

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Antagonismo dos receptores AT2 para angiotensina II como um tratamento do ataque agudo de gota, incluindo aqueles precipitados pelo uso de fármacos anti-hipertensivos

Thiago Neves Vieira

Trabalho de Conclusão do Curso apresentado à Coordenação do curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do Grau de Licenciado em Ciências Biológicas.

Uberlândia - MG

Julho - 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Antagonismo dos receptores AT2 para angiotensina II como um tratamento do ataque agudo de gota, incluindo aqueles precipitados pelo uso de fármacos anti-hipertensivos

Thiago Neves Vieira

Profª. Dra. Cássia Regina da Silva

Trabalho de Conclusão do Curso apresentado à Coordenação do curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do Grau de Licenciado em Ciências Biológicas.

Uberlândia - MG

Julho - 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Antagonismo dos receptores AT2 para angiotensina II como um tratamento do ataque agudo de gota, incluindo aqueles precipitados pelo uso de fármacos anti-hipertensivos

Thiago Neves Vieira

Profª. Dra. Cássia Regina da Silva
Instituto de Biotecnologia

Homologado pela Coordenação do Curso de
Ciências Biológicas em __/__/__

Profª. Dra. Celine de Melo

Uberlândia - MG

Julho – 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Antagonismo dos receptores AT2 para angiotensina II como um tratamento do ataque agudo de gota, incluindo aqueles precipitados pelo uso de fármacos anti-hipertensivos

Thiago Neves Vieira

Aprovado pela Banca examinadora em: 03/07/2018

Nota: 95

Profª. Dra. Cássia Regina da Silva
Presidente da banca examinadora

Uberlândia, 03 de julho de 2018

Se tiver o hábito de fazer as coisas com alegria,
Raramente encontrará situações difíceis.

Robert Baden-Powell

Meu muito obrigado a todos que me ajudaram nessa
caminhada, seja com seu abraço, estímulo ou tutoria.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha família Rivail Francisco e Joana D'arc, não apenas pelo suporte financeiro, mas pelo zelo, amor e carinho e incentivo a alcançar meus sonhos. Ao meu irmão Felipe Neves, pelos momentos de descontração.

Em especial a minha tia Adriana Freitas por conselhos, e estímulo a seguir em frente e contribuir para minha formação com sua experiência. Aos meus avós e tios que tem seus lugares em meu coração.

A todos os meus amigos da faculdade, Caique, Rebeca, Luiz, Mariana, Camila, Amanda e Paulo dentre outros que me acompanharam durante esse período de graduação, aqueles que tem um lugar especial e vou levar para a vida seja lembrando dos trabalhos realizados ou das risadas juntos em momentos de descontração.

Aos meus amigos de data, Rafael, Flávio, Rommel, Victor, Talyta e Jean que me acompanham desde minha infância e que foram primordiais para os momentos de paz, eu os considero como irmãos e tenho muito afeto por todos.

Aos meus parceiros de laboratório que tive o prazer de trabalhar junto, Pedro, Karen, Matheus, Letícia, Allisson e Rogério. Bem como parceiros do LaBiTox e professoras do laboratório que me aceitaram e deram o suporte necessário.

A minha companheira Bruna que sempre se mostrou presente em todos momentos durante esta etapa na minha vida, ela é tão responsável quanto eu por este momento, sem ela ao meu lado tudo teria sido mais difícil. Obrigado por seu apoio incondicional.

Dedico a todos colaboradores, funcionários e professores, da Universidade Federal de Uberlândia, que me deram suporte para que tudo fosse possível. Ao CNPQ e FAPEMIG pelo apoio financeiro em minhas iniciações científicas que foram primordiais para tais resultados, sobretudo a minha orientadora Professora Doutora Cássia Regina, que teve papel crucial nesse trabalho desenvolvido, meu muito obrigado por toda paciência, carinho em ensinar e pela oportunidade de me desenvolver profissionalmente.

