



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

**PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR TRPV1 NA  
NOCICEPÇÃO E NO EDEMA INDUZIDOS POR  
CRISTAIS DE URATO MONOSSÓDICO EM RATOS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Carin Gorete Hendges Hoffmeister**

**Santa Maria, RS, Brasil 2009**

**PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR TRPV1 NA NOCICEPÇÃO  
E NO EDEMA INDUZIDO POR CRISTAIS DE URATO  
MONOSSÓDICO EM RATOS**

---

**Por**

**Carin Gorete Hendges Hoffmeister**

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

**Orientador Juliano Ferreira**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2009**

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia**

A comissão examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR TRPV1 NA NOCICEPÇÃO E NO  
EDEMA INDUZIDO POR CRISTAIS DE URATO MONOSÓDICO EM  
RATOS**

elaborada por

**Carin Gorete Hendges Hoffmeister**

como requisito parcial para obtenção do grau de

**Mestre em Farmacologia**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

**Juliano Ferreira**

**(Orientador)**

---

**Maria Rosa C. Schetinger (UFSM)**

---

**Luiz Fernando Freire Royes (UFSM)**

**Santa Maria, 14 de agosto de 2009**

“Sou o que quero ser, porque possuo apenas uma vida e  
nela só tenho uma chance de fazer o que quero.  
Tenho felicidade o bastante para fazê-la doce,  
dificuldades para fazê-la forte,  
tristeza para fazê-la humana e  
esperança suficiente para fazê-la feliz.  
As pessoas mais felizes não tem as melhores coisas,  
elas sabem fazer o melhor das oportunidades  
que aparecem em seus caminhos.”

Clarice Lispector



## **AGRADECIMENTOS**

Ao professor Juliano Ferreira, pela oportunidade, pela orientação e pelo exemplo de caráter profissional que contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional.

Aos professores Maribel Antonello Rubin e Carlos Fernando de Mello, pela acolhida e colaboração na realização deste trabalho.

À minha querida e grande amiga de todas as horas Flávia Rigo pela força, pelo amparo e por tantos momentos compartilhados.

Aos colegas de laboratório, pela ajuda e pela amizade, em especial aos meus amigos Mateus e Gabriela, meus “co-orientadores”, aos quais tenho grande admiração e afeto; sem vocês a realização desse trabalho não seria possível. Obrigada pela paciência e pelos ensinamentos.

Aos meus pais Osmar e Glaci pelo incentivo constante na busca do meu ideal, à minha irmã Camila pelas palavras de ânimo.

Ao amor da minha vida, Paulo Eduardo, pelo carinho e apoio, pelo cuidado e pela presença constante em todos os momentos importantes da minha história.

Aos funcionários e professores do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia que, de diferentes formas, contribuíram para a minha formação científica.

Agradeço, enfim, à Universidade Federal de Santa Maria, pela oportunidade e ao CNPq, pelo apoio financeiro.

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia  
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

### **PAPEL DO RECEPTOR TRPV1 NA NOCICEPÇÃO E NO EDMA INDUZIDO POR CRISTAIS DE URATO MONOSSÓDICO EM RATOS**

Autora: Carin G. H. Hoffmeister

Orientador: Juliano Ferreira

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 14 de agosto de 2009.

A gota é caracterizada pela deposição de cristais de urato monossódico (MSU) nas articulações. Apesar de ser um dos mais dolorosos tipos de artrite, os mecanismos responsáveis pela indução da dor durante os ataques agudos de gota são pouco entendidos. No presente estudo, objetivamos investigar o papel do receptor TRPV1 na nocicepção e edema induzidos por cristais de MSU em ratos. Assim, demonstramos que o MSU causa nocicepção ( $DE_{50}=0.04$  (0.01-0.11) mg/pata) e edema dependentes da dose ( $DE_{50}=0.08$  (0.04-0.16) mg/pata) quando injetado na pata dos ratos. O tratamento com o antagonista seletivo do receptor vanilóide TRPV1 SB 366791 inibiu significativamente as respostas nociceptiva e edematogênica causadas pelo MSU. De maneira semelhante, a dessensibilização de fibras aferentes sensíveis a capsaicina bem como o tratamento com o antagonista do receptor para taquicinina  $NK_1$  RP67580 também reduziram significativamente a nocicepção e o edema induzidos pelo MSU. Sabendo que estudos prévios demonstraram que MSU induz a estimulação de mastócitos, nós investigamos a participação destas células nos efeitos do MSU. A desgranulação prévia de mastócitos por tratamento repetido com o composto 48/80 reduziu a nocicepção e o edema induzidos pelo MSU assim como os níveis de histamina e serotonina no tecido injetado. Adicionalmente, o tratamento com o estabilizador de membrana de mastócitos cromolina, reduziu efetivamente as respostas nociceptivas e edematogênicas ao MSU. A administração de MSU induziu a liberação de histamina, serotonina e triptase no tecido injetado, confirmando a desgranulação mastocitária. Além disso, o antagonismo de receptores histaminérgicos  $H_1$  e serotoninérgicos, reduziram o edema, mas não a nocicepção causados pelo MSU. Finalmente, a inibição da atividade da triptase foi capaz de reduzir amplamente a nocicepção e o edema induzidos pelo MSU. Coletivamente, nossos resultados demonstram que o MSU produz uma resposta nociceptiva e edematogênica mediada pela ativação do receptor TRPV1 e pela desgranulação de mastócitos.

Palavras chave: dor, gota, mastócito, capsaicina, triptase.

## **ABSTRACT**

Dissertation of Master's Degree  
Graduate Course in Pharmacology  
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

### **ROLE OF TRPV1 ON NOCICEPTION AND EDEMA INDUCED BY MONOSODIUM URATE CRYSTALS IN RATS**

Author: Carin G. H. Hoffmeister

Advisor: Juliano Ferreira

Place and date: Santa Maria, 14 de agosto de 2009.

Gout is characterized by the deposition of monosodium urate (MSU) crystals. Despite being one of the most painful forms of arthritis, gout and the mechanisms responsible for its acute attacks are poorly understood. In the present study, we found that MSU caused dose-related nociception ( $DE_{50}=0.04$  (0.01-0.11) mg/paw) and edema ( $DE_{50}=0.08$  (0.04-0.16) mg/paw) when injected into the hind paw of rats. Treatment with the selective TRPV1 receptor antagonist SB366791 largely inhibited nociceptive and edematogenic responses to MSU. Moreover, the desensitization of capsaicin-sensitive afferent fibers as well as the pretreatment with the tachykinin  $NK_1$  receptor antagonist RP 67580 also significantly reduced MSU-induced nociception and edema. Once MSU was found to induce mast cell stimulation, we investigated the participation of these cells on MSU effects. Prior degranulation of mast cells by repeat treatment with compound 48/80 decreased MSU-induced nociception and edema or histamine and serotonin levels in the injected tissue. Moreover, pretreatment with the mast cell membrane stabilizer cromolyn effectively inhibited nociceptive and edematogenic responses to MSU. MSU induced a release of histamine, serotonin and tryptase in the injected tissue, confirming mast cell degranulation. Furthermore, the antagonism of histaminergic  $H_1$  and serotonergic receptors decreased the edema, but not the nociception, of MSU. Finally, the inhibition of tryptase activity was capable of largely reducing either MSU-induced nociception or edema. Collectively, the present findings demonstrate that MSU produces a nociceptive and edematogenic response mediated by TRPV1 receptor activation and mast cell degranulation.

Keywords: pain; gout; mast cell; capsaicin; tryptase.



## LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	Difosfato de adenosina
AMP	Monofosfato de adenosina
ANOVA	Análise de variância
ATP	Trifosfato de adenosina
DRG	Gânglio da raiz dorsal
HTAB	Brometo de hexadeciltrimetilamonio
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular 1
IL	Interleucina
$\mu$ l	Microlitro
$\mu$ M	Micromolar
$\mu$ g	Micrograma
M	Molar
Mg	Miligrama
MPO	Mieloperoxidase
MSU	Urato monossódico
NAGase	N-acetil- $\beta$ ,D-glucoaminidase
NK <sub>1</sub>	Receptor para neurocinina 1
PBS	Salina tamponada com fosfato
RTX	Resiniferatoxina
s.c.	Subcutâneo
SP	Substância P

TMB	5-(N,N-dietilamino)-pencil-3,4,5-trimetoxibenzoato
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral $\alpha$
TRP	Receptor de potencial transitório
TRPV1	Receptor de Potencial Transitório Vanilóide 1
VCAM-1	Molécula de adesão de célula vascular 1

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

<b>Figura 1</b> - MSU crystals-induced nociception and edema .....	50
<b>Figura 2</b> - Participation of TRPV1 or NK <sub>1</sub> receptor in MSU-induced nociception and edema.....	51
<b>Figura 3</b> - Participation of capsaicin-sensitive sensory fibers in MSU-induced nociception and edema.....	52
<b>Figura 4</b> - Previous mast cell degranulation reduced MSU-induced nociception and edema .....	53
<b>Figure 5</b> - Mast cell degranulation mediated MSU-induced nociception and edema.....	54
<b>Figure 6</b> - Role of receptors for histamine or serotonin in MSU-induced nociception and edema.....	55
<b>Figure 7</b> - Participation of tryptase in MSU-induced nociception and edema.....	56
<b>Figure 8</b> - Proposta para o mecanismo de indução de edema e nocicepção induzidos por MSU	
<b>Table 1</b> - Positive controls for the pharmacological treatments.....	57
<b>Table 2</b> - Infiltration of neutrophil and macrophages in injected paw tissue.....	58

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>4</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>5</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>6</b>
<b>LISTA DE FIGURAS E TABELAS</b> .....	<b>8</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>13</b>
2.1. Objetivo Geral.....	14
2.2. Objetivos Específicos.....	14
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>15</b>
3.1. Histórico da gota.....	16
3.2. Panorama atual da Gota.....	17
3.3. Papel do urato monossódico na gota.....	18
3.4. Progressão Clínica da Gota.....	20
3.5. Tratamento.....	22
3.6 Dor relacionada à Gota.....	23
3.7 Receptor TRPV1.....	25
<b>4. ARTIGO</b> .....	<b>28</b>
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>64</b>
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	<b>70</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>72</b>
<b>8. APÊNDICE</b> .....	<b>79</b>
APÊNDICE A – Materiais, Métodos e Resultados Complementares.....	80

---

## 1. INTRODUÇÃO

As desordens inflamatórias como as artrites estão entre as situações crônicas que mais freqüentemente afetam a população mundial. Têm um forte impacto na qualidade de vida, no uso de recursos e de cuidados médicos, e na economia de um país. Juntas, estas circunstâncias causam uma condição de inabilidade ao trabalho principalmente entre homens e mulheres na faixa etária de 16-72 anos. A qualquer hora, aproximadamente um terço de todos os americanos adultos são afetados pela dor, pelo inchaço, ou pela limitação de movimentos. A predominância da artrite entre outras doenças, aumenta com a idade, afetando a saúde de um número significativo de crianças e de adultos jovens (Lawrence et al., 1998).

A gota é uma forma de artrite que causa episódios súbitos e graves de dor, sensibilidade, rubor, calor e tumefação das articulações. Afeta em geral, uma articulação em cada vez, com maior freqüência, a articulação maior do dedo grande do pé. A dor e a tumefação da gota são causadas por cristais de ácido úrico depositados na articulação. A progressão natural da doença segue quatro passos consecutivos: hiperuricemia assintomática, ataque agudo, período intercrítico e gota tofácea crônica (Keith e Gilliland, 2007).

O tratamento consiste principalmente em tomar medicamento(s) e controlar a dieta. Os objetivos são aliviar a dor, abreviar a duração da inflamação durante um episódio agudo, prevenir episódios futuros e evitar lesões nas articulações. As principais classes de medicamentos utilizadas na terapia inicial da gota são a colchicina e os fármacos antiinflamatórios não esteroidais (AINES) que, embora eficazes, apresentam vários efeitos adversos que tornam o tratamento clínico limitado (Keith e Gilliland, 2007). Assim, o estudo dos mecanismos envolvidos na indução de dor e inflamação que acompanham a gota é necessário para a busca por novos agentes analgésicos e antiinflamatórios mais efetivos e seguros para o tratamento da artrite gotosa.

O receptor para potencial transitório vanilóide 1 (TRPV1) é um sensor para vários estímulos nocivos e sua estimulação é relacionada com o desenvolvimento de vários tipos de desordens dolorosas (Calixto et al., 2005). Porém, não existem estudos relacionando a estimulação do receptor TRPV1 à produção de inflamação e dor relacionada à gota.

---

## **2. OBJETIVOS**

## **2.1. Objetivo Geral**

O objetivo do presente trabalho foi investigar o papel do receptor TRPV1 na nocicepção e edema induzido por cristais de MSU em ratos.

## **2.2. Objetivos Específicos**

2.2.1. Verificar a participação do receptor TRPV1 na ação nociceptiva e edematogênica induzida pelo MSU.

2.2.2. Elucidar o envolvimento das fibras aferentes primárias e dos mastócitos, além dos mediadores liberados por estas estruturas na ação nociceptiva e edematogênica causada pelo MSU.

2.2.3. Relacionar o efeito nociceptivo e edematogênico induzidos pelo MSU com a infiltração celular, através da atividade das enzimas myeloperoxidase (MPO) e N-acetyl- $\beta$ ,D-glucaminidase (NAGase) como índice de acumulação de neutrófilos e macrófagos respectivamente, no tecido injetado.



---

### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **3.1. Histórico da gota**

A gota é considerada uma das desordens inflamatórias mais dolorosas que os seres humanos podem experimentar (para revisão ver Choi et al., 2005). A descrição desta doença tem uma história de mais de 4.500 anos, estando entre as mais antigas moléstias humanas reconhecidas (para revisão ver Terkeutalb, 2003). Inicialmente foi identificada pelos egípcios em 2640 antes de Cristo e chamada de podagra (palavra que significa dor no pé referindo-se a articulação metatarsfalangeal). Posteriormente, foi reconhecida por Hipócrates no quinto século antes de Cristo, que se referiu a ela como “a doença incapacitante do andar.” Seis séculos depois, Galeno foi o primeiro a descrever em pacientes com gota os tofos, que são nódulos duros geralmente depositados sob a pele ao redor das articulações (para revisão ver: Nuki e Simkin, 2006).

A primeira pessoa a usar a palavra “gota” para descrever a podagra foi o monge Dominicano Randolph de Bocking (1197-1258). O termo “gota” é derivado da palavra em latim “gutta”, e refere-se ao conceito humoral, segundo o qual haveria um gotejar de humores de alguma parte do corpo às articulações. A primeira teoria patogênica da gota é dada pelos gregos, onde os humores denominados de “phlegme” ou catarro teriam origem encefálica e, na gota, localizavam-se ao nível da articulação afetada. O “humorismo” adquiriu novas características com Paracelso, autor que considerou a gota como resultante de um humor específico. Para ele, esta afecção era consequência da passagem de um humor característico do sangue para as articulações, onde se localizava. Este humor foi chamado de “tartarus”, e seria resultante da má digestão (para revisão ver: Nuki e Simkin, 2006).

### **3.2. Panorama atual da Gota**

A história da gota foi continuamente associada ao consumo de comida e álcool em excesso. Devido a esse fato, essa doença foi claramente relacionada a um estilo de vida que, pelo menos no passado, podia somente ser atribuído às pessoas abastadas, sendo denominada pela alcunha de “doença dos reis.” Essa característica era tão fortemente reconhecida, que a doença chegava a ser desejada, já que prevalecia entre a classe política e socialmente poderosa da época. A primeira epidemia de gota ocorreu durante o Império Romano, a segunda, durante o Império Britânico e talvez estejamos vivendo atualmente a terceira epidemia da civilização ocidental (para revisão ver Falasca, 2006). A elevada ingestão de purinas, o consumo de álcool e o peso elevado já eram referidos na antiguidade como fatores de risco e continuam sendo amplamente os mesmos de hoje, ainda que, agravados pelo uso de medicamentos principalmente diuréticos. Por isso, a gota é uma doença da antiguidade, que continua prevalecendo nos dias atuais (para revisão ver Choi et al., 2005).

Deste modo, aparentemente a artrite gotosa (como é também conhecida) vem aumentando nas últimas quatro décadas, principalmente em países industrializados. Muitos fatores parecem contribuir com esse evento como aumento da longevidade, da hipertensão, obesidade, síndrome metabólica, doenças renais e também devido às limitações encontradas no tratamento e estratégias inadequadas para combater a inflamação e os altos níveis de ácido úrico (Lawrence et al., 1998).

Atualmente, a gota é a artropatia inflamatória mais freqüente na população idosa. Nos Estados Unidos, há estimativas de prevalência de hiperuricemia e gota de 4% em pessoas acima dos 75 anos (Wallace, 2004). Embora as manifestações clínicas da gota se desenvolvam após um período prolongado de elevação do nível de ácido úrico (acima de 7,0 mg/dl em homens e acima de 6,0 mg/dl em mulheres), muitos indivíduos com hiperuricemia nunca desenvolverão a doença (Campion e Glynn 1987). Já em mulheres após a menopausa a incidência da doença aumenta, um efeito que tem sido atribuído a queda do hormônio estrogênio, ainda que o mecanismo exato desse evento não esteja claro (para revisão ver Choi et al., 2005).

### **3.3. Papel do urato monossódico na gota**

O ácido úrico é um ácido fraco (pKa 5,8) que encontra-se em grande parte na sua forma ionizada (urato) em pH fisiológico. Ele é o principal produto do metabolismo das purinas em alguns primatas, incluindo os seres humanos. Este ácido é formado pela ação da enzima xantina oxidase sobre as purinas adenosina e guanosina. Os demais mamíferos excretam como produto metabólico final das purinas a alantoína, uma substância de elevada solubilidade resultante da degradação do ácido úrico pela enzima uricase. Durante a evolução dos primatas, essa enzima foi sofrendo mutações resultando na perda de sua função, em decorrência disso, altos níveis de urato predispõem os humanos à gota. O resultado dessa alteração evolucionária talvez possua um caráter protetor, já que, supostamente o urato tenha propriedades antioxidantes (Bannasch et al., 2008). Realmente, o plasma humano possui uma quantidade seis vezes maior de urato do que o antioxidante ácido ascórbico, cuja capacidade humana de geração foi bem menor durante o mesmo tempo de evolução no qual se desenvolveu a inativação para o gene da uricase. Talvez a atividade do ácido úrico seja o de promover a longevidade tanto pela proteção ao estresse oxidativo gerado pelas transformações e mortes celulares quanto pela proteção neurológica (Kutzing e Firestein, 2008).

