009.

BESSON, J. M. The neurobiology of pain. **Lancet**, v. 353, n. 9164, p. 1610-5, May 8 1999.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, May 7 1976.

BRILL, J. M.; MCCARTY, D. J. "Studies on the Nature of Gouty Tophi" by Max Freudweiler, 1899. (an Inflammatory Response to Injected Sodium Urate, 1899). An Abridged Translation, with Comments. **Ann Intern Med**, v. 60, p. 486-505, Mar 1964.

CASERO, R. A., JR.; MARTON, L. J. Targeting polyamine metabolism and function in cancer and other hyperproliferative diseases. **Nat Rev Drug Discov**, v. 6, n. 5, p. 373-90, May 2007.

CASERO, R. A., JR.; PEGG, A. E. Spermidine/spermine N1-acetyltransferase--the turning point in polyamine metabolism. **FASEB J**, v. 7, n. 8, p. 653-61, May 1993.

CHEN, C. J. et al. MyD88-dependent IL-1 receptor signaling is essential for gouty inflammation stimulated by monosodium urate crystals. **J Clin Invest**, v. 116, n. 8, p. 2262-71, Aug 2006.

CHOI, H. K. A prescription for lifestyle change in patients with hyperuricemia and gout. **Curr Opin Rheumatol**, v. 22, n. 2, p. 165-72, Mar 2010.

CHOI, H. K.; CURHAN, G. Soft drinks, fructose consumption, and the risk of gout in men: prospective cohort study. **BMJ**, v. 336, n. 7639, p. 309-12, Feb 9 2008.

CHOI, H. K. et al. Pathogenesis of gout. **Ann Intern Med**, v. 143, n. 7, p. 499-516, Oct 4 2005.

CODERRE, T. J.; WALL, P. D. Ankle joint urate arthritis in rats provides a useful tool for the evaluation of analgesic and anti-arthritic agents. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 29, n. 3, p. 461-6, Mar 1988.

COFFINO, P. Antizyme, a mediator of ubiquitin-independent proteasomal degradation. **Biochimie**, v. 83, n. 3-4, p. 319-23, Mar-Apr 2001.

CSATO, V. et al. Hydrogen peroxide elicits constriction of skeletal muscle arterioles by activating the arachidonic acid pathway. **PLoS One**, v. 9, n. 8, p. e103858, 2014.

DALBETH, N.; HASKARD, D. O. Mechanisms of inflammation in gout. **Rheumatology (Oxford)**, v. 44, n. 9, p. 1090-6, Sep 2005.

DIACOVICH, L.; GORVEL, J. P. Bacterial manipulation of innate immunity to promote infection. **Nat Rev Microbiol**, v. 8, n. 2, p. 117-28, Feb 2010.

DIXON, W. J. Efficient analysis of experimental observations. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 20, p. 441-62, 1980.

DOHERTY, M.; WHICHER, J. T.; DIEPPE, P. A. Activation of the alternative pathway of complement by monosodium urate monohydrate crystals and other inflammatory particles. **Ann Rheum Dis**, v. 42, n. 3, p. 285-91, Jun 1983.

ESTEBE, J. P. et al. An evaluation of a polyamine-deficient diet for the treatment of inflammatory pain. **Anesth Analg**, v. 102, n. 6, p. 1781-8, Jun 2006.

FAIRES, J. S.; MCCARTY, J. D. J. Acute arthritis in man and dog after intrasynovial injection of sodium urate crystals. **Lancet**, v. 2, p. 682-685, 1962.

FERRIER, J. et al. A polyamine-deficient diet prevents oxaliplatin-induced acute cold and mechanical hypersensitivity in rats. **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. e77828, 2013.

FIELDS, T. R. et al. Activation of the alternative pathway of complement by monosodium urate crystals. **Clin Immunol Immunopathol**, v. 26, n. 2, p. 249-57, Feb 1983.

FISHMAN, S. M. Recognizing pain management as a human right: a first step. **Anesth Analg**, v. 105, n. 1, p. 8-9, Jul 2007.

GEWEHR, C. et al. Contribution of peripheral vanilloid receptor to the nociception induced by injection of spermine in mice. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 99, n. 4, p. 775-81, Oct 2011.

GICLAS, P. C.; GINSBERG, M. H.; COOPER, N. R. Immunoglobulin G independent activation of the classical complement pathway by monosodium urate crystals. **J Clin Invest**, v. 63, n. 4, p. 759-64, Apr 1979.