“Se você não se sente a altura, suba até ela” – Masashi Kishimoto

RESUMO

A artrite gotosa é uma doença metabólica caracterizada pela deposição de cristais de ácido úrico nas articulações. Há grande presença de comorbidades no ataque agudo de gota, como a hipertensão, onde 74% dos indivíduos com gota tem hipertensão. O uso de alguns fármacos empregados para o tratamento da hipertensão, como os inibidores da enzima conversora de angiotensina (iECA) e bloqueadores dos receptores AT1 (BRAT1), aumentam o risco de se desenvolver ataque agudo de gota. Estes fármacos atuam pela modulação do sistema renina-angiotensina. Os receptores AT2 podem ser expressos por neurônios sensoriais ou por células não neuronais. Estudos sugerem que o bloqueio dos receptores AT2 seria uma boa estratégia terapêutica para o tratamento de alguns tipos de dor neuropática, mas, pouco se sabe sobre seus efeitos em modelos de dor aguda. Assim, o presente trabalho avaliou o efeito antinociceptivo do bloqueio dos receptores AT2 em um modelo de ataque agudo de gota induzido pela injeção intra-articular (IA) de cristais de urato monossódico (MSU), ou precipitado pelo uso de fármacos anti-hipertensivos. Um grupo de animais recebeu a injeção IA de MSU (30 ug/articulação) mais o antagonista AT2, PD123319, na dose de 30 nmol/articulação; outro grupo foi pré-tratado com iECA (3 mg/kg, vo) ou BRAT1 (20 mg/kg, vo), meia hora antes de receber a injeção IA de MSU baixa dose (1 ug/articulação) mais o PD123319. Um terceiro grupo recebeu a injeção IA de angiotensina II (0,05 ug/articulação) mais PD123319. O tratamento com PD123319, teve efeito antinociceptivo na dor causada pelo ataque agudo e pela injeção IA de angiotensina II, assim como no modelo de gota precipitada pelo uso de fármacos anti-hipertensivos. Desta forma, os resultados encontrados sugerem que o antagonismo dos receptores AT2 é uma boa estratégia terapêutica para o tratamento do ataque agudo de gota, incluindo aqueles precipitados pelo uso de anti-hipertensivos.

Palavras-chave: artrite, cristais de urato monossódico, dor, inflamação, hipertensão.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	8
1.1	Dor	10
1.2	Artrite Gotosa	12
1.3	Sistema Renina-Angiotensina	13
2.	OBJETIVOS	16
2.1	Objetivo Geral	16
2.2	Objetivo Específico	16
3.	MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1	Animais	17
3.2	Injeção de cristais de MSU e demais tratamentos	17
3.3	Parâmetros nociceptivos	18
3.4	Parâmetros inflamatórios	19
3.5	Análise estatística	19
4.	RESULTADOS	20
4.1	Desenvolvimento de dor e edema de articulação após a injeção intra-articular de diferentes concentrações de MSU	20
4.2	Efeito antinociceptivo do antagonista dos receptores AT2 sobre o ataque agudo de gota	21
4.3	Resposta nociceptiva induzida pela injeção intra-articular do agonista não seletivo do receptor AT2 em animais naïve, e o papel protetor do antagonista dos receptores AT2	22
4.4	Efeito antinociceptivo do antagonista dos receptores AT2 sobre o ataque agudo de gota precipitado pelo uso de iECA e BRAT1	24
5.	DISCUSSÃO	27
6.	CONCLUSÃO	31
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Visão simplificada do sistema de cascata Renina-Angiotensina.....	14
Figura 2. Estímulo de receptores AT1 e AT2.....	15
Figura 3. Avaliação nociceptiva e edematogênica de uma injeção intra-articular de uma alta dose de MSU.....	16
Figura 4. Avaliação do papel do antagonismo dos receptores AT2 sobre a resposta nociceptiva induzida pela injeção intra-articular da alta dose de MSU.....	17
Figura 5. Avaliação do efeito nociceptivo e edematogênico com a injeção intra-articular do agonista do receptor AT2 em animais naive.....	18
Figura 6. Avaliação da prevenção da nocicepção causada pela injeção de um agonista dos receptores AT2 através do uso de um Antagonista AT2.....	19
Figura 7. Avaliação de uma injeção intra-articular de uma baixa dose de MSU.....	20
Figura 8. Avaliação da resposta nociceptiva e edematogênica em ataque agudo de gota precipitado pelo uso de iECA.....	21
Figura 9. Avaliação da resposta nociceptiva e edematogênica em ataque agudo de gota precipitado pelo uso de BRAT1.....	22