A excreção do urato ocorre nos rins e depende da sua filtração glomerular, reabsorção do filtrado, secreção e reabsorção pós-secreção no túbulo proximal. Em 2004 foi identificado um transportador (o transportador aniônico URAT1 ou SLC22A12) responsável pela reabsorção de urato no túbulo proximal (Bannasch et al., 2008; Enomoto et al., 2002).

O equilíbrio na quantidade de urato depende do balanço entre dieta, síntese e taxa de excreção. A hiperuricemia pode resultar tanto de uma superprodução, como de uma baixa excreção ou da combinação de ambos. Em relação aos caminhos da produção elevada de urato, alguns pacientes apresentam uma taxa superior de purinas devido a desordens proliferativas ou inflamatórias (câncer ou psoríase, por exemplo), intervenção farmacológica (quimioterapia ou diuréticos) ou hipóxia. Uma pequena parcela dessa alta produção de purinas ocorre em consequência de erros metabólicos (superatividade da 5'-fosforibosil-1-pirofosfato sintetase ou deficiência da hipoxantina-guanina forofosil transferase). Outra condição é a desordem

associada ao trifosfato de adenosina (ATP), cuja degradação leva ao acúmulo de difosfato de adenosina (ADP) e de monofosfato de adenosina (AMP) a qual pode ser rapidamente degradada até ácido úrico (p.ex. após ingestão de etanol ou frutose) (para revisão ver Choi et al., 2005). A hiperuricemia em Dálmatas deriva de um defeito na excreção do ácido úrico, o qual tem seus níveis elevados no sangue e na urina predispondo essa raça canina a cálculos urinários constituídos de urato (Bannasch et al., 2008)

A solubilidade do urato no fluido articular pode ser influenciada por fatores como temperatura corporal mais baixa (explicando ataques noturnos), mudanças no pH (p.ex. cetose em pacientes durante o período pós-operatório) e nível de desidratação articular (p.ex. terapia diurética) (para revisão ver Choi et al., 2005). O urato depositado na articulação ou em tecidos peri-articulares tem a possibilidade de se ligar a um ânion sódio formando o urato monossódico. O urato monossódico é mais solúvel do que o urato livre, porém seu limite de solubilidade é de 7 mg/dl a 37°C. Como em pacientes hiperuricêmicos a concentração deste sal é superior a este valor, ocorre a formação e precipitação de cristais de urato monossódico (MSU) nas articulações e em tecidos peri-articulares (Stryer, 1996).

A aparência dos cristais de MSU foi descrita inicialmente em 1679, por Leeuwenhoek, um dos pesquisadores pioneiros da microscopia, que lhes descreveu como semelhantes a giz (partículas pequenas e transparentes com extremidades pontiagudas). A relação do ácido úrico à doença foi confirmada um século depois quando Wollaston (1797) demonstrou a presença de urato em um tofo de sua própria orelha. Por volta de 1859, Garrod declarou que o depósito do urato seria a causa e não a consequência da inflamação ocasionada na gota. A relação entre a gota e o excesso de ácido úrico circulante é conhecida desde o século XIX, mas o entendimento sobre a produção de ácido úrico pelo organismo surgiu somente por volta de um século depois (para revisão ver: Nuki e Simkin, 2006). Faires e MacCarty estudaram a ligação dos cristais de urato monossódico (MSU) com a gota, quando ambos, ao injetarem MSU nas próprias articulações, desenvolveram uma rápida inflamação aguda que reproduziu todas as características de um ataque violento de gota. Embora este trabalho não tenha definido o mecanismo que iniciou o processo inflamatório, ele demonstrou que o cristal de MSU era o “disparador” inicial da artrite úrica (Faires e McCarty, 1962).

### **3.4. Progressão Clínica da Gota**

A progressão clínica da artrite gotosa ocorre pela formação e depósito de cristais de MSU nas articulações e tecidos extra-articulares. Esse evento talvez aconteça por anos antes que o primeiro ataque ocorra, visto que os tofos desenvolvem-se silenciosamente até que os primeiros sintomas da doença apareçam (para revisão ver Dalbeth e Haskard, 2005). O desenvolvimento dessa artropatia apresenta quatro estágios diferentes: hiperuricemia assintomática, ataque agudo, período intercrítico e gota tofácea crônica. O ataque agudo normalmente afeta apenas uma articulação (a mais comum é a articulação metatarsofalangeal no dedo maior do pé), contudo pode ocorrer uma manifestação poliarticular (principalmente nos dedos das mãos) como evento inicial da doença. Essa primeira fase pode ter um desenvolvimento lento (meses ou anos), no entanto tende a ficar mais freqüente e com duração mais longa (Keith e Gilliland, 2007).

A fase aguda de gota apresenta todas as características de uma resposta inflamatória aguda. O exame histológico da sinóvia durante uma crise aguda de artrite úrica mostra hiperplasia e intensa infiltração por neutrófilos, macrófagos e linfócitos. Essa resposta aguda é provocada freqüentemente por eventos específicos, como traumatismo, cirurgia, doença intercorrente, alto consumo de álcool ou drogas que alterem o nível sérico de urato. Tais episódios podem estimular a formação de novos cristais de MSU ou podem provocar a liberação dos microcristais de depósitos pré-formados dentro da articulação. Alguns modelos animais de gota demonstram a participação de monócitos e mastócitos durante o período mais inicial dessa fase e infiltração de neutrófilos em uma fase mais adiantada da inflamação (para revisão ver Choi et al., 2005).

Os mecanismos conhecidos para a descrição da gota se referem principalmente à células inflamatórias que desencadeariam a doença. O influxo de neutrófilos para o tecido sinovial parece ser um importante evento no desenvolvimento inicial da inflamação. A intensa infiltração destas células dentro da membrana sinovial e na própria sinóvia é a principal característica da fase aguda da gota. Em consequência da interação dos neutrófilos com o MSU ocorre a liberação de uma variedade de mediadores como espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (superóxido, peróxido de hidrogênio, oxigênio singleto e óxido nítrico), leucotrieno

B4, prostaglandina E2 e interleucinas (como IL-1 e IL-8). Esse episódio parece envolver a ativação de células endoteliais vasculares, conduzindo à vasodilatação com o aumento do fluxo sanguíneo, aumento da permeabilidade à proteínas plasmáticas, e finalmente ao recrutamento dos leucócito para tecidos. A ativação endotelial inicia com expressão de moléculas da adesão tais como E-selectina, molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) e molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM-1) que talvez seja causada por fatores como o TNF- $\alpha$  (liberado pelos mastócitos) e então amplificada por fatores liberados pelos leucócitos que entram nos tecidos e encontram os cristais de MSU. Experimentos com células endoteliais do cordão umbilical humano demonstraram que o MSU estimula monócitos a expressar E-selectina, ICAM-1 e VCAM-1, esse efeito foi atribuído a liberação de TNF- $\alpha$  e e interleucina 1 $\beta$ . Deste modo, alguns modelos animais nos quais MSU induziu artrite, tanto o bloqueio de TNF- $\alpha$  quanto de IL-8 reduziu significativamente o recrutamento de neutrófilos, confirmando a importância desses fatores.

A atividade do sistema complemento está bastante aumentada no líquido sinovial de pacientes com crise aguda de gota. Sugere-se que o MSU pode ativar ambas as vias clássica e alternativa do complemento que após sua ação parecem ter um papel maior na geração de IL-8 e assim conduzirem ao recrutamento de neutrófilos dentro da articulação inflamada. Talvez a formação do peptídeo vasoativo bradicinina também contribua para amplificação do processo de dor e inflamação ocasionados em resposta ao MSU. Este peptídeo é capaz de ativar células endoteliais e promover vasodilatação, aumentar a permeabilidade vascular e estimular fibras sensoriais induzindo a dor. A relevância da atuação da bradicinina na gota é enfatizada em estudos com ratos desprovidos de cininogênio e pobres em calicreínas, nos quais a resposta inflamatória ao MSU é bastante reduzida. Além disso, antagonistas do receptor para bradicinina também tem demonstrado supressão da resposta inflamatória ao MSU (para revisão ver Dalbeth e Haskard, 2005).

Os cristais de MSU podem interagir diretamente com a superfície celular em alguns receptores ou indiretamente por fagocitose. Por fagocitose, subsequente ao englobamento do cristal pelos monócitos, estes também são ativados, resultando na expressão de fatores pro inflamatórios, incluindo IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 e ciclooxigenase-2. Um trabalho recente demonstrou que a ativação de leucócitos por MSU depende da estimulação da proteína intracelular de reconhecimento de

antígenos criopirina, que uma vez ativada recruta a proteína adaptadora ASC, que por fim ativa a enzima caspase-1 (o complexo criopirina, ASC e capsase-1 é chamado de inflamossoma) (Martinon et al., 2006). A capsase-1 transforma pro-interleucinas em interleucinas ativas resultando em uma produção de IL-1 $\beta$  e IL-18 (Pétrilli e Martinon, 2007). Células residentes no tecido afetado também podem contribuir com essa resposta gerando mediadores, como os fibroblastos sinoviais que ao fagocitar o MSU liberam PGE<sub>2</sub> (para revisão ver Dalbeth e Haskard, 2005). Além deste mecanismo dependente fagocitose, um estudo recente demonstrou que o MSU pode interagir diretamente com o receptor de membrana CD14, induzindo assim a síntese de mediadores inflamatórios (Scott et al., 2006).

Mesmo na ausência de tratamento, a típica inflamação aguda dessa primeira fase tende a regredir em média dentro de dez dias, essa etapa é conhecida como estágio intercrítico referindo-se à resolução dos sintomas após o ataque agudo (para revisão ver Choi et al., 2005).

A fase crônica, também chamada fase tofácea, ocorre devido a uma persistente hiperuricemia que frequentemente leva a formação depósitos de cristais de MSU em tecidos subcutâneos e periarticulares, são os chamados tofos (granulomas formados por fragmentos de MSU circundados por macrófagos indiferenciados e diferenciados em níveis elevados de apoptose). A razão pela qual algumas pessoas são suscetíveis a esse processo permanece desconhecida (talvez uma excessiva formação de cristais, estaria excedendo a capacidade dos macrófagos teciduais ou uma falha na detecção dos cristais pelos macrófagos). Os tofos são geralmente associados com a destruição cartilaginosa e óssea. Estudos demonstraram que essa propriedade erosiva apresenta-se em decorrência de enzimas produzidas pelos monócito-macrófagos constituintes dos tofos induzidos pelo MSU (para revisão ver Dalbeth e Haskard, 2005).

### **3.5. Tratamento**

Quando não tratado, um ataque repentino de gota persiste geralmente por uma ou duas semanas e em seguida, novos ataques possivelmente irão persistir por muito mais tempo. O primeiro passo para tratar a crise aguda de gota é aliviar a dor e controlar a inflamação que frequentemente provoca a imobilização da articulação



causando uma incapacitação do indivíduo. Várias modalidades terapêuticas podem ser usadas, a primeira linha de tratamento normalmente inclui antiinflamatórios, como o diclofenaco, o ibuprofeno e a colchicina. Após a remissão da fase aguda, o passo seguinte é tentar evitar o desencadeamento de novas crises, dessa forma, os pacientes são recomendados a perder peso, reduzir o consumo de álcool e alimentos ricos em proteínas. O terceiro passo, uma vez que o paciente apresente ataques repetidos, é a utilização de fármacos que diminuam o nível sérico de ácido úrico, como por exemplo o alopurinol, normalmente realizado de forma contínua.

As limitações para o tratamento da artrite úrica são elevadas (principalmente de agentes anti-uricêmicos usados nos casos de pacientes hipertensos e portadores de insuficiência renal) devido à grande apresentação de efeitos colaterais, como diarreia, sangramentos gastrointestinais e formação de cálculos (Keith e Gilliland, 2007). Por isso, os mecanismos que envolvem tal enfermidade devem ser melhor compreendidos, possibilitando o desenvolvimento de terapias mais eficazes e menos limitadas por efeitos inespecíficos indesejáveis.

### **3.6 Dor relacionada à Gota**

A dor é o principal sintoma clínico que leva os indivíduos a procurar serviços primários de saúde. Embora a dor seja fundamental para a manutenção da integridade física, gera conseqüências desagradáveis tais como sofrimento, estresse, prejuízos nas relações sociais e econômicas (ex: isolamento social, ausência no trabalho), portanto deve ser rapidamente e efetivamente tratada (Loeser; Melzack, 1999; Brenann et al., 2007).

De acordo com a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), a dor pode ser definida como “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada à lesão tecidual presente real ou potencial ou ainda descrita em termos que sugerem tal lesão” (Merskey; Bodguk, 1994; Loeser; Melzack, 1999). Entretanto, sua percepção é complexa e não envolve apenas a transmissão de um estímulo nocivo, mas também processos emocionais e cognitivos em nosso cérebro (Julius Basbaum, 2001).

A dor, além de uma sensação é uma experiência. As sensações possuem vias neuroanatômicas importantes com receptores específicos que permitem a detecção e medida de um estímulo. As experiências incorporam os componentes sensoriais com influências pessoais e ambientais importantes (Julius Basbaum, 2001). A sensação de dor nos alerta para uma real ou provável lesão e desencadeia respostas apropriadas para proteger o organismo, desta forma, a dor eminentemente aguda possui grande valor adaptativo relacionado com a sobrevivência (Millan, 1999).

O componente sensorial da dor (nocicepção) é formado por várias vias que ligam diversos componentes do sistema nervoso de maneira hierárquica. Os estímulos nocivos tais como calor, frio, compressão intensa ou algumas substâncias químicas, ativam as terminações nervosas livres e periféricas de fibras aferentes sensoriais delgadas do tipo C e A $\delta$ , chamadas de nociceptores. 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 e o núcleo trigeminal *pars caudalis* na ponte, respectivamente (para revisão ver: Dray e Perkins, 1997; Russo e Brose, 1998; Besson, 1999). Imediatamente, um reflexo de retirada mediado pela medula espinhal é desencadeado no intuito de remover a região do corpo ameaçada (Watkins e Maier, 2002). Nas lâminas superficiais do corno dorsal da medula espinhal, as terminações dos nociceptores liberam vários neurotransmissores que estimulam 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 (para revisão ver: Craig, 2003; Hunt e 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 e ventrobasal, que tem projeções para o córtex e a via espinoparabraquial termina no núcleo parabraquial e tem projeções para o hipotálamo, amígdala e substância cinzenta periaquedutal (Craig, 2003; Hunt e Mantyh, 2001). Esta percepção supraespinhal produz várias respostas autonômicas, neuroendócrinas e comportamentais relacionadas a defesa (Craig, 2003; Watkins e Maier, 2002).

Tanto células residentes no sítio da lesão (como fibroblastos, células de Schwann, queratinócitos e mastócitos) quanto leucócitos recrutados para a região

(como neutrófilos, macrófagos e linfócitos) podem causar liberação de mediadores que provocam sensibilização das fibras sensoriais. Essa sensibilização está claramente envolvida com dores crônicas associadas com processos inflamatórios (como as artrites).

A artrite gotosa é caracterizada por crises agudas súbitas bastante dolorosas, localizadas mais comumente na articulação metatarsofalangeal. Uma descrição clássica de dor relacionada a gota foi relatada por volta de 1680, quando o famoso físico inglês Thomas Sydenham descreveu sobre suas sensações durante uma crise aguda: “O paciente vai para a cama e dorme calmamente até aproximadamente duas da manhã quando é despertado por uma dor que acomete geralmente o dedo grande do pé, mas às vezes assalta calcanhar ou o tornozelo. A dor assemelha-se a de um osso deslocado... e esta é imediatamente sucedida por um calafrio, uma ligeira febre ...a dor... que é suave no início, cresce gradualmente mais violenta a cada hora, tão dolorosa que não permite resistir ao peso da roupa nem a agitação de uma pessoa que anda fortemente no quarto.” (para revisão ver: Nuki e Simkin, 2006). Ao mesmo tempo, durante os ataques agudos de gota, pacientes reportam uma sensação inicial de calor moderado seguido por uma dor em queimação que classificam como excruciante (Wilson, 1823)

Diversos estudos sugerem que a dor observada na artrite gotosa ocorra devido à fagocitose de MSU por leucócitos, que por sua vez ao liberar mediadores pró-nociceptivos que estimulariam os nociceptores (Dalbeth e Haskard, 2005; Faires e McCarty, 1962). Estes eventos talvez sejam importantes para manter a sensação dolorosa na gota, contudo foi demonstrado que o urato pode igualmente causar percepções dolorosas na ausência de uma aparente infiltração leucocitária (Horowitz et al., 1990). Deste modo, outros eventos além da ativação de leucócitos devem contribuir para indução da dor durante ataques de gota. Entretanto, os mecanismos envolvidos na nocicepção induzida por MSU são pouco conhecidos.

### **3.7 Receptor TRPV1**

A dor durante ataques de gota é descrita como em queimação (Wilson, C., 1823). De maneira interessante, a sensação dolorosa induzida por calor nocivo

parece ser detectada pelo receptor vanilóide do tipo 1 (TRPV1), um membro da família de receptores de potencial transitório (TRP) (para revisão ver Calixto et al., 2005).

A família dos TRP constitui-se de canais catiônicos não seletivos, formados por seis domínios transmembrana contendo suas porções amino e carboxi terminais localizados intracelularmente. Os TRPs são formados por seis subfamílias, das quais destaca-se: TRPV (vanilóide). Esse receptor da subfamília famílias V parece ser um dos principais codificadores de estímulos externos e internos em neurônios sensoriais. O receptor TRPV1 foi inicialmente identificado como um sensor para o calor nocivo (Caterina et al., 1997). Além disto, este canal pode ser ativado por várias substâncias exógenas irritantes, como capsaicina (presente na pimenta vermelha), resiniferatoxina (da planta *Euphorbia resinifera*), e também por ligantes endógenos, como anandamida e produtos da lipooxigenase (para revisão ver Calixto et al., 2005). A ablação gênica do receptor TRPV1 reduz não somente a sensibilidade à capsaicina, mas também a nocicepção (componente sensorial da dor avaliada em animais experimentais) relacionada a processos inflamatórios (Caterina et al., 2000).

O receptor TRPV1 é expresso em uma subfamília de neurônios sensoriais de pequeno diâmetro. A estimulação de TRPV1 causa nocicepção neurogênica relacionada com a despolarização e a liberação de neuropeptídeos por nociceptores, desgranulação de mastócitos e extravasamento plasmático (Santos e Calixto, 1997; Andrade et al., 2008; Birklein e Schmelz, 2008).

Além disso, aplicações repetidas de capsaicina resultam em um longo efeito analgésico que ocorre por uma dessensibilização, resultante da depleção de substância P (Calixto et al., 2005). Deste modo, preparações tópicas de capsaicina são utilizadas para o tratamento da dor relacionada a vários tipos de artrite (para revisão ver Mason et al., 2004). De forma interessante, extrato de pimenta tem sido usado farmacologicamente como um remédio para gota (Walker e McCleane, 2002).