HADLEY, S. H.; BAHIA, P. K.; TAYLOR-CLARK, T. E. Sensory nerve terminal mitochondrial dysfunction activates airway sensory nerves via transient receptor potential (TRP) channels. **Mol Pharmacol**, v. 83, n. 5, p. 1007-19, May 2013.

HIGAZI, A. A.-R.; BARGHOUTI, II. Inactivation of human anaphylatoxin C5a and C5a des-Arg through cleavage by the plasminogen activator activity of a human fibrosarcoma cell line. **J Biol Chem**, v. 269, n. 41, p. 25529-33, Oct 14 1994.

HOFFMEISTER, C. et al. Participation of the TRPV1 receptor in the development of acute gout attacks. **Rheumatology (Oxford)**, v. 53, n. 2, p. 240-9, Feb 2014.

HOFFMEISTER, C. et al. Role of TRPV1 in nociception and edema induced by monosodium urate crystals in rats. **Pain**, v. 152, n. 8, p. 1777-88, Aug 2011.

HUNT, S. P.; MANTYH, P. W. The molecular dynamics of pain control. **Nat Rev Neurosci**, v. 2, n. 2, p. 83-91, Feb 2001.

IGARASHI, K.; KASHIWAGI, K. Modulation of cellular function by polyamines. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 42, n. 1, p. 39-51, Jan 2010.

JANNE, J. et al. Genetic approaches to the cellular functions of polyamines in mammals. **Eur J Biochem**, v. 271, n. 5, p. 877-94, Mar 2004.

KEEBLE, J. et al. Involvement of transient receptor potential vanilloid 1 in the vascular and hyperalgesic components of joint inflammation. **Arthritis Rheum**, v. 52, n. 10, p. 3248-56, Oct 2005.

KERGOZIEN, S. et al. Polyamine deprivation provokes an antalgic effect. **Life Sci**, v. 58, n. 24, p. 2209-15, 1996.

KIM, H. J. et al. Clinical significance of synovial fluid total hemolytic complement activity. **J Rheumatol**, v. 7, n. 2, p. 143-52, Mar-Apr 1980.

KUNER, R. Central mechanisms of pathological pain. **Nat Med**, v. 16, n. 11, p. 1258-66, Nov 2010.

KUSANO, T. et al. Polyamines: essential factors for growth and survival. **Planta**, v. 228, n. 3, p. 367-81, Aug 2008.

- LIU, W. S.; HECKMAN, C. A. The sevenfold way of PKC regulation. **Cell Signal**, v. 10, n. 8, p. 529-42, Sep 1998.
- LOESER, J. D.; TREEDE, R. D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**, v. 137, n. 3, p. 473-7, Jul 31 2008.
- LOHMAN, D.; SCHLEIFER, R.; AMON, J. J. Access to pain treatment as a human right. **BMC Med**, v. 8, p. 8, 2010.
- MALAWISTA, S. E.; DE BOISFLEURY, A. C.; NACCACHE, P. H. Inflammatory gout: observations over a half-century. **FASEB J**, v. 25, n. 12, p. 4073-8, Dec 2011.
- MANDELL, B. F. Clinical manifestations of hyperuricemia and gout. **Cleve Clin J Med**, v. 75 Suppl 5, p. S5-8, Jul 2008.
- MANTHEY, H. D. et al. Complement component 5a (C5a). **Int J Biochem Cell Biol**, v. 41, n. 11, p. 2114-7, Nov 2009.
- MARCHAND, F.; PERRETTI, M.; MCMAHON, S. B. Role of the immune system in chronic pain. **Nat Rev Neurosci**, v. 6, n. 7, p. 521-32, Jul 2005.
- MARTIN-LIBERAL, J. et al. Targeting protein kinase C in sarcoma. **Biochim Biophys Acta**, v. 1846, n. 2, p. 547-59, Dec 2014.
- MARTIN, W. J.; HARPER, J. L. Innate inflammation and resolution in acute gout. **Immunol Cell Biol**, v. 88, n. 1, p. 15-9, Jan 2010.
- MARTINON, F. Update on biology: uric acid and the activation of immune and inflammatory cells. **Curr Rheumatol Rep**, v. 12, n. 2, p. 135-41, Apr 2010.
- MILLER-FLEMING, L. et al. Remaining Mysteries of Molecular Biology: The Role of Polyamines in the Cell. **J Mol Biol**, Jul 5 2015.
- MONY, L. et al. Molecular basis of positive allosteric modulation of GluN2B NMDA receptors by polyamines. **EMBO J**, v. 30, n. 15, p. 3134-46, Aug 3 2011.
- NAKAMURA, Y. et al. Suppression of tumor promoter-induced oxidative stress and inflammatory responses in mouse skin by a superoxide generation inhibitor 1'-acetoxychavicol acetate. **Cancer Res**, v. 58, n. 21, p. 4832-9, Nov 1 1998.
- NEOGI, T. Clinical practice. Gout. **N Engl J Med**, v. 364, n. 5, p. 443-52, Feb 3 2011.