1. INTRODUÇÃO

A artrite gotosa é uma doença metabólica persistente que atinge articulações como a metatarso-falangeana e tibio-tarsal, ela é atualmente uma das doenças crônicas que mais frequentemente afetam a população, principalmente homens acima do peso e/ou com mais de 40 anos (RICHETTE e BRADIN, 2010; NEOGI, 2011; JOSHI, 2012). É caracterizada pela deposição de cristais de urato monossódico (MSU), que resulta no desenvolvimento de dor e inflamação articular. Pode ser dividida em quatro fases: hiperuricemia assintomática, crises agudas, período intercrítico e antropatia crônica (CAMPION, 1987). O ataque agudo é reconhecido como uma das experiências mais dolorosas conhecidas, no mesmo nível das dores do parto e de cólicas viscerais (REES et al., 2014). Os tratamentos muitas vezes são contraindicados pela presença de comorbidades nos indivíduos gotosos, e a prevenção se resume a um controle de dieta, assim, a gota ainda é uma doença de difícil tratamento, visto que os mecanismos de ação não estão completamente elucidados.

Ao que se refere as comorbidades, a maioria dos indivíduos com gota sofrem ainda de hipertensão, chegando a aproximadamente 74% dos indivíduos (CHOI et al., 2012; ZHU et al., 2012). O tratamento de hipertensão consiste em maioria no uso de fármacos inibidores da enzima conversora de angiotensina (iECA) e dos bloqueadores dos receptores AT1 para angiotensina II (BRAT1) que podem agir via modulação do sistema renina-angiotensina (CHOI et al., 2012). Contudo, o uso de tais fármacos aumenta o risco de se desenvolver um ataque agudo de gota, esse efeito está em parte, relacionado a regulação do sistema das cininas (SILVA et al., 2014). Ainda assim, pouco se sabe sobre o possível papel do sistema das angiotensinas (XU et al., 2013).

O sistema renina-angiotensina é importante para a produção da angiotensina I que pode ser convertida pela ECA para angiotensina II, capaz de ativar os receptores AT1 e AT2 (CRACKOWER et al., 2002). A angiotensina II pode ainda ser convertida em angiotensina 1-9, que por sua vez também atua nos receptores AT2. Os receptores AT2 são receptores acoplados a proteína G, são expressos por nociceptores, todavia podem ser encontrados em células não neuronais presentes no ambiente articular como fibroblastos e na membrana sinovial humana.

1.1 Dor

A dor é definida pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) como “uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a uma lesão tecidual real ou potencial, ou descrita em termos que sugerem tal lesão” (LOESER; TREEDE, 2008). A dor é também um importante mecanismo de sobrevivência, que pode ser iniciada em qualquer parte do corpo através de um amplo sistema sensorial. O papel protetor da dor é mais evidente em indivíduos com insensibilidade congênita à dor, uma condição genética rara que resulta na incapacidade de detectar danos nos tecidos ou estímulos nociceptivos (COX et al., 2006). Essa resposta normalmente protetora, que está ausente nesses indivíduos, leva a lesões frequentes e resulta, muitas vezes, em taxas de mortalidade mais altas no início da vida (BENNETT e WOODS, 2014).