Assim, visto que TRPV1 está envolvido na detecção de estímulos nocivos severos, incluindo calor nocivo, e a dor relatada na gota é descrita como em queimação, nossa hipótese é que a dor provocada por este tipo de artrite esteja relacionada com a ativação do receptor TRPV1.

Apesar de terem sido realizados alguns estudos na área, diversos aspectos importantes referentes aos mecanismos de ação nociceptivo e inflamatório

desenvolvidos na gota necessitam ser melhor investigados, justificando assim nosso estudo. Tais estudos poderiam trazer informações importantes para o desenvolvimento e uso de drogas que modulam as ações dos cristais de MSU, auxiliando assim no tratamento de processos dolorosos e inflamatórios que ainda permanecem sem uma terapia adequada.

---

**4. ARTIGO**

**Artigo submetido à revista Pain**

**Role of TRPV1 on nociception and edema induced by monosodium urate  
crystals in rats**

‘

Carin Hoffmeister<sup>1</sup>, Gabriela Trevisan<sup>2</sup>, Mateus Fortes Rossato<sup>3</sup>, Marcus Vinícius  
Gómez<sup>4</sup>, Juliano Ferreira<sup>1,2,3,4,\*</sup>.

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde;

<sup>2</sup>Departamento de Química e <sup>3</sup>Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas:  
Bioquímica Toxicológica, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade  
Federal de Santa Maria, RS, Brazil. <sup>4</sup>Programa de Pós-graduação em Farmacologia  
Bioquímica e Molecular, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG,  
Brazil

Manuscript includes 35 pages, 7 Figures and 2 Tables

\*Corresponding author: Departamento de Química, Universidade Federal de Santa  
Maria, Avenida Roraima 1000, Camobi, CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.  
Tel.: + 55 55 3220 8053; fax: +55 55 3220 8031; E-mail: ferreiraj99@gmail.com

## ABSTRACT

Gout is characterized by the deposition of monosodium urate (MSU) crystals. Despite being one of the most painful forms of arthritis, gout and the mechanisms responsible for its acute attacks are poorly understood. In the present study, we found that MSU caused dose-related nociception ( $DE_{50}=0.04$  (0.01-0.11) mg/paw) and edema ( $DE_{50}=0.08$  (0.04-0.16) mg/paw) when injected into the hind paw of rats. Treatment with the selective TRPV1 receptor antagonist SB366791 largely inhibited nociceptive and edematogenic responses to MSU. Moreover, the desensitization of capsaicin-sensitive afferent fibers as well as the pretreatment with the tachykinin NK<sub>1</sub> receptor antagonist RP 67580 also significantly reduced MSU-induced nociception and edema. Once MSU was able to induce mast cell stimulation, we investigated the participation of these cells on MSU effects. Prior degranulation of mast cells by repeat treatment with compound 48/80 decreased MSU-induced nociception and edema or histamine and serotonin contents in the injected tissue. Moreover, pretreatment with the mast cell membrane stabilizer cromolyn effectively inhibited nociceptive and edematogenic responses to MSU. MSU induced a release of histamine, serotonin and tryptase in the injected tissue, confirming mast cell degranulation. Furthermore, the antagonism of histaminergic H<sub>1</sub> and serotonergic receptors decreased the edema, but not the nociception, of MSU. Finally, the inhibition of tryptase activity was capable of largely reducing either MSU-induced nociception or edema. Collectively, the present findings demonstrate that MSU produces a nociceptive and edematogenic response mediated by TRPV1 receptor activation and mast cell degranulation.

**Keywords:** pain; gout; mast cell; capsaicin; tryptase.



#### 4.1. INTRODUCTION

Gout is considered one of the most painful acute conditions that human beings can experience, and it has a registered history spanning more than 2500 years [4,44]. However, only in 1962 [10] was the role of monosodium urate (MSU) crystals in gout when injected into joints clearly demonstrated. It is now generally agreed that the deposition of microcrystalline MSU in synovial fluid initiates the acute gouty attack [9].

Several studies have demonstrated that MSU induces leukocyte infiltration and activation by mechanisms that are largely understood [13,26,28,25,9]. Moreover, it has been frequently suggested that the pain associated with gout is due to MSU phagocytosis by leukocytes that in turn release pro-nociceptive mediators that stimulate nociceptors [10,9]. Although these events may be important to maintain the painful reaction in gout, it has also been demonstrated that urate crystals can cause painful joints in the absence of an apparent leukocyte infiltration [16]. Thus, other events besides leukocyte activation must contribute to the induction of pain during gout attacks. However, the other mechanisms involved in MSU-induced nociception are less understood.

Among the classic characteristics of an acute gout attack is an initial sensation of warmth followed by an excruciating burning pain [10,48]. Interestingly, noxious heat sensation seems to be detected by the TRPV1 (vanilloid) receptor, a type of transient receptor potential (TRP) ion channel [5]. TRPV1 is expressed in a subset of small-diameter primary afferent sensorial fibers and is activated by several noxious stimuli, such as heat, protons, some lipid mediators and capsaicin, the active ingredient of chili peppers. The stimulation of TRPV1 causes a neurogenic nociception related to depolarization and neuropeptide release by nociceptors, degranulation of mast cells and plasma extravasation [36,2,4]. Moreover, repeated applications of capsaicin result in a long-lasting analgesic effect as desensitization occurs from the depletion of substance P [5]. Of note, extracts of chili peppers have been used medicinally as a remedy for gout [46]. Thus, since TRPV1 is involved in the detection of several harmful stimuli, including noxious heat, and gout-related pain is described as burning, it is possible that the pain provoked by gout is related to the activation of the TRPV1 receptor.

Therefore, the present study aimed to investigate the role of leukocytes, mast cells and TRPV1 on the nociceptive and edematogenic response to MSU crystals.

## 4.2. MATERIALS AND METHODS

### 4.2.1. Animals

Adult male Wistar rats weighing 200-300 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 2 h before testing. The number of animals and the nociceptive stimuli used were the minimum necessary to demonstrate the consistent effects of drug treatments. All experiments were performed in accordance with the ethical guidelines established for investigations of experimental pain in conscious animals [51] and were approved by the local ethics committee of our University (process number: 23081.003640/2009-61).

### 4.2.2. Drugs

Synthetic MSU crystals were prepared as described previously [36]. Briefly, 4 g of uric acid (Vetec, Brazil) was dissolved and heated in 800 ml of H<sub>2</sub>O, adjusted to pH 8.9 with NaOH (9 ml, 0.5 N) at 60 °C, cooled overnight in a cold room and then washed and dried. Needle-like crystals were recovered and then suspended in phosphate-buffered solution (PBS: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10.8 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 6.8 mM, NaCl 120,4 mM; pH7.4). Polarized light microscopic examination showed the crystals to be rod-shaped and varying in length ( $12\pm 2$  μm). The preparation was free of endotoxin as determined by amebocyte cell lysate assay (Sigma).

Capsaicin was purchased from Sigma (USA), and the stock solution was prepared in 90% ethanol and 10% Tween 80; ruthenium red, methysergide, sodium cromoglycate (cromolyn), histamine, substance P, ninhidrin, serotonin RP 67580, α<sub>1</sub>-acid glycoprotein and resiniferatoxin were purchased from Sigma (USA) and dissolved in PBS. In addition, o-phthaldialdehyde (OPT), p-nitrophenil-2-acetamide-β-D-glicopyranoside (NAG), 5-(N,N-diethylamino)-pentyl-3,4,5-trimethoxy benzoate

(TMB), hexadecyl trimethyl ammonium bromide (HTAB) and *N*-*p*-Tosyl-Gly-Pro-Arg-*p*-nitroanilide were purchased from Sigma (USA). Soybean trypsin inhibitor (SBTI) was purchased from Fluka (USA), and promethazine was purchased from Aventis (Brazil); both were dissolved in PBS. Radio-labeled [<sup>3</sup>H] resiniferatoxin was purchased from PerkinElmer (USA).

#### 4.3. Injection of urate crystals

To observe the possible nociceptive and edematogenic effects produced by MSU, 100 µl of MSU suspension (0.015-2 mg/paw) was administered subcutaneously (s.c.) under the plantar surface of the right hind paw of unanesthetized animals. Separate groups of animals received instead the s.c. injection of the vehicle (PBS). We observed the signs of stimuli-independent nociception (spontaneous nociception) and edema in the animals at several points in time after injection.

#### 4.4. MSU-induced spontaneous nociception and edema

Animals were placed individually in chambers (transparent glass) and adapted for 20 min before injection, as described previously [11]. The number of flinch responses during 30 minutes (in blocks of 5 minutes) after the injection was recorded and considered as indicative of nociception. The edema formation was assessed as an increase in paw thickness measured by a digital caliper at several time points (30, 60, 120, and 180 min) after the s.c. injection of MSU or vehicle. The results were expressed as the difference between the basal value and the test value at each time observed [30].

For the study of the mechanism of MSU-induced nociception and edema, several antagonists and inhibitors were also subcutaneously injected with MSU (0.25 mg/paw). The time of treatment and the dose of these drugs were based on data from previous literature or on pilot experiments using positive controls.

#### **4.5 TRPV1 and NK1 receptor involvement in nociceptive and edematogenic responses induced by MSU**

To investigate the possible involvement of TRP receptors in the spontaneous pain produced by MSU, intraplantar SB 366791 (10 nmol/paw, a selective TRPV1 receptor antagonist) was co-injected s.c. with MSU (0.25 mg/paw), and nociception was observed as described above. As a positive control we also evaluated the effect of SB 366791 on nociception and edema caused by capsaicin (0.01 or 1 nmol/paw, respectively).

The involvement of the tachykinin NK<sub>1</sub> receptor was also investigated. To elucidate its participation in the nociception and edema produced by MSU, the NK<sub>1</sub> receptor antagonist RP 67580 (20 nmol/paw) was co-injected subcutaneously with MSU (0.25 mg/paw) and nociception and edema were observed as described above. As a positive control we also evaluated the effect of RP 67580 on nociception and edema caused by substance P (0.1 nmol/paw).

#### **4.6 Role of capsaicin-sensitive afferent fibers in nociceptive and edematogenic responses induced by MSU**

To further explore the role of capsaicin-sensitive fibers in the nociceptive and edematogenic effect induced by MSU, animals were submitted to a perineural capsaicin desensitization protocol as previously described [34]. First, animals were anesthetized with ketamine (90 mg/kg) and xylazine (3 mg/kg), and an incision was made over the hip joint to expose the sciatic nerve. Once isolated, 10 µl of 2% capsaicin or vehicle (10% ethanol, 10% Tween 80 and 80% PBS) was injected directly inside the sheath covering the nerve using a micro-syringe. After 7 days, animals were submitted to a subcutaneous injection of MSU (0.25 mg/paw), capsaicin (0.01 nmol/paw, used as a positive control) or PBS (100 µl/paw).

#### 4.7 Role of mast cells in MSU-induced nociception and edema in the rat paw

To further investigate the participation of mast cell products in the MSU-induced nociception and edema, the right hind-paws were pretreated (15 min before injection of MSU) with the mast cell stabilizer sodium cromoglycate (2  $\mu\text{mol/paw}$ ) [35]. In another experiment, mast cells were degranulated by pretreatment with compound 48/80 (a mast cell degranulator drug) during for 5 consecutive days (1, 3, 10, 10, 10  $\mu\text{g/paw}$ ) [2]. An hour after the last treatment, rats were injected with MSU (0.25 mg/paw) or compound 48/80 (10  $\mu\text{g/paw}$ , used as a positive control)

To evaluate the participation of histamine and serotonin in the nociception and edema caused by MSU, animals were co-administrated with MSU (0.25 mg/paw) and the H<sub>1</sub> receptor antagonist promethazine (120 nmol/paw) or the 5-HT receptor antagonist methysergide (10 nmol/paw). In separate groups of animals, histamine (250  $\mu\text{g/paw}$  or 20  $\mu\text{mol/paw}$ ) and serotonin (10  $\mu\text{g/paw}$  or 60 nmol/paw) were used as positive controls for promethazine and methylsergide [15].

To investigate the participation of tryptase, groups of rats were pretreated with the non-selective tryptase inhibitor soybean trypsin inhibitor (SBTI 100  $\mu\text{g/paw}$ ,) or the selective tryptase inhibitor gabexate (0.1 nmol/paw) 10 min before the MSU was injected, and the nociception and edema were evaluated as described above [20]. In another set of experiments, rats were co-administrated with MSU and gabexate (0.1 nmol/paw) [32].

#### 4.8 Measurement of histamine or serotonin levels and tryptase activity

To confirm the degranulation of mast cells by repeated compound 48/80 treatment, separate groups of rats were killed by cervical dislocation 24 hours after the last injection of compound 48/80, and histamine and serotonin levels were measured in homogenates of the injected tissue.

Histamine content was evaluated as previously described [39]. The paw skin samples were homogenated in PBS (50 mM, pH 7.4) with metronidazole 1 mM (a histamine methyl transferase inhibitor used to reduce histamine degradation), centrifuged at 12,000  $g$ , 4°C for 10 minutes, and the resulting supernatant were used to evaluate the histamine content. Then, 150  $\mu$ l of NaOH (1 M) was added to 400  $\mu$ l of supernatant and incubated with 40  $\mu$ l of 1% *o*-phthalaldehyde (OPT). Next, 75  $\mu$ l of HCl (3 M, pH 10.4) was added to stop the reaction and to allow for the development of fluorescence, read at 360 nm (excitation) and 450 nm (emission) in a fluorescence photometer.

Serotonin content was evaluated as previously described [50]. The paw tissue samples were homogenized in 2 mL perchloric acid (0.4 M) and centrifuged at 900  $g$  for 10 minutes. Then, 300  $\mu$ l of supernatant was combined with 0.125 mL of borate buffer (0.5 mM, pH 10, NaCl saturated) and 3 mL of 1-butanol. The mixture was mixed for 10 minutes. The organic phase was then separated and incubated with 0.350 mL of phosphate buffer (0.05 M, pH 7.4) and 3 mL of *n*-heptane. The mixture was mixed for 2 minutes, and the aqueous phase (0.5 mL) was incubated with 0.5 mL of ninhydrin (0.24 %) and 0.5 mL of phosphate buffer (100 mM, pH 7.0). The reaction was incubated at 100°C for 10 minutes and led to rest at room temperature in the dark for 5 hours. The development of fluorescence was read at 380 nm (excitation) and 500 nm (emission) in a fluorescence photometer.

To verify if MSU crystals are capable of promoting the degranulation of mast cells, separate groups of rats were killed by cervical dislocation 10 minutes after MSU or vehicle paw sc. injection. The injected paw was coaxially perfused as previously described [11]. A double polyethylene tube was inserted into the subcutaneous space of the paw and 500  $\mu$ l of PBS was perfused at a rate of 200  $\mu$ l  $\text{min}^{-1}$  through the inner tube, after which the perfusate was collected through the outer tube. To assess histamine and serotonin levels, paws were perfused with PBS plus

metronidazole or PBS, and their levels were measured as described above. To assess the tryptase release after MSU treatment, the paw was perfused with 10 mM Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethane), pH 6.1, containing 2 M NaCl at 10 min after MSU injection. To perform the reaction, 50  $\mu$ l of perfusate was combined with 50  $\mu$ l of 500  $\mu$ g/ml *N-p*-Tosyl-Gly-Pro-Arg-*p*-nitroanilide in Tris buffer (60 mM, pH 7.8), containing 0.4% DMSO and 30  $\mu$ g/mL heparin at 37°C for 1h. The free nitroaniline released was measured colorimetrically at 420 nm [45].

#### 4.9 Determination of neutrophil and macrophage infiltration

To evaluate the possible cellular infiltration induced by MSU, myeloperoxidase (MPO) and N-acetyl- $\beta$ ,D-glucaminidase (NAGase) activity was used as an index of neutrophil and macrophage accumulation, respectively, in MSU-injected tissue [23]. The plantar surface of the hind paw was harvested at 10, 60 or 480 minutes after the s.c. injection of MSU crystals (0.25 mg/paw) or vehicle. Samples were homogenized in sodium acetate buffer (80 mM, pH 5.5) containing 0.5% HTAB and kept at 4°C. Just before the assay, the tissue homogenate was centrifuged at 20,000 xg for 20 min, and the supernatant was then collected for assay.

To determine MPO activity, 10  $\mu$ l supernatant was mixed with 100  $\mu$ l of sodium acetate buffer (80 mM, pH 5.5) and 10  $\mu$ l of TMB and incubated for 3 minutes at 37°C. After this step, the reaction was stopped in ice by the addition of 30  $\mu$ l acetic acid. The color formed was analyzed by spectrophotometer at 630 nm. Alternatively, to determine NAGase activity, 25  $\mu$ l of supernatant was mixed with sodium citrate buffer (50 mM, pH 4.5) and 25  $\mu$ l of *p*-nitrofenil-2-acetamide- $\beta$ -D-glicopiranoside (NAG 2.25 nM) and incubated for 60 minutes at 37°C. After this time, the reaction was stopped on ice by the addition of 100  $\mu$ l glycine buffer (0.2  $\mu$ M, pH 10.4). The color formed was analyzed by spectrophotometer at 405 nm. Both reactions were read in a Fisher Biotech Microkinetics BT 2000 microplate reader. Values were expressed as optical densities, corrected by tissue mg.



#### 4.10 [<sup>3</sup>H]Resiniferatoxin Binding Assay

Binding assays were carried out as described previously [43]. To obtain membranes for the binding studies, spinal cords of rats were removed and disrupted with the aid of a tissue homogenizer in ice-cold buffer A, pH 7.4, which contained 5 mM KCl, 5.8 mM NaCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.75 mM CaCl<sub>2</sub>, 12 mM glucose, 137 mM sucrose, and 10 mM HEPES. The homogenate was first centrifuged for 10 min at 1000 xg in 4°C. The low-speed pellets were discarded, and the supernatants were further centrifuged for 30 min at 35,000 xg in 4°C. The resulting high-speed pellets, re-suspended in buffer A, were stored at 70°C until assayed. Binding assays were carried out in duplicate with a final volume of 500 µl, containing buffer A, supplemented with 0.25 mg/ml bovine serum albumin, membranes (100 g/protein), and 50 pM [<sup>3</sup>H]resiniferatoxin. For the measurement of nonspecific binding, 100 nM non-radioactive RTX was included in some tubes. Assay mixtures were set up on ice, and the binding reaction was then initiated by transferring the assay tubes to a 37°C water bath. After a 60-minute incubation period, cooling the mixtures on ice terminated the binding reaction, and then 100 g of bovine α1-acid glycoprotein was added to each tube (to reduce nonspecific binding). Finally, the bound and free membranes of [<sup>3</sup>H]resiniferatoxin were separated by centrifuging for 15 min at 20,000 xg in 4°C. The pellet was quantified using scintillation counting. Specific binding was calculated as the difference between the total and nonspecific binding.