NISHIZUKA, Y. The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. **Nature**, v. 308, n. 5961, p. 693-8, Apr 19-25 1984.

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

OLSEN, R. R.; ZETTER, B. R. Evidence of a role for antizyme and antizyme inhibitor as regulators of human cancer. **Mol Cancer Res**, v. 9, n. 10, p. 1285-93, Oct 2011.

PARK, M. H.; IGARASHI, K. Polyamines and Their Metabolites as Diagnostic Markers of Human Diseases. **Biomol Ther (Seoul)**, v. 21, n. 1, p. 1-9, Jan 2013.

PASCUAL, E. et al. Synovial fluid analysis for diagnosis of intercritical gout. **Ann Intern Med**, v. 131, n. 10, p. 756-9, Nov 16 1999.

PASSOS, G. F. et al. The role of PKC/ERK1/2 signaling in the anti-inflammatory effect of tetracyclic triterpene euphol on TPA-induced skin inflammation in mice. **Eur J Pharmacol**, v. 698, n. 1-3, p. 413-20, Jan 5 2013.

PEKIN, T. J., JR.; ZVAIFLER, N. J. Hemolytic Complement in Synovial Fluid. **J Clin Invest**, v. 43, p. 1372-82, Jul 1964.

PEREZ-RUIZ, F.; HERRERO-BEITES, A. M. Evaluation and treatment of gout as a chronic disease. **Adv Ther**, v. 29, n. 11, p. 935-46, Nov 2012.

PILLINGER, M. H.; ROSENTHAL, P.; ABELES, A. M. Hyperuricemia and gout: new insights into pathogenesis and treatment. **Bull NYU Hosp Jt Dis**, v. 65, n. 3, p. 215-21, 2007.

POPA-NITA, O.; NACCACHE, P. H. Crystal-induced neutrophil activation. **Immunol Cell Biol**, v. 88, n. 1, p. 32-40, Jan 2010.

RAISINGHANI, M. et al. Activation characteristics of transient receptor potential ankyrin 1 and its role in nociception. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 301, n. 3, p. C587-600, Sep 2011.

RAMANI, D.; DE BANDT, J. P.; CYNOBER, L. Aliphatic polyamines in physiology and diseases. **Clin Nutr**, v. 33, n. 1, p. 14-22, Feb 2014.

RHEE, H. J.; KIM, E. J.; LEE, J. K. Physiological polyamines: simple primordial stress molecules. **J Cell Mol Med**, v. 11, n. 4, p. 685-703, Jul-Aug 2007.

RICH, A. M. et al. Granules are necessary for death of neutrophils after phagocytosis of crystalline monosodium urate. **Inflammation**, v. 9, n. 3, p. 221-32, Sep 1985.

RICHETTE, P.; BARDIN, T. Gout. **Lancet**, v. 375, n. 9711, p. 318-28, Jan 23 2010.

RIVAT, C. et al. Polyamine deficient diet to relieve pain hypersensitivity. **Pain**, v. 137, n. 1, p. 125-37, Jul 2008.

ROCK, K. L.; KATAOKA, H.; LAI, J. J. Uric acid as a danger signal in gout and its comorbidities. **Nat Rev Rheumatol**, v. 9, n. 1, p. 13-23, Jan 2013.

ROSSATO, M. F. et al. Anti-inflammatory effects of vitamin E on adjuvant-induced arthritis in rats. **Inflammation**, v. 38, n. 2, p. 606-15, Apr 2015.

RUSSO, C. M.; BROSE, W. G. Chronic pain. **Annu Rev Med**, v. 49, p. 123-33, 1998.

SAAG, K. G.; CHOI, H. Epidemiology, risk factors, and lifestyle modifications for gout. **Arthritis Res Ther**, v. 8 Suppl 1, p. S2, 2006.

SAKATA, K.; KASHIWAGI, K.; IGARASHI, K. Properties of a polyamine transporter regulated by antizyme. **Biochem J**, v. 347 Pt 1, p. 297-303, Apr 1 2000.

SCHLESINGER, N. Anti-interleukin-1 therapy in the management of gout. **Curr Rheumatol Rep**, v. 16, n. 2, p. 398, Feb 2014.