A dor pode ser classificada em dois tipos, aguda e crônica, sendo que a dor aguda tem um importante papel na proteção tecidual e pode desaparecer antes mesmo do restabelecimento do tecido lesado. Já a dor crônica é prejudicial ao corpo, acarretando sofrimento e incapacidade, com duração mínima de três meses, porém, podendo acompanhar o indivíduo pelo resto da sua vida (WOOLF, 2010; MILLAN, 2002).

Os estudos sobre a dor em humanos são difíceis de realizar, são subjetivos e limitados por considerações éticas, levando ao uso generalizado de animais como modelos para estudar a dor, sendo as espécies mais comumente utilizadas ratos e camundongos (MOGIL, 2009). No entanto, com o uso de modelos animais, surgem desafios relacionados com a quantificação de respostas comportamentais que poderiam ser consideradas equivalentes a dor em humanos. É usado então o termo nocicepção, que tem como definição somente o estímulo doloroso, não levando em consideração fatores emocionais, assim, inclui as vias neuroanatômicas, mecanismos neurológicos e receptores que são específicos para detectar estímulos nocivos. Logo, em animais é avaliada a nocicepção (KANDEL et al., 2003).

Os receptores específicos para detecção de estímulos nocivos são chamados de nociceptores, e são identificados como fibras aferentes (SHERRINGTON, 1906). Estes neurônios estão presentes no sistema sensorial periférico, onde recebem estímulos nocivos que são levados ao gânglio da raiz dorsal, e então para a medula espinhal, e daí para estruturas supra-espinhais, responsáveis pela tradução e transmissão do estímulo.

A dor é considerada um problema de saúde frequente que causa prejuízos econômicos e pessoais à população. Dores agudas levam a hiperalgesia mecânica, uma

sensibilidade aumentada à dor que pode ser produzida por estímulos mecânicos. A inflamação articular é um grande causador de sensibilidade a dor, na artrite, os nervos articulares tornam-se sensibilizados, produzindo dor aguda (VON BANCHET et al., 2007).

As desordens inflamatórias como as artrites estão entre as situações crônicas que mais frequentemente afetam a população mundial. Têm um forte impacto na qualidade de vida, no uso de recursos, cuidados médicos e na economia de um país. A gota ou artrite gotosa foi uma das primeiras artrites a ser clinicamente descrita e está entre as artrites de maior prevalência, sendo a artrite inflamatória mais comum entre homens acima dos 40 anos de idade e/ou com sobrepeso (RICHETTE e BRADIN, 2010; NEOGI, 2011; JOSHI, 2012).

1.2 Artrite Gotosa

O ataque agudo de gota, bem como outras artrites, se inicia com sintomas clínicos comuns aos de uma resposta inflamatória (MANDEL, 2008). A articulação fica edemaciada, há grande presença de leucócitos no fluido sinovial e a pele circundante torna-se vermelha ou púrpura, rígida e brilhante, com uma sensação de calor e percepção de dor de forte intensidade (CHOI et al., 2005). É mais comum que as primeiras crises apareçam em articulações como a Metatarso-Falangeana e Tibio tarsal. É caracterizada pela deposição de cristais de urato monossódico (MSU) nessas articulações, esses cristais são a forma sólida do ácido úrico, produto final do metabolismo das purinas, que pode se acumular e cristalizar em tecidos orgânicos (GEORGE, 2009).

A gota pode ser dividida em quatro fases: 1ª hiperuricemia assintomática, onde o indivíduo apresenta altos índices de ácido úrico no sangue, porém não há nenhum tipo de sintoma; após muitos anos apresentando esse quadro de hiperuricemia o indivíduo pode vir a apresentar 2ª fase, onde ocorrem as crises agudas, na qual os pacientes relatam picos de dor principalmente durante o período da noite e nas articulações do metatarso e metacarpo, a 3ª fase é o período intercrítico, que ocorre entre as crises de ataque agudo, totalmente assintomático e de duração variada. No início da enfermidade esse período pode durar anos, mas tende a tornar-se, progressivamente menor com o desenrolar da doença, a 4ª fase é crônica, é o estágio mais avançado, caracteriza-se por

desenvolvimento de tofos, levando o indivíduo a ter perda de função e mutilações nas regiões afetadas (CAMPION et al., 1987).