#### **4.11 Statistical analysis**

All values are expressed as mean  $\pm$  S.E.M., except for ED<sub>50</sub> values (i.e., the necessary dose of MSU to elicit 50% of the response relative to the control value) and ID<sub>50</sub> values (i.e., the necessary dose to elicit 50% of the inhibition response relative to the control value), which are given as the geometric means accompanied by their respective 95% confidence limits. The percentages of inhibition are reported as the mean  $\pm$  S.E.M., calculated for the maximal developed responses obtained after injection of MSU in comparison with vehicle-treated animals. The statistical significance between groups was assessed by the Student "t" test and one- or two-way analysis of variance (ANOVA) when appropriate. Pos-hoc tests (Student-Newman-Keuls'-SNK for one way or Bonferroni for two way ANOVA) were carried out when appropriate. P values less than 0.05 (P<0.05) were considered to be indicative of significance. The ED<sub>50</sub> and ID<sub>50</sub> values were determined by non-linear regression analysis with a sigmoid dose-response equation using the GraphPad Software 4.0 (Graph Pad, USA).

## 4.12. RESULTS

### 4.12.1. MSU crystal-induced nociception and edema

The subcutaneous injection of MSU crystals (0.25 mg/paw) into rat paws caused a slow onset of spontaneous nociception as follows: not observed in the initial 5 minutes after its administration, being maximal from 5 to 10 minutes, and disappearing altogether at 10 minutes after injection (Figure 1A). The same treatment also induced edema formation, which began at 30 min, with a maximal effect at 1 h (Figure 1C). Based on these findings, the further experiments of nociceptive and edematogenic responses were measured during 10 min and 1 hour after injection, respectively. The nociceptive and edematogenic effects produced by MSU (0.015–2 mg/paw) were dose dependent (Figure 1B and 1D), with  $DE_{50}$  of 0.042 (0.015-0.118) mg/paw or 0.089 (0.046-0.170) mg/paw and maximal effects of  $36 \pm 7$  s and  $1 \pm 0.1$  mm, respectively. Thus, an MSU dose of 0.25 mg/paw was chosen for the further experiments to induce nociception and edema in order to avoid supramaximal stimulation and the consequent unnecessary animal discomfort.

### 4.12.2. Participation of TRPV1 and $NK_1$ receptors and capsaicin-sensitive sensory fibers in MSU-induced nociception and edema

The co-administration of the selective TRPV1 receptor antagonist SB 366791 (0.1-100 nmol/paw) almost abolished MSU-induced nociception and edema (Figure 2C and 2D), with calculated  $DI_{50}$  values of 0.34 (0.07-4.22) nmol/paw and 0.07 (0.001-5.8) mg/paw and maximal inhibition of  $90 \pm 6\%$  and 100%, respectively. Similar to MSU, subcutaneous injection of the TRPV1 receptor agonist capsaicin (0.01 or 1 nmol/paw) into the rat paw also produced nociceptive and edematogenic actions, both abolished by SB 366791 (10 nmol/paw) (Table 1). Furthermore, high concentrations of urate (75-750  $\mu$ M) were not capable of altering the specific binding of [ $^3$ H]resiniferatoxin to TRPV1 receptor.

The NK<sub>1</sub> receptor antagonist RP 67580 (20 nmol/paw) partially reduced MSU-induced nociceptive (55±9%) and edematogenic (48±6%) responses (Figure 3A and 3B, respectively). The same treatment with RP 67580 practically abolished nociception (84±11%) and edema (95±1%) caused by the NK<sub>1</sub> receptor agonist substance P (0.1 nmol/paw) (Table 1).

To investigate the participation of capsaicin-sensitive sensory fibers in the MSU-induced edema and nociception, the animals were submitted to a perineural capsaicin desensitization protocol. The nociception and edema induced by capsaicin (0.01 nmol/paw) or MSU (0.25 mg/paw) were largely inhibited in 87±3% and 84±7 (Table 1) or 88±4% and 50±13% (Figure 3C and D), respectively (Table 1).

#### 4.12.3. Mast Cell participation in MSU nociception and edema

It was observed that the previous mast cell degranulation caused by compound 48/80 during four consecutive days resulted in significant inhibition of the nociception (71±12%) and edema (50±18%) produced by MSU (Figure 4C and 4D, respectively). With our treatment of compound 48/80 degranulated mast cells, we observed a decrease in the histamine and serotonin content in the injected tissue (reductions of 85±3% and 41±7%, respectively) (Figure 5A and 5B, respectively).

In the same way, pretreatment with the mast cell membrane stabilizer cromolyn (2 µmol/paw) injections reduced nociception and edema (inhibitions of 58±9% and 67±5%, respectively) caused by MSU (0.25 mg/paw) (Figure 4A and 4B). Additionally, we observed that MSU (0.25 mg/paw) released histamine, serotonin and tryptase when compared with vehicle-treated animals (increases of 138±34, 72±17 and 31±7 in relation to control animals, respectively) (Figure 5C, D and F).

Moreover, the role of histamine or serotonin in the MSU response was confirmed by administration of histaminergic or serotonergic antagonists. The co-administration of the H<sub>1</sub> receptor antagonist promethazine (120 nmol/paw) significantly reduced the edematogenic effect induced by MSU crystals by 71±10% (Figure 6B); however, it failed to reduce the nociceptive response (Figure 6A). On the other hand, promethazine was able to abolish both the nociception and edema caused by histamine (20 µmol/paw) (Table 1). Likewise, the 5-HT receptor antagonist

methysergide (10 nmol/paw) inhibited the edema ( $67\pm 7\%$ ), but not the nociception, induced by MSU (Figure 6C and D). The same treatment with methysergide was capable of abolished nociception and edema caused by serotonin (60 nmol/paw) (Table 1).

Finally, the role of tryptase, a serine peptidase released by mast cells, in MSU-induced responses was investigated. Pre-administration of the non-selective serine peptidase inhibitor SBTI (100  $\mu\text{g/ml}$ ) significantly inhibited nociception ( $53\pm 9\%$ ) and edema ( $30\pm 10\%$ ) caused by MSU (Figure 7A and B). Moreover, the pre-administration of the selective tryptase inhibitor gabexate mesilate (0.1 nmol/paw) largely inhibited either nociceptive ( $87\pm 5\%$ ) or edematogenic ( $61\pm 9\%$ ) responses to MSU (Figure 7C and 7D, respectively).

#### **4.12.4. Evaluation of leukocyte infiltration by MSU**

Infiltration of leukocytes was measured by the activity of marker enzymes for neutrophils (MPO) or macrophages (NAGase) in injected tissue. MSU crystals (0.25 mg/paw) induced neutrophil and macrophage infiltration at 240 minutes, but not 10 or 60 minutes, after injection (Table 2).

#### 4.13. DISCUSSION

Acute gouty arthritis is an inflammatory response to deposition of MSU in the articular joint space. Since gout-related pain is described as burning and TRPV1 is involved in the detection of several harmful stimuli, including noxious heat, we investigated the role of TRPV1 in the nociceptive and inflammatory effects induced by MSU. Here, we demonstrated that the activation of TRPV1 receptors mediates MSU crystal-elicited nociception and edema through a mechanism that involves the stimulation of capsaicin-sensitive sensorial fibers and the degranulation of mast cells.

First, we characterized the nociceptive response induced by MSU crystals, since we did not find previous literature assessing nociception after subcutaneous injection of MSU into rat paws. The spontaneous nociceptive behavior induced by MSU appeared slowly, not observed in the initial 5 minutes after its administration. This delayed pattern of response suggests that MSU does not directly activate nociceptors but rather needs other cells in the injected tissue to stimulate the peripheral terminals of afferent fibers. In fact, in contrast to MSU, direct stimulators of nociceptors, such as capsaicin, substance P and serotonin, induce numerous spontaneous nociceptive responses in the first minute after their subcutaneous injection into the rodent paw [38,15] (results not shown). Moreover, we observed that spontaneous nociception seems to be independent of the edema induced by MSU. This finding is expected since edema formation depends on several previous events, such as arteriolar vasodilatation, venous constriction and plasma extravasation [14]. Finally, we observed that MSU produced a significant leukocyte infiltration just 4 hours after its injection. Thus, despite the idea that the pain observed in gout is only due to leukocyte infiltration and activation by MSU [10,9], we suggest that some resident cells, such as mast cells (see below), may also contribute to pain production during gout attacks. Accordingly, it has been also demonstrated that urate can cause painful joints in the absence of an apparent leukocyte infiltration [16].

In acute gout attacks, an initial warmth sensation followed by an excruciating burning pain has been reported [10,48]. TRPV1 seems to be important in the detection of noxious heat, since TRPV1 agonists induce and TRPV1 antagonists reverse burning pain in humans [3]. Furthermore, extracts of chili peppers have been used medicinally as a remedy for gout, and continuous topical treatment with the

active compound of chili pepper capsaicin has been shown to be beneficial in patients with some types of arthritis [27,46]. Therefore, we investigated the participation of this receptor in MSU-induced nociception and edema. We have found that treatment with the selective TRPV1 antagonist SB 366791 is effective in reducing MSU-induced nociceptive and edematogenic responses. Since our binding assay demonstrated that urate does not directly bind to the TRPV1 receptor, at least in the vanilloid site, the action of MSU on the TRPV1 receptor seems to be indirect. These results clearly demonstrate a critical role of TRPV1 in the nociceptive and edematogenic effects elicited by MSU.

TRPV1 receptors are highly expressed in sub-types of primary afferents fibers, namely, peptidergic C fibers [21]. Thus, capsaicin treatment can desensitize peptidergic C fibers to capsaicin itself or to other stimuli that use these fibers to produce their actions [17,34]. The perineural application of capsaicin may be regarded as a specific chemodenervation technique that produces a permanent and selective loss and/or blockade of C-fiber polymodal nociceptor afferents [6]. Demonstrating that MSU depends on capsaicin-sensitive TRPV1-expressing fibers to exert its action, we show that perineural desensitization reduced both algescic and edematogenic effects produced by capsaicin or MSU. Our results are in accordance with data showing that different capsaicin desensitization protocols can reduce the nociceptive and edematogenic responses induced by MSU [34,22]. Moreover, some studies have demonstrated that the stimulation of C fibers, but not A delta fibers, is related to the nociception induced by MSU [12].

TRPV1 activation by the agonist capsaicin induces substance P release from C primary afferent fibers [14]. Accordingly, we have detected that the NK1 receptor antagonist RP 67580 decreased nociception and edema induced by MSU. Our results are in agreement with a previous finding where MSU injection in domestic chicken ankle joints produced a depletion of substance P from peripheral C fibers in the synovial and subsynovial tissue [24]. Thus, these results suggest that the substance P released from capsaicin-sensitive fibers can be strongly involved in nociceptive and edematogenic responses.

Substance P is a major inflammatory mediator that produces, among other events, mast cell degranulation, which is a recognized component of the arthritic inflammatory process [33]. Moreover, it has been reported that MSU degranulates rat peritoneal mast cells [13]. Activation of both human and rodent mast cells leads to

the release of several pro-inflammatory mediators and enzymes such as serotonin, histamine and tryptase [29]. We demonstrate here that the nociceptive and edematogenic response caused by MSU was significantly reduced by both mast cell membrane stabilization and previous degranulation, suggesting that the pain and inflammation in gout result from the activation of some mediators released by these cells. Accordingly, mast cells are found in large numbers in the inflamed human rheumatoid synovium [49].

Histamine and serotonin are important substances released from mast cells. To further investigate the role of these mediators in the MSU mechanisms, we tested the effect of H<sub>1</sub> and 5-HT antagonists on nociception and edema induced by MSU and measured the levels of histamine and serotonin in the perfusates of the injected tissue. Promethazine (H<sub>1</sub> antagonist) and methysergide (5-HT antagonist) inhibited edema, but not the nociception, caused by MSU. These results are not unexpected since both serotonin and histamine are much more potent inductors of edema than nociception in rats [15,7]. Accordingly, the minimum doses at which subcutaneous histamine and serotonin cause nociception in rats were 10 and 1 µg/paw, respectively [15]. Therefore, the amount of histamine and serotonin released in the perfusate of MSU-injected paws was not enough to cause nociception (equivalent to 0.001 µg/paw and 0.06 µg/paw for histamine and serotonin, respectively). Moreover, our data confirm previous studies that have demonstrated the role of histamine and serotonin in MSU-induced edema [47]. In summary, the increase in both mediators found here may be responsible for the development of paw edema, but not of nociceptive behavior.

In addition to histamine and serotonin, mast cells may also release tryptase, a trypsin-like serine protease that is the most abundant mediator stored in rat mast cell granules [31]. We observed that both the non-selective and the selective inhibition of tryptase reduced both nociception and edema caused by MSU. Tryptase is responsible by the activation of proteinase activated receptor-2 (PAR-2) [31], which is present in primary sensory neurons [40] and is involved in inflammatory responses and nociception [19]. Therefore, our results indicate a possible role for the PAR-2 receptor in the MSU-induced nociception and edema. Interestingly, trans-activation of TRPV1 receptor by the PAR-2 receptor has been demonstrated [18,8,1].

In summary, the TRPV1 receptor seems to be involved in the pain and edema caused by MSU crystals, probably through the activation of peptidergic C fibers.



Accordingly, mast cells could be mediating by these responses, since TRPV1 protein was present in this cell and the participation of its mediators were also demonstrated. Thus, both TRPV1 and mast cells can be potential targets for the development of new therapies for acute gout.

**4.14. ACKNOWLEDGEMENTS**

This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). We thank the Dr. José Antônio Trindade Borges da Costa and the student Mariana Saibit of Laboratório iVic (Grupo de Imageamento e Visão Computacional) for their crystal measurements and support. The fellowships from CNPq are also acknowledged.

#### 4.15. REFERENCES

- [1] Amadesi S, Nie J, Vergnolle N, Cottrell GS, Grady EF, Trevisani M, Manni C, Geppetti P, McRoberts JA, Ennes H, Davis JB, Mayer EA, Bunnett NW. Protease-activated receptor 2 sensitizes the capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid receptor 1 to induce hyperalgesia. *J Neurosci* 2004;24:4300-4312.
- [2] Andrade EL, Luiz AP, Ferreira J, Calixto JB. Pronociceptive response elicited by TRPA1 receptor activation in mice. *Neuroscience* 2008;152:511-520.
- [3] Bandell M, Macpherson LJ, Patapoutian A. From chills to chilis: mechanisms for thermosensation and chemesthesis via thermoTRPs. *Curr Opin Neurobiol* 2007;17:490-497.
- [4] Birklein F, Schmelz M. Neuropeptides, neurogenic inflammation and complex regional pain syndrome (CRPS). *Neurosci Lett* 2008;437:199-202.
- [5] Calixto JB, Kassuya CA, André E, Ferreira J. Contribution of natural products to the discovery of the transient receptor (TRP) channels family and their functions. *Pharmacol Ther* 2005;106:179-208.
- [6] Chumng JM, Lee KH, Hori Y, Willis WD. Effects of capsaicin applied to a peripheral nerve on the responses of primate spinothalamic tract cells. *Brain Res* 1985;329:27-38.
- [7] Crunkhorn P, Meacock SC. Mediators of the inflammation induced in the rat paw by carrageenin. *Br J Pharmacol* 1971;42:392-402.
- [8] Dai Y, Moriyama T, Higashi T, Togashi K, Kobayashi K, Yamanaka H, Tominaga M, Noguchi K. Proteinase-activated receptor 2-mediated potentiation of transient receptor potential vanilloid subfamily 1 activity reveals a mechanism for proteinase-induced inflammatory pain. *J Neurosci* 2004;24:4293-4299.
- [9] Dalbeth N, Haskard DO. Mechanisms of inflammation in gout. *Rheumatology* 2005;44:1090-1096.
- [10] Faires JS, McCarty DJ Jr. Acute arthritis in man and dog after intrasynovial injection of sodium urate crystals. *Lancet* 1962;2:682-685.
- [11] Ferreira J, da Silva GL, Calixto JB. Contribution of vanilloid receptors to the overt nociception induced by B2 kinin receptor activation in mice. *Br J Pharmacol* 2004;141:787-794.

- [12] Gentle MJ. Sodium urate arthritis: effects on the sensory properties of articular afferents in the chicken. *Pain* 1997;70:245-251.
- [13] Getting SJ, Flower RJ, Parente L, Medicis R, Lussier A, Wolitzky BA, Martins M, Perreti M. Molecular Determinants of monosodium urate crystals-induced murine peritonitis: A role for endogenous mast cells and a distinct requirement for endothelial-derived selectins. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;283:123-130.
- [14] Holzer P. Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. *Pharmacol Rev* 1991;43:143-201.
- [15] Hong Y, Abbot FV. Behavioural effects of intraplantar injection of inflammatory mediators in the rat. *Neuroscience* 1994;63:827-836.
- [16] Horowitz MD, Abbey L, Sirota DK, Spiera. Intraarticular noninflammatory free urate suspension (urate milk) in 3 patients with painful joints. *J Rheumatol* 1990;17:712-714.
- [17] Jancsó N, Jancsó-Gábor A, Szolcsányi J. Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by pretreatment with capsaicin. *Br J Pharmacol Chemother* 1967;31:138-151.
- [18] Kawao N, Shimada C, Itoh H, Kuroda R, Kawabata A. Capsazepine inhibits thermal hyperalgesia but not nociception triggered by protease-activated receptor-2 in rats. *Jpn J Pharmacol* 2002;89:184-187.
- [19] Kawabata A, Kawao N, Kuroda R, Tanaka A, Itoh H, Nishikawa H. Peripheral PAR-2 triggers thermal hyperalgesia and nociceptive responses in rats. *Neuroreport* 2001;12:715-719.
- [20] Kelso EB, Lockhart JC, Hembrough T, Dunning L, Plevin R, Hollenberg MD, Sommerhoff CP, McLean JS, Ferrel W. Therapeutic promise of proteinases-activated receptor-2 antagonism in joint inflammation. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 316:1017-1024.
- [21] Kobayashi K, Fukuoka T, Obata K, Yamanaka H, Dai Y, Tokunaga A, Noguchi K. Distinct expression of TRPM8, TRPA1 and TRPV1 mRNAs in rat primary afferent neurons with delta/c-fibers and colocalization with trk receptors. *J Comp Neurol* 2005;493:596-606.
- [22] Lam FY, Ferrel WR. Neurogenic component of different models of acute inflammation in the rat knee joint. *Ann Rheum Dis* 1991;50:747-751.