SCOTT, P. et al. Engagement of CD14 mediates the inflammatory potential of monosodium urate crystals. **J Immunol**, v. 177, n. 9, p. 6370-8, Nov 1 2006.

SHAH, P.; SWIATLO, E. A multifaceted role for polyamines in bacterial pathogens. **Mol Microbiol**, v. 68, n. 1, p. 4-16, Apr 2008.

SILVA, M. A. et al. Role of peripheral polyamines in the development of inflammatory pain. **Biochem Pharmacol**, v. 82, n. 3, p. 269-77, Aug 1 2011.

SIMJEE, S. U. et al. Quantitative gait analysis as a method to assess mechanical hyperalgesia modulated by disease-modifying antirheumatoid drugs in the adjuvant-induced arthritic rat. **Arthritis Res Ther**, v. 9, n. 5, p. R91, 2007.

SIRRIEH, R. E.; MACLEAN, D. M.; JAYARAMAN, V. Subtype-dependent N-methyl-D-aspartate receptor amino-terminal domain conformations and modulation by spermine. **J Biol Chem**, v. 290, n. 20, p. 12812-20, May 15 2015.

SMITH, H. S.; BRACKEN, D.; SMITH, J. M. Gout: current insights and future perspectives. **J Pain**, v. 12, n. 11, p. 1113-29, Nov 2011.



STEINBERG, S. F. Mechanisms for redox-regulation of protein kinase C. **Front Pharmacol**, v. 6, p. 128, 2015.

SUZUKI, K. et al. Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. **Anal Biochem**, v. 132, n. 2, p. 345-52, Jul 15 1983.

SUZUKI, T. et al. Antizyme protects against abnormal accumulation and toxicity of polyamines in ornithine decarboxylase-overproducing cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 91, n. 19, p. 8930-4, Sep 13 1994.

TERKELTAUB. Clinical practice. Gout. **N Engl J Med**, v. 349, n. 17, p. 1647-55, Oct 23 2003.

TERKELTAUB; BUSHINSKY, D. A.; BECKER, M. A. Recent developments in our understanding of the renal basis of hyperuricemia and the development of novel antihyperuricemic therapeutics. **Arthritis Res Ther**, v. 8 Suppl 1, p. S4, 2006.

TERKELTAUB, R. Gout. Novel therapies for treatment of gout and hyperuricemia. **Arthritis Res Ther**, v. 11, n. 4, p. 236, 2009.

TRAMONTINI, N. et al. Central role of complement membrane attack complex in monosodium urate crystal-induced neutrophilic rabbit knee synovitis. **Arthritis Rheum**, v. 50, n. 8, p. 2633-9, Aug 2004.

TREVISAN, G. et al. Transient receptor potential ankyrin 1 receptor stimulation by hydrogen peroxide is critical to trigger pain during monosodium urate-induced inflammation in rodents. **Arthritis Rheum**, v. 65, n. 11, p. 2984-95, Nov 2013.

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, Jul 2014.

VANITALLIE, T. B. Gout: epitome of painful arthritis. **Metabolism**, v. 59 Suppl 1, p. S32-6, Oct 2010.

VUJCIC, S. et al. Identification and characterization of a novel flavin-containing spermine oxidase of mammalian cell origin. **Biochem J**, v. 367, n. Pt 3, p. 665-75, Nov 1 2002.

WALLACE, H. M.; FRASER, A. V.; HUGHES, A. A perspective of polyamine metabolism. **Biochem J**, v. 376, n. Pt 1, p. 1-14, Nov 15 2003.

WEBSTER, M. E. 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, n. 2, p. 185-98, 1972.

WILLIAMS, K. Interactions of polyamines with ion channels. **Biochem J**, v. 325 ( Pt 2), p. 289-97, Jul 15 1997.

WOOLF, C. J. What is this thing called pain? **J Clin Invest**, v. 120, n. 11, p. 3742-4, Nov 2010.

WOOLF, C. J.; MANNION, R. J. Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. **Lancet**, v. 353, n. 9168, p. 1959-64, Jun 5 1999.

WORTMANN, R. L. Gout and hyperuricemia. **Curr Opin Rheumatol**, v. 14, n. 3, p. 281-6, May 2002.

YUKIOKA, K. et al. Polyamine levels in synovial tissues and synovial fluids of patients with rheumatoid arthritis. **J Rheumatol**, v. 19, n. 5, p. 689-92, May 1992.

ZHAO, Y. J. et al. Involvement of the ornithine decarboxylase/polyamine system in precondition-induced cardioprotection through an interaction with PKC in rat hearts. **Mol Cell Biochem**, v. 332, n. 1-2, p. 135-44, Dec 2009.