- [23] Lloret S, Moreno JJ. Effects of an anti-inflammatory peptide antflammin 2) on cell influx, eicosanoid biosynthesis and oedema formation by arachidonic acid and tetradecanoyl phorbol dermal application. *Biochem Pharmacol* 1995;50:347-353.
- [24] Lunam CA, Gentle MJ. Substance P immunoreactive nerve fibres in the domestic chick ankle joint before and after acute urate arthritis. *Neurosci Lett* 2004;354:87-90.
- [25] Martinon F, Glimcher LH. Gout: new insights into an old disease. *J Clin Invest* 2006;116:2073-2075.
- [26] Martinon F, Pétrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* 2006;440:237-241.
- [27] Mason L, Moore RA, Derry S, Edwards JE, McQuay HJ. Systematic review of topical capsaicin for the treatment of chronic pain. *BMJ* 2004;328:991-995.
- [28] Matsukawa A, Yoshimura T, Maeda T, Takahashi T, Ohkawara S, Yoshinaga M. Analysis of the cytokine network among tumor necrosis factor alpha, interleukin-1beta, interleukin-8, and interleukin-1 receptor antagonist in monosodium urate crystal-induced rabbit arthritis. *Lab Invest* 1998;78:559-569.
- [29] Metcalfe DD, Baram D, Mekori YA. Mast cells. *Physiol Rev* 1997; 77:1033-1079.
- [30] Milano J, Rossato MF, Oliveira SM, Drewes C, Machado P, Beck P, Zanatta N, Martins MA, Mello CF, Rubin MA, Ferreira J, Bonacorso HG. Antinociceptive action of 4-methyl-5-trifluoromethyl-5-hydroxy-4, 5-dihydro-1H-pyrazole methyl ester in models of inflammatory pain in mice. *Life Sci* 2008; 83:739-746.
- [31] Molino S, Barnathan ES, Numerof R, Clark J, Drever M, Cumashi A, Hoxie JA, Schechter N, Woolkalis M, Brass LF. Interactions of mast cell tryptase with thrombin receptors and PAR-2. *J Biol Chem* 1997;272:4043-4049.
- [32] Mori S, Itoh Y, Shinohata R, Sendo T, Oishi R, Nishibori M. Nafamostat mesilate is an extremely potent inhibitor of human tryptase. *J Pharmacol Sci* 2003;92:420-423.
- [33] Niissalo S, Hukkanen M, Imai S, Törnwall J, Kontinen YT. Neuropeptides in experimental and degenerative arthritis. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 966:384-399.
- [34] Otsuki T, Nakahama H, Niizuma H, Suzuki J. Evaluation of the algescic effects of capsaicin using a new rat model for tonic pain. *Brain Res* 1986;365:235-240.
- [35] Parada CA, Tambeli CH, Cunha FQ, Ferreira SH. The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalin-induced nociception. *Neuroscience* 2002;102:937-944.

- [36] Rassol M, Varalakshmi P. Suppressive effect of *Withania somnifera* root powder on experimental gouty arthritis: An in vivo and in vitro study. *Chem Biol Interact* 2006;164:174-80.
- [37] Santos AR, Calixto JB. Further evidence for the involvement of tachykinin receptor subtypes in formalin and capsaicin models of pain in mice. *Neuropeptides* 1997;31:381-389.
- [38] Sakurada T, Katsumata K, Tan-No K, Sakurada S, Kisara K. The capsaicin test in mice for evaluating tachykinin antagonists in the spinal cord. *Neuropharmacology* 1992;31:1279-1285.
- [39] Shore PA, Burkhalter A, Cohn VH Jr. A method for the fluorometric assay of histamine in tissues, *J Pharmacol Exp Ther* 1959;127:182–186.
- [40] Steinhoff M, Corvera CU, Thoma MS, Kong W, McAlpine BE, Caughey GH, Ansel JC, Bunnett NW. Proteinase-activated receptor-2 in human skin: tissue distribution and activation of keratinocytes by mast cell tryptase. *Exp Dermatol* 1999;8:282-294.
- [41] Sufka KJ, Schomburg FM, Giordano J (1992) Receptor mediation of 5-HT-induced inflammation and nociception in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1992;41:53-56.
- [42] Suzuki K, Ota H, Sasagawa S, Sakatani T, Fujikura T. Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. *Anal Biochem* 1983 Jul 15;132(2):345-52.
- [43] Szallasi A, Bíró T, Modarres S, Garlaschelli L, Petersen M, Klusch A, Vidari G, Jonassohn M, De Rosa S, Sterner O, Blumberg PM, Krause JE. Dialdehyde sesquiterpenes and other terpenoids as vanilloids. *Eur J Pharmacol* 1998;356:81-89.
- [44] Terkeltaub RA. Clinical practice. Gout. *N Engl J Med* 2003;349:1647-1655.
- [45] Ui H, Andoh T, Lee JB, Nojima H, Kuraishi Y. Potent pruritogenic action of tryptase mediated by PAR-2 receptor and its involvement in anti-pruritic effect of nafamostat mesilate in mice. *Eur J Pharm* 2006; 530:172-178.
- [46] Walker RA, McCleane GJ. The addition of glyceryltrinitrate to capsaicin cream reduces the thermal allodynia associated with the application of capsaicin alone in humans. *Neurosci Lett* 2002;323:78-80.
- [47] Webster ME, Maling HM, Zweig MH, Williams MA, Anderson W Jr. Urate crystal induced inflammation in the rat: evidence for the combined actions of kinins, histamine and components of complement. *Immunol Commun* 1972;1:185-98.

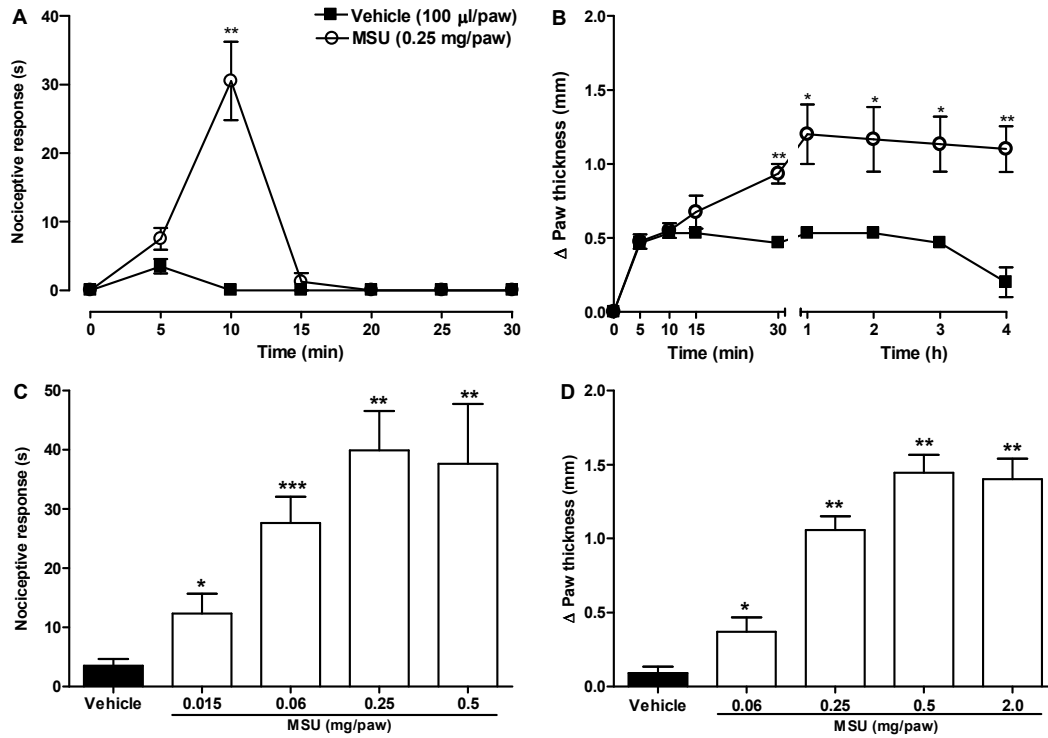
[48] Wilson, C. Observations on Gout and Rheumatism, Including an Account of a Speedy, Safe, and Effectual Remedy for Those Diseases: With Numerous Cases and Communications. 3 Ed. London: Thomas and George Underwood, 500 p., 1823.

[49] Woolley DE, Tetlow LC (2000) Mast cell activation and its relation to proinflammatory cytokine production in the rheumatoid lesion. *Arthritis Res* 200;2:65-74.

[50] Vanable JW Jr. A ninhydrin reaction giving a sensitive quantitative fluorescence assay for 5-hidroxytryptamine. *Anal Biochem* 1963;6:393-403.

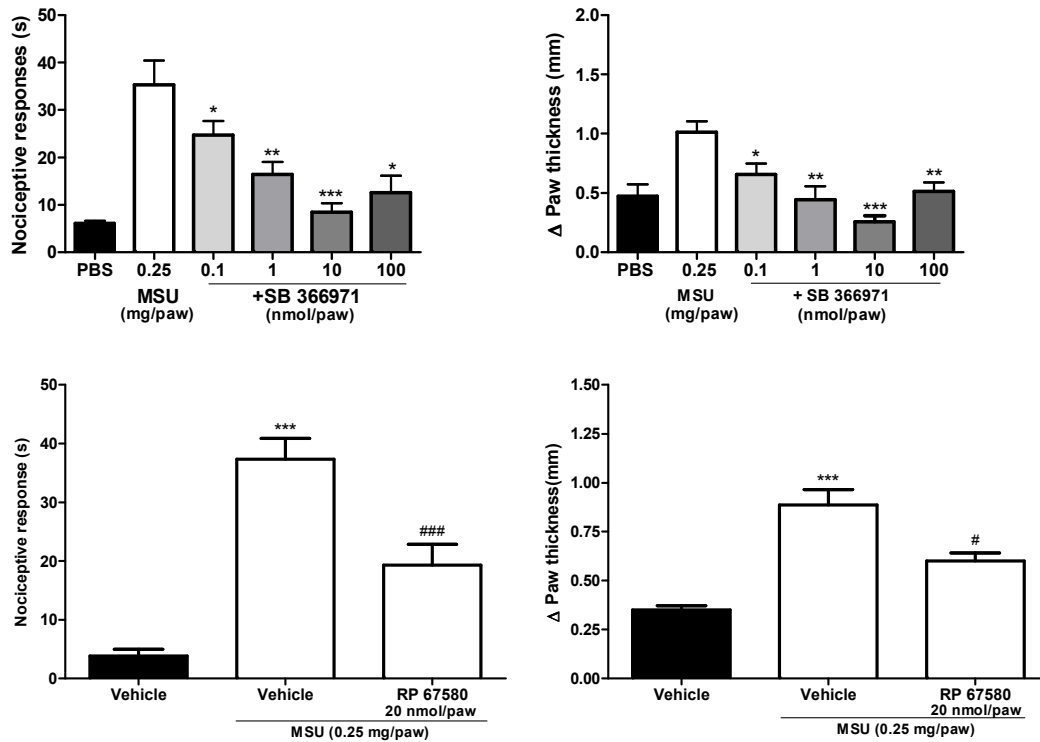
[51] Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 1983;16:109-110.

4.16. Figures

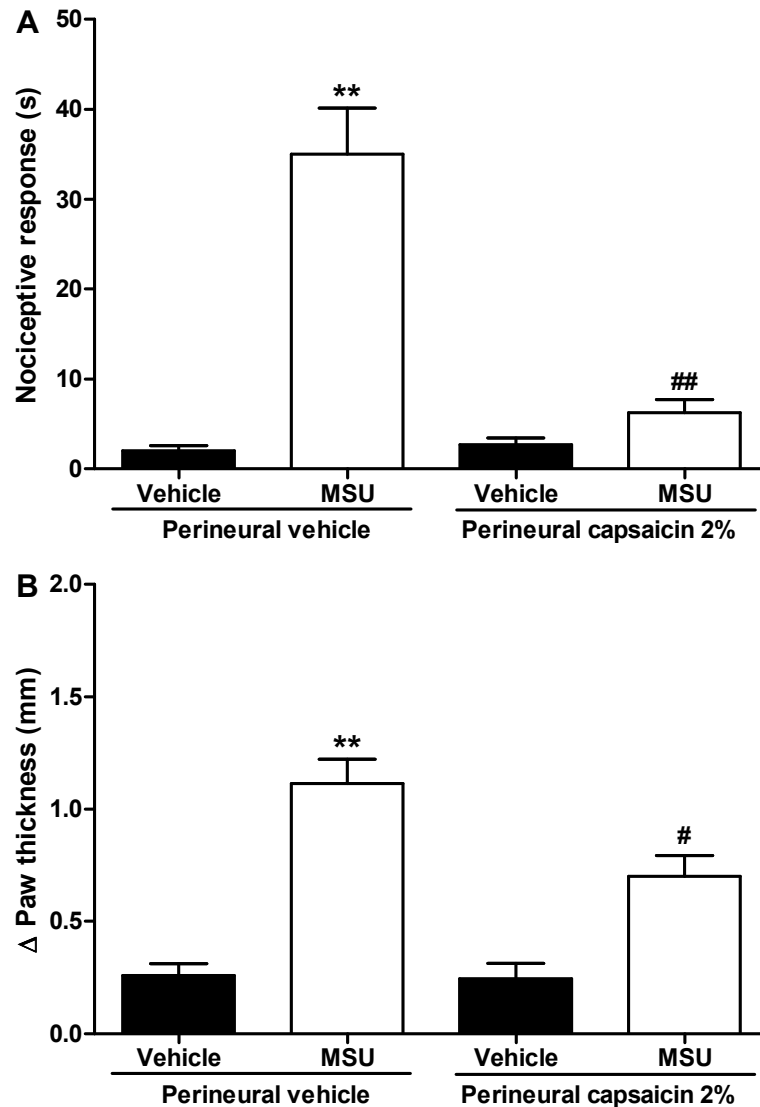


**Figure 1.** MSU crystal-induced nociception and edema. Time course (A and B) and dose-response (C and D) for the nociception and edema caused by s.c. injection of MSU. Each point on the curve represents the mean  $\pm$  S.E.M. of seven to ten rats. The asterisks denote the significance levels. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , one-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls' test.

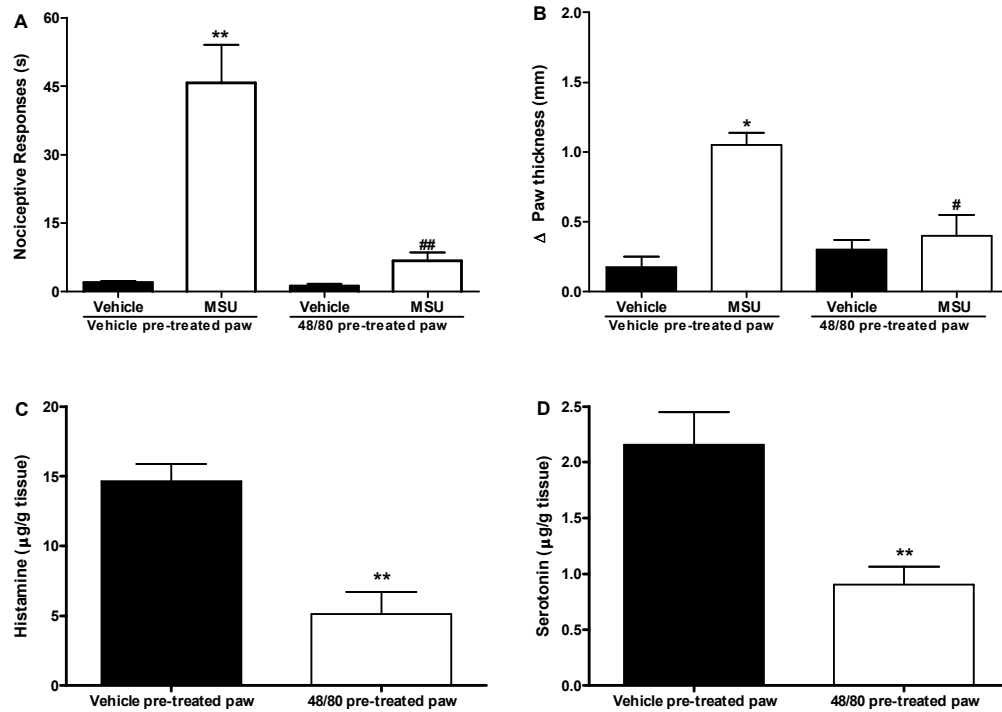




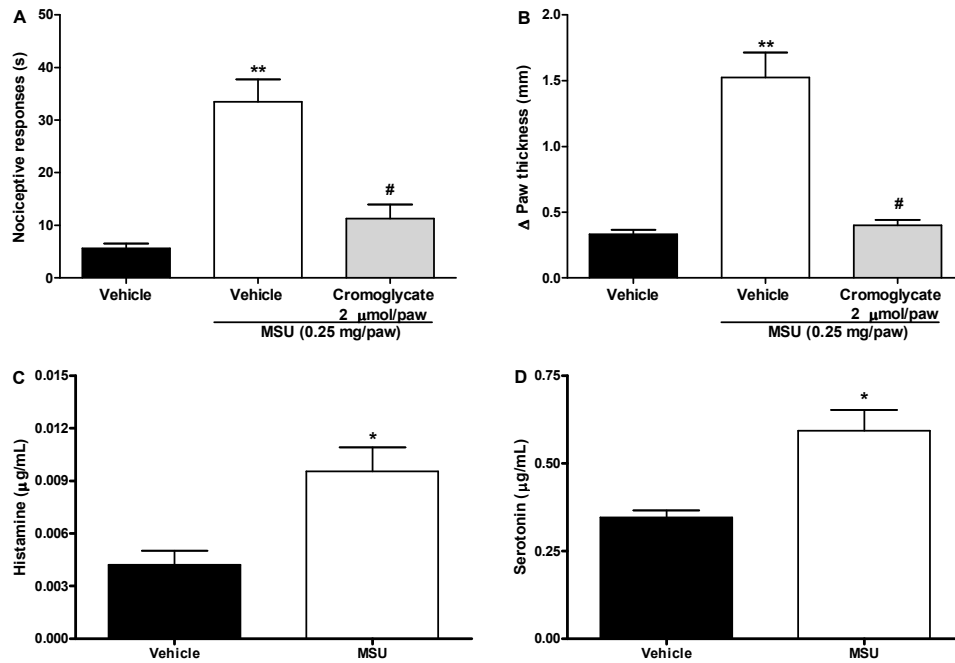
**Figure 2.** Participation of the TRPV1 or NK<sub>1</sub> receptor in MSU-induced nociception and edema. Pretreatment with the TRPV1 receptor antagonist SB 366791 (10 nmol/paw, A and B) or the NK<sub>1</sub> receptor antagonist RP 67580 (20 nmol/paw, C and D) in nociception (A and C) and edema (B and D) induced by MSU (0.25 mg/paw). Each column represents the mean ± S.E.M. of eight rats. The asterisks denote the significance levels. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  in comparison to vehicle, and #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$  difference in comparison to MSU, one-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls' test.



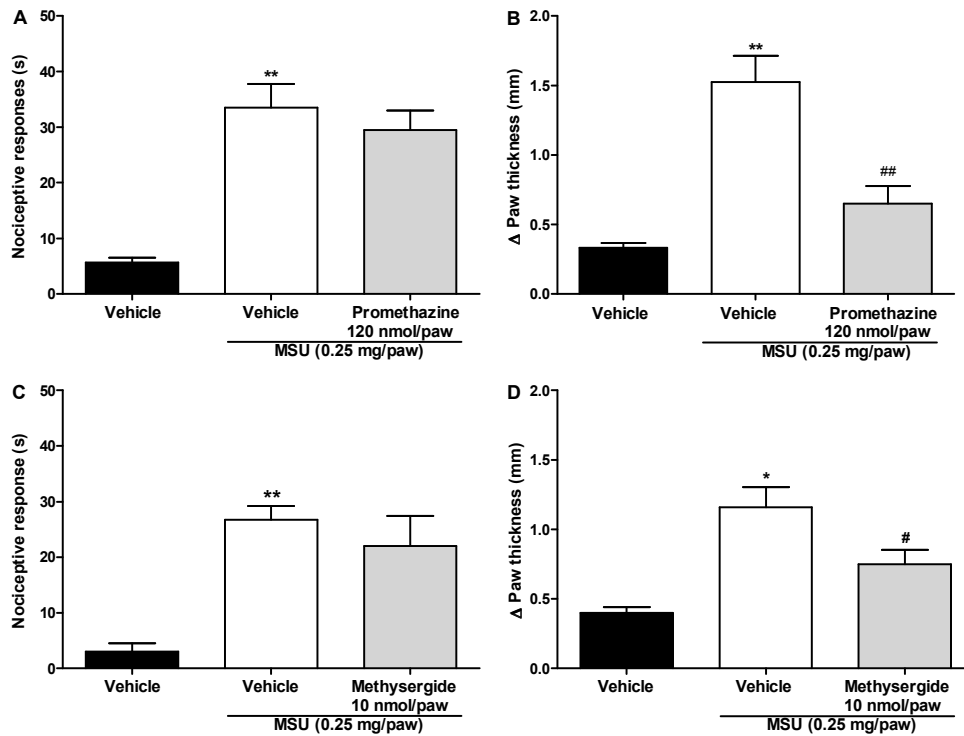
**Figure 3.** Participation of capsaicin-sensitive sensory fibers in MSU-induced nociception and edema. Effect of perineural capsaicin desensitization on nociception (A and C) or edema (B and D) induced by MSU (0.25 mg/paw). Each column represents the mean  $\pm$  S.E.M. of six rats. The asterisks denote the significance levels. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  in comparison to vehicle, and #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$  difference in comparison to MSU treated one-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls' test.



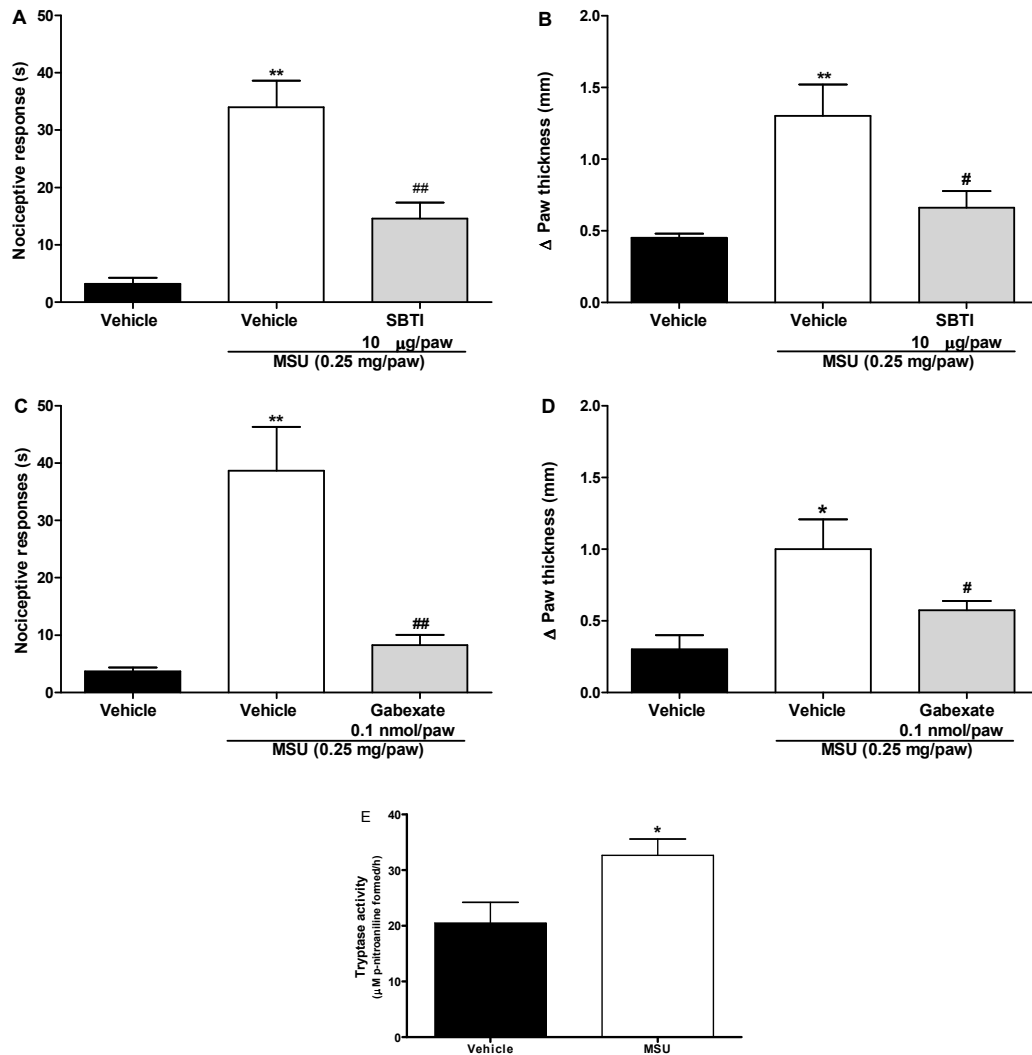
**Figure 4.** Previous mast cell degranulation reduces MSU-induced nociception and edema. Pretreatment with compound 48/80 (1, 3, 10, 10  $\mu\text{g}/\text{paw}$ ) for four consecutive days on the nociceptive (A) or edematogenic (B) effects inducible by s.c. injection of MSU (0.25 mg/paw) on the 5<sup>th</sup> day and on the tissue levels of histamine (C) or serotonin (D). Each column represents the mean  $\pm$  S.E.M. of six to eight rats. The asterisks denote the significance levels. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  in comparison to vehicle, and #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$  difference in comparison to MSU, one-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls' test (A and B) or Student "t" test (C and D).



**Figure 5.** Mast cell degranulation mediated MSU-induced nociception and edema. (A-B) Effect of the pretreatment with sodium cromoglycate (cromoglycate, 2  $\mu$ mol/paw) on MSU nociception (A) and edema (B). (C-D) Levels of histamine (C) or serotonin (D) in paws perfusates 10 minutes after MSU injection. Each column represents the mean  $\pm$  S.E.M. of six rats. The asterisks denote the significance levels. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  in comparison to vehicle, and #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$  difference in comparison to MSU, one-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls' test (A and B) or Student "t" test (C and D).



**Figure 6.** Role of receptors for histamine or serotonin in MSU-induced nociception and edema. Effect of s.c. treatment with the H<sub>1</sub>-receptor antagonist promethazine (120 nmol/paw, A and B) or the 5-HT-receptor antagonist methysergide (10 nmol/paw, C and D) on MSU-induced nociception (A and B) and edema (C and D). Each column represents the mean  $\pm$  S.E.M. of six rats. The asterisks denote the significance levels. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  in comparison to vehicle, and #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$  difference in comparison to MSU, (one-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls' test).



**Figure 7.** Participation of tryptase in MSU-induced nociception and edema. (A-D) Pretreatment with the non-selective inhibitor (soybean trypsin inhibitor, SBTI, 10 µg/paw, A and B) or with the selective tryptase inhibitor (gabexate, 0.1 nmol/paw, C and D) in MSU-induced nociception (A and C) and edema (B and D). (E) Tryptase activity in paw perfusates 10 minutes after MSU injection. Each column represents the mean ± S.E.M. of six rats. The asterisks denote the significance levels. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  in comparison to vehicle, and #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$  difference in comparison to MSU, one-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls' test (A-D) or Student "t" test (E).

## 4.17. Tables

**Table 4.17.1- Positive controls for the pharmacological treatments**

Treatment	Nociceptive Response (s)	$\Delta$ Paw thickness (mm)
Vehicle (100 $\mu$ l/paw)	3 $\pm$ 1	0.3 $\pm$ 0.07
Capsaicin (0.1 or 1 mol/paw) <sup>†</sup>	31 $\pm$ 3 <sup>#</sup>	0.6 $\pm$ 0.1 <sup>#</sup>
+SB 366791 (10 nmol/paw)	12 $\pm$ 2 <sup>*</sup>	0.3 $\pm$ 0.04 <sup>*</sup>
Vehicle (100 $\mu$ l/paw)	4 $\pm$ 1	0.4 $\pm$ 0.03
Histamine (20 nmol/paw)	21 $\pm$ 6 <sup>###</sup>	1.5 $\pm$ 0.2 <sup>###</sup>
+Prometazine(120 nmol/paw)	6 $\pm$ 2 <sup>*</sup>	0.6 $\pm$ 0.2 <sup>**</sup>
Vehicle (100 $\mu$ l/paw)	5 $\pm$ 1	0.4 $\pm$ 0.04
Serotonin (60 nmol/paw)	26 $\pm$ 7 <sup>###</sup>	2.0 $\pm$ 0.2 <sup>###</sup>
+Methysergide (10 nmol/paw)	2 $\pm$ 6 <sup>**</sup>	0.3 $\pm$ 0.1 <sup>**</sup>
Vehicle (100 $\mu$ l/paw)	4 $\pm$ 1	0.3 $\pm$ 0.05
Substance P (0.1 nmol/paw)	62 $\pm$ 6 <sup>###</sup>	1.0 $\pm$ 0.1 <sup>###</sup>
+RP 67580 (20 nmol/paw)	19 $\pm$ 6 <sup>**</sup>	0.5 $\pm$ 0.04 <sup>**</sup>
Compound 48/80 (10 $\mu$ g/paw) in vehicle pre-treated animals	57 $\pm$ 9 <sup>###</sup>	3.5 $\pm$ 0.2 <sup>###</sup>
Compound 48/80 (10 $\mu$ g/paw) in 48/80 pre-treated animals	14 $\pm$ 4 <sup>**</sup>	2.0 $\pm$ 0.3 <sup>**</sup>
Capsaicin (0.1 or 1 mol/paw) <sup>†</sup> in perineural vehicle pre-treated animals	34 $\pm$ 7	0.7 $\pm$ 0.04
Capsaicin (0.1 or 1 mol/paw) in perineural capsaicin (2%) pre-treated animals	8 $\pm$ 1 <sup>**</sup>	0.4 $\pm$ 0.08 <sup>*</sup>

<sup>1</sup> Data are presented as mean  $\pm$  SEM

\* or #  $P < 0.05$ , \*\* or ###  $P < 0.01$ , compared with vehicle (#) or nociceptive / edematogenic substances (\*) group; one-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls' test or Student "t" test.

<sup>†</sup>The doses of 0.1 and 1 nmol/paw were used for evaluate nociception or edema, respectively.

**Table 4.17.2. Infiltration of neutrophil and macrophages in injected paw tissue**

Time after injection (min)	MPO (OD/tissue mg) <sup>1</sup>		NAGase (OD/tissue mg) <sup>1</sup>	
	Vehicle (100 µl/paw)	MSU (0.25 mg/paw)	Vehicle (100 µl/paw)	MSU (0.25 mg/paw)
10	1.0±0.1	1.0±0.1	18.0±0.1	15.0±2.3
60	2.0±0.6	3.0±0.9	14.0±0.2	14.0±1.7
480	5.0±0.4	7.0±0.6*	16.0±1.4	29.0±3.2*

<sup>1</sup>Data are presented as mean of optical density (OD) ± SEM  
The asterisks denote the significance levels; \* < P 0.05, compared with vehicle group (Student "t" test).



Carta referente à submissão do artigo



Juliano Ferreira <ferreiraj99@gmail.com>

**Submission Confirmation for Role of TRPV1 on nociception and edema induced by monosodium urate crystals in rats**

2 mensagens

**Pain** <painjournal@iasp-pain.org>  
 Para: ferreiraj99@gmail.com

8 de julho de 2009 18:46

Journal: Pain  
 Title: Role of TRPV1 on nociception and edema induced by monosodium urate crystals in rats  
 Format: Full-Length Article  
 Authors: Carin G Hoffmeister; Gabriela Trevisan; Mateus F Rossato; Juliano Ferreira

Dear Dr. Ferreira,

Your submission has been received by journal PAIN.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to EES as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/pain/>.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Editorial Staff Pain

**PAIN** [Contact us](#) [Help ?](#) **This site will be unavailable due to maintenance on Saturday 11 July between 06:00 and 11:00 GMT. ([more...](#))** [Sign up for maintenance alerts here.](#)

[home](#) | [main menu](#) | [submit paper](#) | [guide for authors](#) | [register](#) | [change details](#) | [log out](#) Username: JFerreira-527 Role: Author Version: 6.0

**Submissions Being Processed for Author Juliano Ferreira**

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
<a href="#">Action Links</a>		Role of TRPV1 on nociception and edema induced by monosodium urate crystals in rats	Jul 08, 2009	Jul 08, 2009	Manuscript Submitted to Journal

---

## 5. DISCUSSÃO

A artrite gotosa aguda é uma resposta inflamatória induzida pelo depósito de MSU na cavidade articular. Devido ao fato de que a dor relatada na gota é descrita como uma sensação de queimação e que o receptor TRPV1 é envolvido na detecção de diversos estímulos nocivos, incluindo o calor nocivo, nós investigamos o papel desse receptor nos efeitos nociceptivo e inflamatórios induzidos por MSU. Nossos achados demonstraram que a ativação do receptor TRPV1 pode estar mediando a nocicepção e o edema induzido por cristais de MSU, através do mecanismo que envolve a estimulação de fibras sensoriais sensíveis à capsaicina e a degranulação de mastócitos.

Em um primeiro passo em nosso estudo, caracterizamos a resposta nociceptiva induzida por cristais de MSU, já que não encontramos na literatura precedente avaliação da nocicepção após a injeção subcutânea de MSU em pata de rato. Inicialmente, produzimos cristais de MSU conforme metodologia descrita na literatura (Rassool, 2006). Após sua síntese, os cristais foram observados em um microscópio de luz polarizada para avaliação dos seus tamanhos e formatos. Verificamos que os cristais tiveram um tamanho médio de 4-25  $\mu\text{m}$  e formato de agulha (Figura complementar I do Apêndice), tendo assim as mesmas características dos cristais de MSU obtidos de punção de líquido sinovial em pacientes com gota (Horowitz et al., 1990).

O comportamento nociceptivo espontâneo induzido por MSU apareceu lentamente, não sendo observado nos 5 minutos iniciais após a sua administração. Este padrão de resposta atrasada sugere que o MSU não ativa diretamente os nociceptores, sendo necessário à estimulação de outras células no tecido injetado, para estimular os terminais periféricos das fibras aferentes. De fato e diferentemente do MSU, estimuladores diretos dos nociceptores, tais como a capsaicina, a substância P e a serotonina, induzem inúmeros comportamentos nociceptivos espontâneos no primeiro minuto após sua injeção subcutânea na pata de roedores (Sakurada et al., 1992; Hong Y, Abbott, 1994) (resultados não mostrados). Além disso, nós observamos que a nocicepção espontânea parece ser independente do edema induzido por MSU. Estes resultados eram esperados, já que a formação do edema depende de diversos eventos precedentes, tais como a vasodilatação arteriolar, constrição venular e o extravasamento plasmático (Holzer, 1991). Finalmente, nós observamos que o MSU produziu uma infiltração significativa de leucócitos apenas 4 horas após sua injeção. Assim, diferente da idéia que a dor

observada na gota é somente devido à infiltração e ativação de leucócitos por MSU (Dalbeth e Haskard, 2005; Faires e McCarty, 1962) nós sugerimos que algumas células residentes, tais como mastócitos, possam igualmente contribuir para a produção da dor durante ataques de gota. Conforme demonstrou-se que o urato pode causar sensações dolorosas na ausência de uma infiltração aparente da leucócito (Horowitz et al., 1990).

Em ataques agudos de artrite úrica relata-se uma sensação inicial do calor seguida por uma dor ardente excruciante (Faires et al., 1962; Wilson, 1823). O receptor TRPV1 parece ser importante na detecção do calor nocivo, visto que os agonistas TRPV1 induzem e os antagonistas TRPV1 revertam a dor ardente no ser humano (Bandell 2007). Além disso, o extrato de pimenta tem sido usado farmacologicamente para tratamento de gota e o tratamento tópico contínuo com o composto ativo da pimenta capsaicina foi mostrado ser benéfico nos pacientes com alguns tipos da artrite (Walker and McCleane, 2002; Mason et al., 2004). Conseqüentemente, nós investigamos a participação deste receptor na nocicepção e no edema induzidos MSU. Nós verificamos que o tratamento com o SB 366791 seletivo antagonista TRPV1 foi eficaz na redução das respostas nociceptivas e edematogênicas induzidas por MSU. Assim, nosso resultado de união específica demonstrou que o urato não liga diretamente ao receptor TRPV1, pelo menos no sítio de ligação vanilóide, a ação de MSU no receptor TRPV1 parece ser indireta. De forma interessante, verificamos que a administração de urato na pata de ratos também causa nocicepção e edema, porém com menor eficácia do que os cristais de MSU (Figura complementar II do Apêndice). Estes resultados demonstram claramente um papel crítico de TRPV1 nos efeitos nociceptivo e edematogênico elucidados por MSU. Porém, a estimulação do TRPV1 pelo urato parece ocorrer de forma indireta.

Verificamos também que administração intra-articular de MSU em ratos induz nocicepção espontânea, hiperalgesia térmica, alodínia mecânica e edema (Figura complementar III do Apêndice). Todas estas ações do MSU foram reduzidas pelo antagonista do receptor TRPV1 SB366791 (Figura complementar IV do Apêndice). Desta forma, a participação do TRPV1 na nocicepção causada pelo MSU parece não ser restrita ao modelo de injeção s.c. de cristais, mas também ao modelo de injeção intra-articular de MSU, que é mais próximo ao que ocorre clinicamente em pacientes com gota.

Os receptores TRPV1 são altamente expressos em subtipos de fibras aferentes primárias, denominadas fibras peptidérgicas tipo C (Kobayashi et al., 2005). Assim, o tratamento com capsaicina pode dessensibilizar as fibras tipo C à ação da própria capsaicina ou a outros estímulos que usam estas fibras para produzir suas ações (Jancsó et al., 1967; Otsuki et al., 1986). A aplicação perineural de capsaicina pode ser considerada como uma técnica específica de quimiodenervação, a qual produz uma perda e/ou um bloqueio seletivo e permanente de fibras aferentes primárias do tipo C (Jancsó et al., 1967). Demonstrando que MSU depende de fibras sensíveis à capsaicina que expressam TRPV1 para exercer sua ação, nós demonstramos que a dessensibilização perineural reduziu o efeito algésico e edematogênico produzido pelo capsaicina ou pelo MSU. Nossos resultados estão de acordo com os dados da literatura que mostram que os diferentes protocolos da dessensibilização por capsaicina podem reduzir as respostas nociceptiva e edematogênica induzidas por MSU (Otsuki et al., 1986; Lam e Ferrel, 1990). Além disso, alguns estudos demonstraram que a estimulação de fibras C, mas não de fibras A delta, está relacionada com o nocicepção induzida por MSU (Gentle, 1997).

A ativação TRPV1 por seu agonista capsaicina induz a liberação da substância P das fibras aferentes primárias C (Holzer, 1991). Consequentemente, nós detectamos que o antagonista do receptor NK1 RP 67580 diminuiu a nocicepção e o edema induzidos por MSU. Nossos resultados concordam com um trabalho anterior cuja pesquisa demonstrou que a injeção de MSU na articulação do tornozelo de galinhas domésticas produziu uma depleção de substância P das fibras periféricas tipo C em tecido sinovial e sub-sinovial (Lunam e Gentle, 2004). Assim, estes resultados sugerem que a substância P liberada de fibras sensíveis à capsaicina possam estar fortemente envolvidas nas respostas nociceptiva e edematogênica causadas pelo depósito de MSU.

A substância P é o principal mediador inflamatório que produz entre outros eventos, a desgranulação de mastócitos, os quais são reconhecidos como componentes do processo inflamatório artrítico (Nissalo, 2002). Do mesmo modo, tem sido relatado que MSU é capaz de desgranular mastócitos (Getting et al., 1997). A ativação de mastócitos em seres humanos e roedores conduz à liberação de diversas enzimas e mediadores pró-inflamatórios, como o serotonina, a histamina e a triptase (Metcalf, 1997). Nós demonstramos que a resposta nociceptiva e

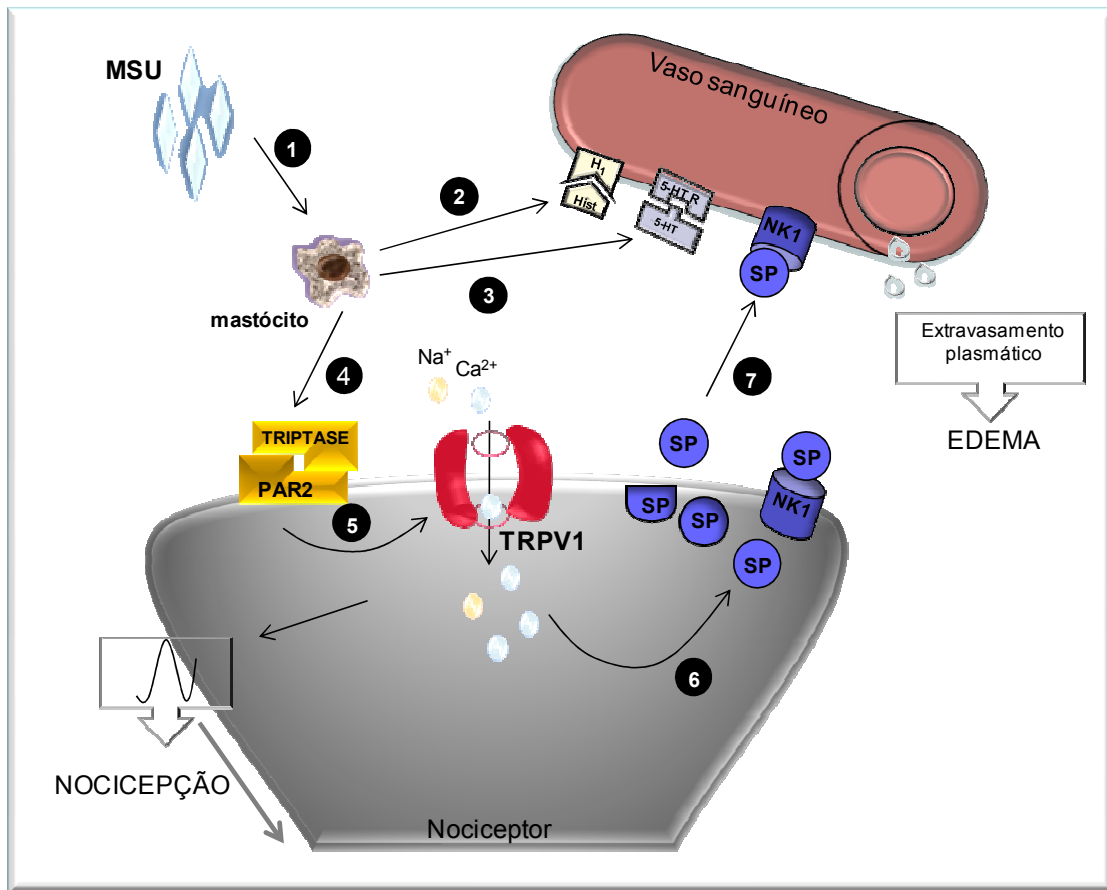
edematogênica causada por MSU foi significativamente reduzida pela estabilização da membrana ou pela desgranulação prévia de mastócitos, sugerindo que a dor e a inflamação da gota podem estar resultando da ativação de alguns mediadores liberados pelos mastócitos. Além disto, nós verificamos que a administração s.c. de MSU na pele da pata de ratos induz desgranulação de mastócitos, semelhante ao que ocorre após injeção de MSU em peritônio ou bolha de ar de roedores (Schiltz et al., 2002). Semelhante ao que ocorre nestes modelos experimentais de gota pode sugerir-se que a desgranulação de mastócitos possa também ocorrer na articulação de humanos com gota, pois mastócitos são encontrados em elevado número no líquido sinovial humano inflamado e parecem ser importantes na manutenção da inflamação articular (Woolley e Tetlow, 2000; Nigrovic e Lee, 2005).

A histamina e o serotonina são importantes substâncias liberadas pelos mastócitos. Então, para investigar melhor o papel destes mediadores nos efeitos de MSU, nós testamos o efeito dos antagonistas H1 e 5-HT na nocicepção e no edema induzidos por MSU e medimos os níveis de histamina e de serotonina no perfusado do tecido injetado. A prometazina (antagonista de receptores H1) e a metisergida (antagonista de receptores 5-HT) inibiram o edema, mas não a nocicepção causada por MSU. Estes resultados não são inesperados visto que a serotonina e a histamina são muito mais eficazes para induzir edema do que nocicepção em ratos (Hong e Abbot, 1994; Crunkhorn e Meacock 1971). De tal modo, as doses subcutâneas mínimas de histamina e serotonina para causar nocicepção em ratos são 10 e 1 µg/paw, respectivamente (Hong e Abbot, 1994). Conseqüentemente, a quantidade de histamina e de serotonina liberadas no perfusado das patas injetadas com MSU não eram suficientes para causar nocicepção (equivalente a 0,001 µg/pata e a 0,06 µg/pata para a histamina e o serotonina, respectivamente). Além disso, nossos dados confirmam os estudos precedentes que demonstraram um papel da histamina e serotonina em edema induzido por MSU (Webster et al., 1972). Em resumo, o aumento em ambos os mediadores aqui demonstrados pode ser responsável para o desenvolvimento do edema de pata, mas não do comportamento nociceptivo.

Além da histamina e serotonina, mastócitos podem igualmente liberar triptase, uma enzima da classe das serina proteases que é o mais abundante mediador armazenado nos grânulos do mastócito de ratos (Molino et al., 1997). Nós observamos que a inibição não seletiva e seletiva de triptase reduziu a nocicepção e o edema causados por MSU. Esta enzima é responsável pela ativação de receptor

ativado por protease tipo 2 (PAR-2) (Molino et al., 1997), o qual está presente em neurônios sensoriais primários (Steinhoff et al., 1999) e esta envolvido nas respostas inflamatórias e nociceptivas (Kawabata et al., 2001). Conseqüentemente, nossos resultados indicam um possível papel para o receptor PAR-2 na nocicepção e no edema induzidos por MSU. De forma, interessante foi demonstrado a transportativação do receptor TRPV1 pelo receptor PAR-2 (Kawao et al., 2002; Dai et al., 2004; Amadesi et al., 2008).

Em resumo, o receptor TRPV1 parece estar envolvido na dor e no edema causados por cristais de MSU, provavelmente através da ativação das fibras peptidérgicas tipo C e de mastócitos (Figura 8). Assim, o receptor TRPV1 pode ser um alvo potencial para o desenvolvimento de novas terapias para o tratamento da dor que ocorre durante os ataques agudos de gota.



**Figura 8.** Proposta para o mecanismo de indução de edema e nocicepção induzidos por MSU. (1) Os cristais de MSU desgranulam mastócitos que por sua vez libera histamina (2) e serotonina (5-HT) (3) que agem sobre seus receptores em vasos sanguíneos causando aumento da permeabilidade capilar, extravasamento plasmático e conseqüente edema. Além disto, mastócitos liberam triptase (4) que estimula receptores PAR-2 em nociceptores. Os receptores PAR-2 estimulam o receptor TRPV1 (5) que induz influxo de sódio e cálcio em nociceptores induzindo sua despolarização e conseqüente produção de nocicepção. O aumento de cálcio pelo receptor TRPV1 também estimula a liberação de substância P (SP) (6) que pode agir sobre receptores NK1 (7) em vasos, aumentando a permeabilidade vascular ou sobre nociceptores, amplificando a nocicepção.



---

## **6. CONCLUSÕES**

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

- 6.1- O efeito nociceptivo e edematogênico causado pela injeção s.c. de MSU na pata de ratos é mediado por ativação do receptor TRPV1.
- 6.2- A liberação de mediadores por fibras aferentes primárias (substância P) ou por mastócitos (histamina, serotonina e triptase) participam do efeito nociceptivo e edematogênico causado pelo MSU.
- 6.3- O efeito nociceptivo e edematogênico causado pela injeção de MSU na pata de ratos parece independender da infiltração de leucócitos.

---

## **7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ABBOTT, F. V.; FRANKLIN, K. B.; WESTBROOK, R. F. **The formalin test: scoring properties of the first and second phases of the pain response in rats.** Pain 60, 91-102, 1995.

AMADESI, S. et al. **Protease-activated receptor 2 sensitizes the capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid receptor 1 to induce hyperalgesia.** J Neurosci 24:4300-4312, 2004.

ANDRADE, E. L. et al. **Pronociceptive response elicited by TRPA1 receptor activation in mice.** Neuroscience 152:511-520, 2008.

BANDELL, M.; MACPHERSON, L. J.; PATAPOUTIAN, A. **From chills to chilis: mechanisms for thermosensation and chemesthesis via thermo TRPs.** Curr Opin Neurobiol 17:490-497, 2007.

BANNASCH, D. et al. **Mutations in the SLC2A9 gene cause hyperuricosuria and hyperuricemia in the dog.** PLoS Genet 4:e1000246 1-8, 2008.

BIRKLEIN, F.; SCHMELZ, M. **Neuropeptides, neurogenic inflammation and complex regional pain syndrome (CRPS).** Neurosci Lett 437:199-202, 2008.

CALIXTO, J. B. et al. **Contribution of natural products to the discovery of the transient receptor (TRP) channels family and their functions.** Pharmacol Ther 106:179-208, 2005.

CAMPION, E. W.; GLYNN, R. J.; DELABRY, L. O. **Asymptomatic hyperuricemia. Risks and consequences in the Normative Aging Study.** Am J Med 82:421-426, 1987.

CHAPLAN, S. R. et al. **Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw.** J Neurosci Methods 53:55-63, 1994.

CHOI, H. K.;. **Pathogenesis of Gout.** Ann Intern Med 143:499-516, 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 29:461-466, 1988.

CRUNKHORN, P.; MEACOCK, S. C. **Mediators of the inflammation induced in the rat paw by carrageenin.** Br J Pharmacol 42:392-402, 1971.

DAI, Y. et al. **Proteinase-activated receptor 2-mediated potentiation of transient receptor potential vanilloid subfamily 1 activity reveals a mechanism for proteinase-induced inflammatory pain.** J Neurosci 24:4293-4299, 2004.

DALBETH, N.; HASKARD, D. O. **Mechanisms of inflammation in gout.** Rheumatology 44:1090-1096, 2005.

EGGEBEEN, A. T. **Gout: an update.** Am Fam Physician 76:801-808, 2007.

ENOMOTO A. et al. **Molecular identification of a renal urate anion exchanger that regulates blood urate levels.** Nature 417:447-452, 2002.

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

FALASCA, G. F. **Metabolic diseases: gout.** Clin Dermatol 24:498-508, 2006.

FERREIRA, J.; da SILVA, G. L.; CALIXTO, J. B. **Contribution of vanilloid receptors to the overt nociception induced by B2 kinin receptor activation in mice.** Br J Pharmacol 141:787-794, 2004.

GENTLE, M. J. **Sodium urate arthritis: effects on the sensory properties of articular afferents in the chicken.** Pain 70:245-251, 1997.

GETTING, S. J. et al. **Molecular Determinants of monosodium urate crystals-induced murine peritonitis: A role for endogenous mast cells and a distinct requirement for endothelial-derived selectins.** J Pharmacol Exp Ther 283:123-130, 1997.

HOLZER, P. **Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons.** Pharmacol Rev 43:143-201, 1991.

HONG, Y.; ABBOTT, F. V. **Behavioural effects of intraplantar injection of inflammatory mediators in the rat.** Neuroscience 63:827-836, 1994.

HOROWITZ, M. D. et al. **Intraarticular noninflammatory free urate suspension (urate milk) in 3 patients with painful joints.** J Rheumatol 17:712-714, 1990.

JANCSÓ, N.; JANCSÓ-GÁBOR, A.; SZOLCSÁNYI, J. **Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by pretreatment with capsaicin.** Br J Pharmacol Chemother 31:138-151, 1967.

KAWAO, N. et al. **Capsazepine inhibits thermal hyperalgesia but not nociception triggered by protease-activated receptor-2 in rats.** Jpn J Pharmacol 89:184-187, 2002.

KAWABATA, A. et al. **Peripheral PAR-2 triggers thermal hyperalgesia and nociceptive responses in rats.** Neuroreport 12:715-719, 2001.

KEITH, M. P.; GILLILAND, W. R. **Updates in the management of gout.** Am J Med 120:221-224, 2007.

KOBAYASHI K. et al. **Distinct expression of TRPM8, TRPA1 and TRPV1 mRNAs in rat primary afferent neurons with adelta/c-fibers and colocalization with trk receptors.** J Comp Neurol 493:596-606, 2005.

KUTZING, M. K.; FIRESTEIN, B. L. **Altered uric acid levels and disease states.** J Pharmacol Exp Ther 324:1-7, 2008.

LAM, F. Y.; FERREL, W. R. **Neurogenic component of different models of acute inflammation in the rat knee joint.** Ann Rheum Dis 50:747-751, 1991.

LAWRENCE, R. et al. **Estimates of the prevalence of arthritis and selected musculoskeletal disorders in the United States.** Arthritis Rheum 41:778-799, 1998.

LUNAM, C. A.; GENTLE, M. J. **Substance P immunoreactive nerve fibres in the domestic chick ankle joint before and after acute urate arthritis.** Neurosci Lett 354:87-90, 2004.

MARTINON, F.; GLIMCHER, L. H. **Gout: new insights into an old disease.** J Clin Invest 116:2073-2075, 2006.

MARTINON, F. et al. **Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome.** Nature 440:237-241, 2006.

MASON, L. et al. **Systematic review of topical capsaicin for the treatment of chronic pain.** BMJ 328:991, 2004.

METCALFE, D. D.; BARAM, D.; MEKORI, Y. **A. Mast cells.** Physiol Rev 77:1033-1079, 1997.

MILANO, J. et al. **Antinociceptive action of 4-methyl-5-trifluoromethyl-5-hydroxy-4, 5-dihydro-1H-pyrazole methyl ester in models of inflammatory pain in mice.** Life Sci 83:739-746, 2008.

MILLAN, M.J. 1999. **The induction of pain: an integrative review.** Prog Neurobiol 57: 1-164.

MOLINO, S. et al. **Interactions of mast cell tryptase with thrombin receptors and PAR-2.** J Biol Chem 272:4043-4049, 1997.

NIGROVIC, P. A.; LEE, D. M. **Mast cells in inflammatory arthritis.** Arthritis Res Ther 7:1-11, 2005.

NISSALO, S. et al. **Neuropeptides in experimental and degenerative arthritis.** Ann.N.Y.Acad.Sci 966:384-399, 2002.

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

OTSUKI, T. et al. **Evaluation of the analgesic effects of capsaicin using a new rat model for tonic pain.** Brain Res 365:235-240, 1986.

PARADA, C. A. et al. **The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalin-induced nociception.** Neuroscience 102:937-944, 2001.

PÉTRILLI, V.; MARTINON, F. **The inflammasome, autoinflammatory diseases, and gout.** Joint Bone Spine 74:571-576, 2007.

RASSOL, M.; VARALAKSHMI, P. **Suppressive effect of Withania somnifera root powder on experimental gouty arthritis: An in vivo and in vitro study.** Chem Biol Interact 164:174-80, 2006.

SANTOS, A. R.; CALIXTO, J. B. **Further evidence for the involvement of tachykinin receptor subtypes in formalin and capsaicin models of pain in mice.** Neuropeptides 31:381-389, 1997.

SAKURADA, T. et al. **The capsaicin test in mice for evaluating tachykinin antagonists in the spinal cord.** Neuropharmacology 31:1279-1285, 1992.

SCHILTZ, C. et al. **Monosodium urate monohydrate crystal-induced inflammation in vivo: quantitative histomorphometric analysis of cellular events.** Arthritis Rheum 46:1643-1650, 2002.

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

SHARMA, J. N.; SAMUD, A. M.; ASMAWI, M. Z. **Comparison between plethysmometer and micrometer methods to measure acute paw oedema for screening anti-inflammatory activity in mice.** Inflammopharmacology 12:89-94, 2004.

SHORE, P. A.; BURKHALTER, A.; COHN, V. H. Jr. **A method for the fluorometric assay of histamine in tissues.** J. Pharmacol Exp Ther 127:182-186, 1959.

STEINHOFF, M. et al. **Proteinase-activated receptor-2 in human skin: tissue distribution and activation of keratinocytes by mast cell tryptase.** Exp Dermatol 8:282-294, 1999.

STRYER L. Biosíntese de nucleotídeos. In: Stryer L. **Bioquímica.** 4 Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 705-725, 1996.

SUFKA, K. J.; SCHOMBURG, F. M.; GIORDANO, J. **Receptor mediation of 5-HT-induced inflammation and nociception in rats.** Pharmacol Biochem Behav 41:53-56, 1992.

TERKELTAUB, R. A. Clinical practice. **Gout.** N Engl J Med 349:1647-1655, 2003.



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

**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 1:185-198, 1972.**

**WILSON, C. Observations on Gout and Rheumatism, Including an Account of a Speedy, Safe, and Effectual Remedy for Those Diseases: With Numerous Cases and Communications. 3 Ed. London: Thomas and George Underwood, 500 p., 1823.**

**WOOLLEY, D. E.; TETLOW, L. C. Mast cell activation and its relation to proinflammatory cytokine production in the rheumatoid lesion. Arthritis Res 2:65-74, 2000.**

---

## 8. APÉNDICE

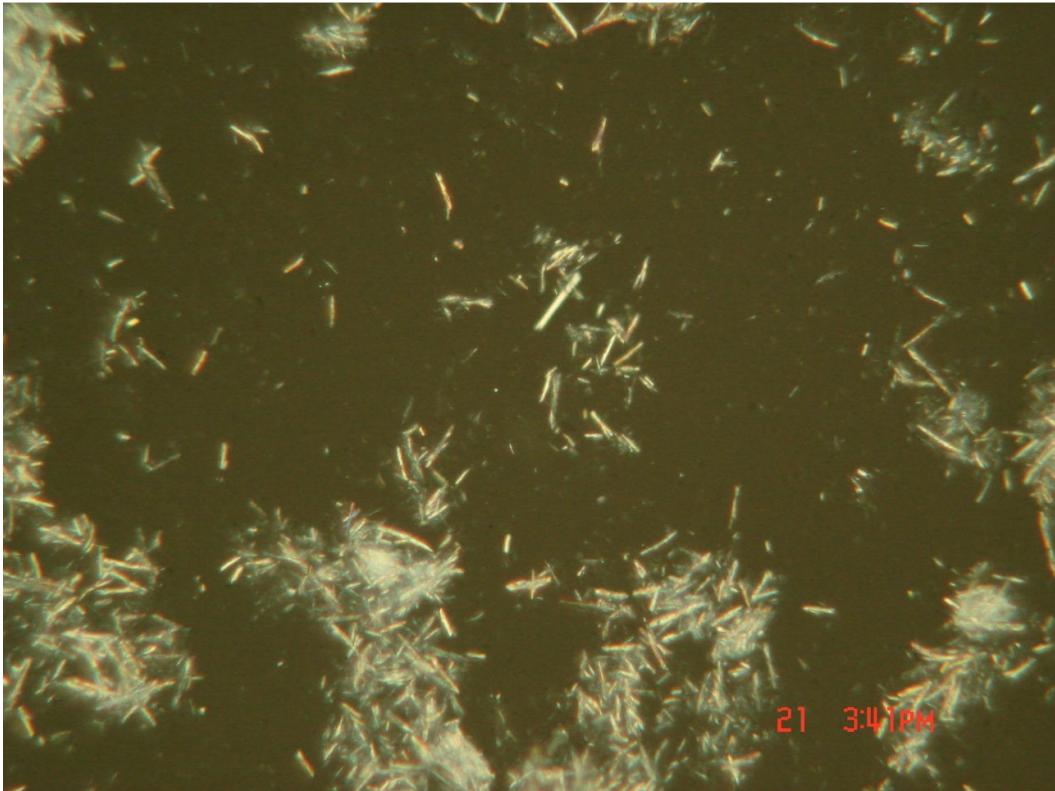
## **APÊNDICE A – Materiais, Métodos e Resultados Complementares**

### **8.1. Microscopia de luz polarizada:**

#### **8.1.1. Materiais e métodos**

Uma lâmina para microscopia foi produzida vertendo uma suspensão de MSU (0,25 mg/ml) sobre uma lamina de vidro deixada para secagem. Após o conteúdo estar bem seco e fixo na lâmina, esta foi observada em Microscópio de Luz Polarizada (LEICA DM-RX). Fotos dos cristais foram obtidas e o tamanho dos cristais foi medido usando o programa PStyler. Estes ensaios foram realizados no Laboratório iVic (Grupo de Imageamento e Visão Computacional) da UFSM, sob coordenação do Prof. Dr. José Antônio Trindade Borges da Costa e com auxílio da estudante Mariana Saibit.

### 8.1.2. Resultados



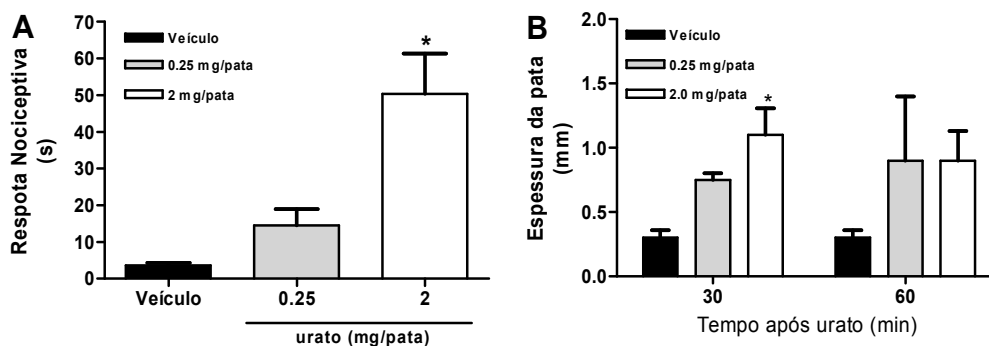
**Figura complementar I.** Aparência dos cristais de MSU usados no presente estudo, variação do tamanho 4 - 25  $\mu\text{m}$ . Fotomicrografia realizada microscopia de luz polarizada com magnitude 500X.

## 8.2. Nociceção e edema induzidos pela administração s.c. de uratos na pata de ratos

### 8.2.1. Materiais e métodos

Estes experimentos foram realizados de maneira semelhante aos descrito no manuscrito 1. A solução de urato foi produzida pela diluição de ácido úrico em PBS, o que não alterou o pH do tampão.

### 8.2.2. Resultados



**Figura complementar II.** Efeito nociceptivo (A) e edematogênico (B) causado pela administração s.c. de urato (A e B). Cada barra representa a média  $\pm$  erro padrão da média (n=5). Os dados foram analisados usando ANOVA de uma via seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls \*  $P < 0.05$ , quando comparado ao veículo (PBS).

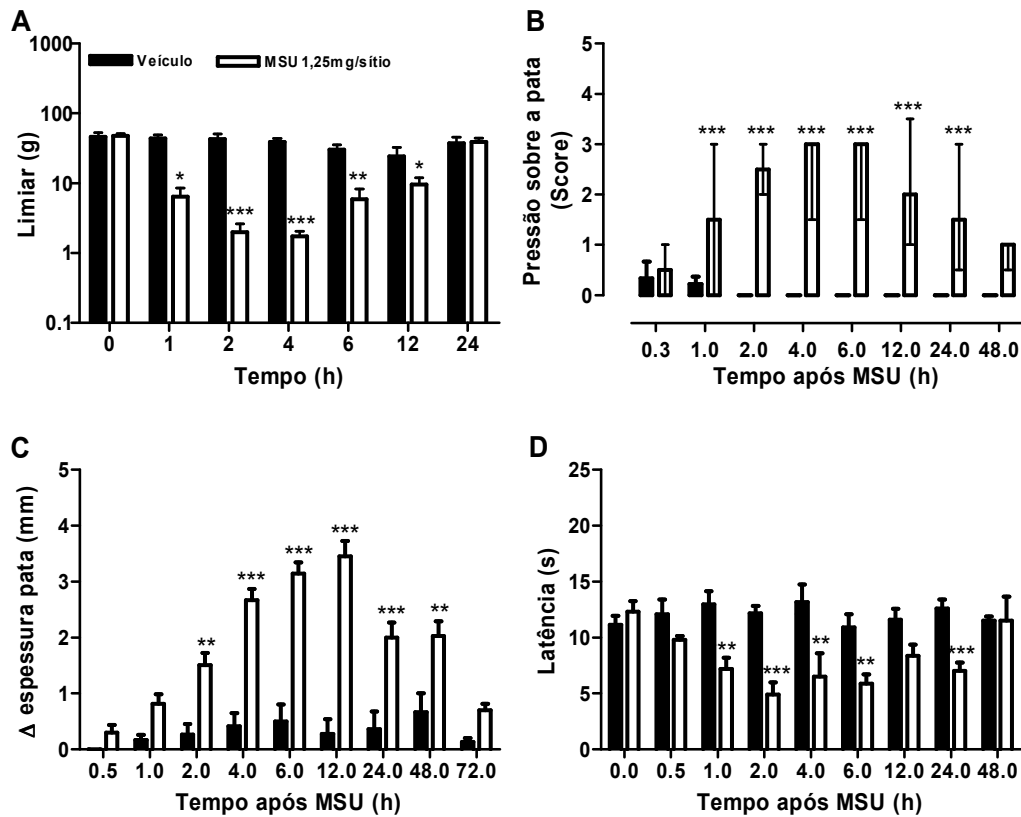
### 8.3. Nociceção e edema induzido pela administração intra-articular de MSU

#### 8.3.1. Materiais e métodos

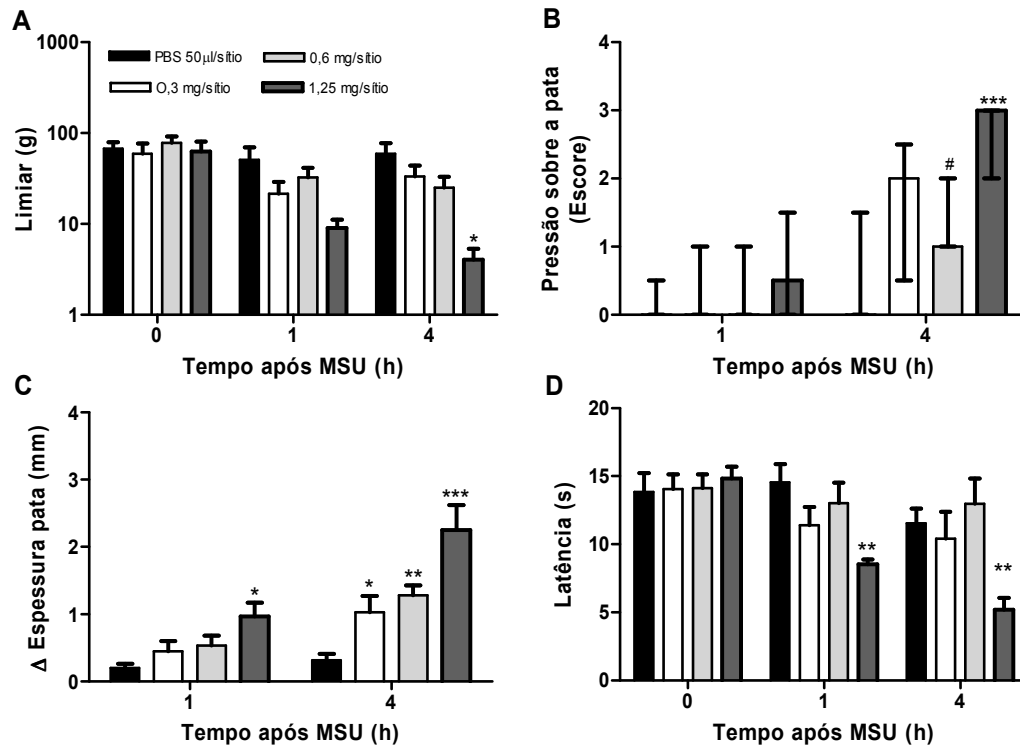
Para comparar o processo nociceptivo causado pelo MSU em articulações com o tecido plantar, cristais de MSU (volume de 50  $\mu$ l) foram injetados na articulação do tornozelo (0,3-1,25 mg/sítio), de acordo com Coderre e Wall (1988). Para verificação da nociceção espontânea, os ratos receberam MSU na articulação e o comportamento relacionado a dor foram verificados em diferentes tempos após injeção utilizando o escore: 0) peso do corpo distribuído normalmente sobre as patas, 1) peso do corpo ligeiramente depositado sobre a ponta da pata injetada, 2) peso do corpo levemente depositado sobre a pata injetada posta de lado e 3) pata totalmente recolhida (segundo Abbott et al., 1995; Coderre e Wall, 1988). Para verificar a alodínia mecânica e a hiperalgesia térmica, os animais foram tratados com MSU e o limiar para detecção do estímulo mecânico foi avaliado pelo método acima-abaixo (segundo Chaplan et al., 1994) e o limiar para detecção do estímulo térmico

pelo teste plantar (segundo Hargreaves et al., 1988). O aumento da espessura da articulação do tornozelo foi medido como índice de edema, com o auxílio de um paquímetro digital, de acordo com Sharma et al., 2004.

8.3.2. Resultados



**Figura complementar III.** Decurso temporal da nocicepção espontânea (B), alodínia mecânica (A), hiperalgesia térmica (D) e edema (C) causado pela administração intra-articular de cristais de MSU (1,25 mg/sítio) em ratos. Cada barra representa a média ± erro padrão da média (A, C ou B) ou mediana ± intervalos interquartis 95% (B) (n= 6-10). Os dados foram analisados usando ANOVA de duas vias seguida por teste de Bonferroni (A,C-D) ou teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn (B). \*P<0,05, \*\* P<0,01, \*\*\* P<0,001 quando comparado ao veículo (PBS).



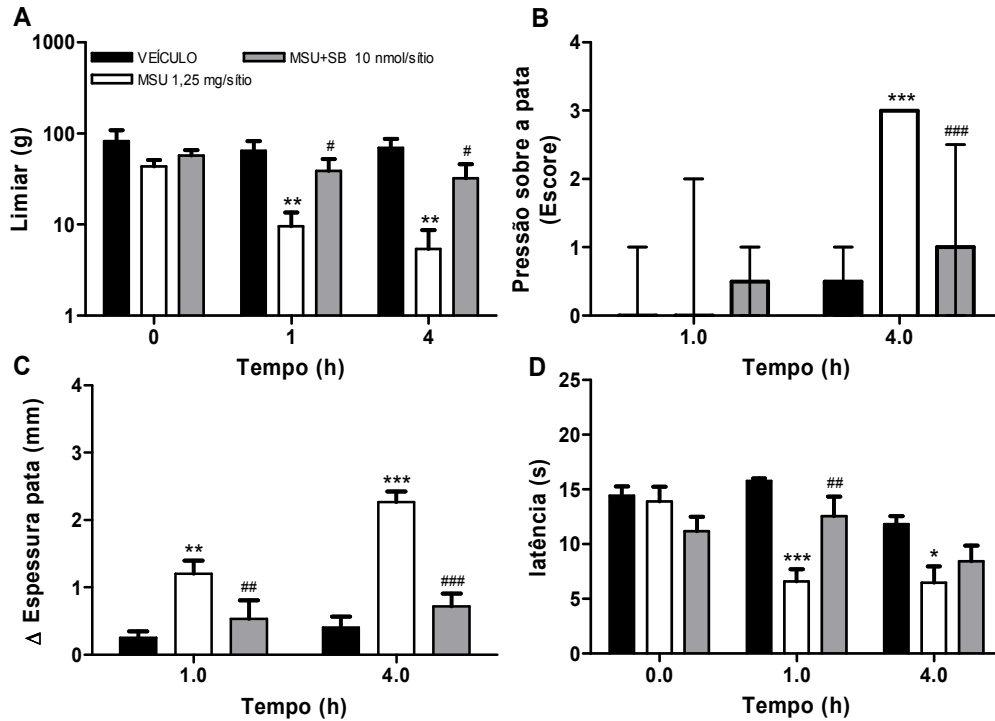
**Figura complementar IV.** Curvas dose-resposta para a nociceção espontânea (B), alodínia mecânica (A), hiperalgesia térmica (D) e edema (C) observado 4 horas após a administração intra-articular de cristais de MSU (1,25 mg/sítio) em ratos. Cada barra representa a média ± erro padrão da média (A, C ou B) ou mediana ± intervalos interquartis 95% (B) (n= 6). Os dados foram analisados usando ANOVA de duas vias seguida por teste de Bonferroni (A,C-D) ou teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn (B). \*P<0,05, \*\* P<0,01, \*\*\* P<0,001 quando comparado ao veículo (PBS).

## 8.4. Efeito do antagonista TRPV1 na nociceção e edema induzidos pela injeção intra-articular de MSU em ratos

### 8.4.1. Materiais e métodos

Para elucidar se os alvos envolvidos no processo nociceptivo e edematogênico causado pelo MSU em tecido plantar possuiria um mecanismo diferente sobre o modelo articular, MSU foi co-injetado na articulação do tornozelo com SB 366791 (antagonista do receptor TRPV1). A dose do antagonista foi definida por experimento piloto.

8.4.1. Resultados



**Figura complementar IV.** Efeito anti-nociceptivo e anti-edematogênico do tratamento com antagonista seletivo TRPV1 SB 366791 (10 nmol/sítio) na nocicepção espontânea (B), alodínia mecânica (A), hiperalgisia térmica (D) ou edema (C) induzido pela injeção intra-articular de MSU. Cada barra representa a média ± erro padrão da média (A, C ou B) ou mediana ± intervalos interquartis 95% (B) (n= 6). Os dados foram analisados usando ANOVA de duas vias seguida por teste de Bonferroni (A,C-D) ou teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn (B). \*P<0,05, \*\* P<0,01, \*\*\* P<0,001 quando comparado ao veículo (PBS); #P<0,05; ##P<0,01 ou ###P<0,001 comparado grupo MSU.