A hiperuricemia, condição onde as concentrações de ácido úrico estão acima do comum, aumenta os riscos de se desenvolver gota, a sua alta concentração no sangue e estágio crônico estão correlacionadas ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares, doenças renais e hipertensão (FEIG et al., 2008; KUTZING e FIRESTEIN, 2008; TERKELTAUB et al., 2006). O risco de se desenvolver gota aumenta com a permanência da hiperuricemia e com os níveis de ácido úrico, porém, esta condição nem sempre evolui para o desenvolvimento da doença, não se sabe ainda ao certo o porquê.

Os tratamentos para gota em sua maioria são ineficazes e se resumem a um controle de dieta e o uso de uma série de medicamentos que, muitas vezes são contraindicados pela presença de comorbidades e possíveis interações medicamentosas decorrentes deste fato. Por exemplo, a análise dos registros médicos de 575 pacientes diagnosticados com gota nos Estados Unidos, apontaram que mais de 88% apresentavam pelo menos uma condição patológica das que são consideradas comorbidades comuns a gota como doenças cardiovasculares, diabetes tipo 2, hiperlipidemia, síndrome metabólica, doenças crônicas nos rins e nefrolitíase (KEENAN et al., 2011).

Ao que se refere as comorbidades, a maioria dos afetados pela gota sofrem ainda de hipertensão, chegando a aproximadamente 74% dos indivíduos (CHOI et al., 2012; ZHU et al., 2012). O tratamento de hipertensão inclui na grande parte dos casos o uso de fármaco inibidores da enzima conversora de angiotensina (iECA) e os bloqueadores dos receptores AT1 para angiotensina II (BRAT1). Esses fármacos atuam no sistema renina angiotensina bloqueando a ação do receptor para Angiotensina II tipo 1 e a clivagem da Angiotensina I em Angiotensina II. Contudo, o uso de tais fármacos pode levar ao desenvolvimento de ataques agudos de gota, esse efeito está em parte relacionado a regulação do sistema das cininas (XU et al., 2013; SILVA et al., 2015).

1.3 Sistema Renina-Angiotensina

O Sistema Renina Angiotensina tem como precursor o Angiotensinogênio, uma glicoproteína produzida pelo fígado que é clivado por hidrólise pela enzima Renina em Angiotensina I, um decapeptídeo inativo. A Angiotensina I por sua vez é clivada pela ECA em Angiotensina II. Além da Angiotensina II vários outros produtos são formados nesta via, como Angiotensina (1-7), Angiotensina (1-9), Angiotensina III e

Angiotensina IV. Os outros produtos possuem meios distintos de formação, como a Angiotensina (1-7) que é formada pela hidrólise da Angiotensina II pela ECA2, mas também pode ser formada pela hidrólise da Angiotensina I por proil-endopeptidases, neutro-endopeptidases e timet-oligopeptidases. Além da hidrólise da Angiotensina II a ação de carboxi-peptidases e proil-endopeptidases podem contribuir para a formação de Angiotensina (1-7). A formação de Angiotensina III e IV é dependente de aminopeptidases e a clivagem é feita pela ECA (BADER., 2010).

Abaixo a Fig. ilustra as vias descritas acima:

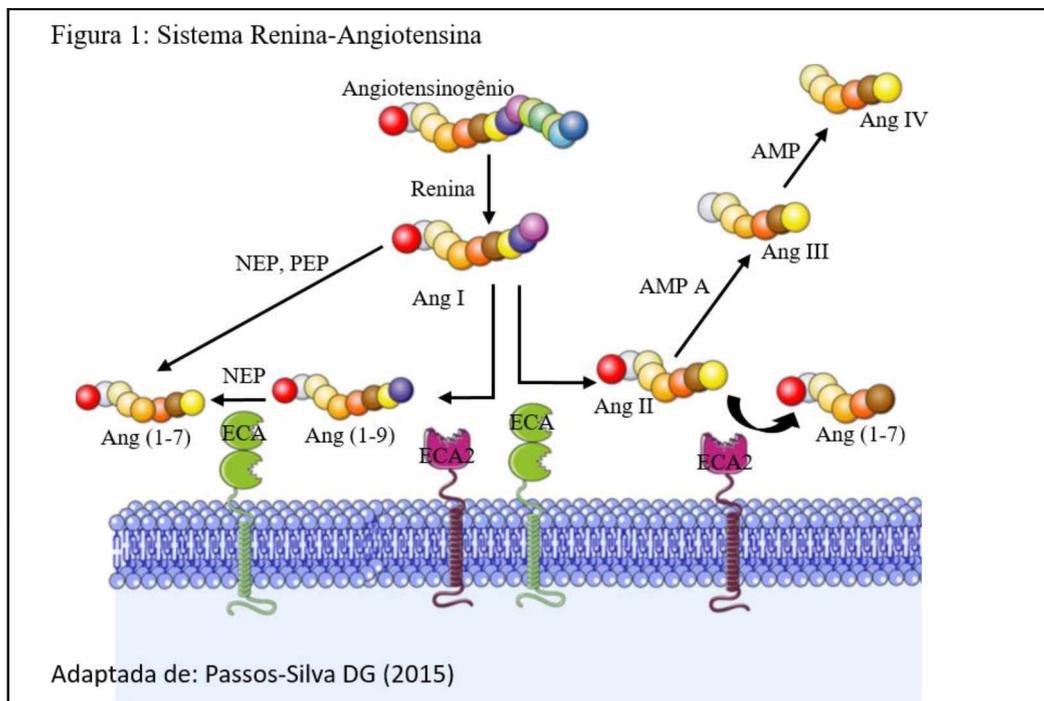


Figura 1. Visão simplificada do sistema de cascata Renina-Angiotensina. Abreviações: Ang I, angiotensina I; Ang II, angiotensina II; Ang III, angiotensina III; Ang IV, angiotensina IV; Ang (1-7), angiotensina (1-7); Ang (1-9), angiotensina (1-9); AMP, Aminopeptidase; ECA, enzima conversora de angiotensina; ECA2, enzima conversora de angiotensina II; NEP, Neutro-endopeptidase; PEP, Propil-endopeptidase.

O sistema Renina-Angiotensina desempenha um papel crucial na homeostase hidroeletrólítica e cardiovascular, atuando através da vasoconstrição (BADER, 2010; KOBORI et al., 2007). Os receptores AT1 quando estimulados pela Angiotensina II leva a vasoconstrição, anti-natriurese, secreção de aldosterona, ativação do sistema nervoso simpático, crescimento e diferenciação celular e inflamação (CAREY, 2013). No entanto, pouco se sabe sobre a contribuição de receptores AT2 para o

desenvolvimento de condições agudas como o ataque agudo de gota e as funções deste receptor ainda são um pouco controversas. Foi demonstrado que o estímulo de receptores AT2 pode tanto estimular o crescimento de neurites e que seu bloqueio pode reduzir a sinalização a dor (DANSER et al., 2014).

Para o tratamento da hipertensão são usados os bloqueadores de receptores AT1 (BRAT1) como a valsartana. Além disso também são usados os inibidores da enzima conversora de angiotensina (iECA) como enalapril, para evitar a clivagem de Angiotensina I em Angiotensina II. Os BRAT1 quando usados levam a um aumento de disponibilidade de angiotensina II, pois ela não irá ativar receptores AT1, tendo assim uma maior disponibilidade para ativar receptores AT2. Os iECA bloqueiam a ECA1 deixando uma maior disponibilidade de Angiotensina I para ser clivada pela ECA2 em Angiotensina 1-9 que também pode ativar receptores AT2

Abaixo um esquema que ilustra possíveis ativadores dos receptores AT1 e AT2

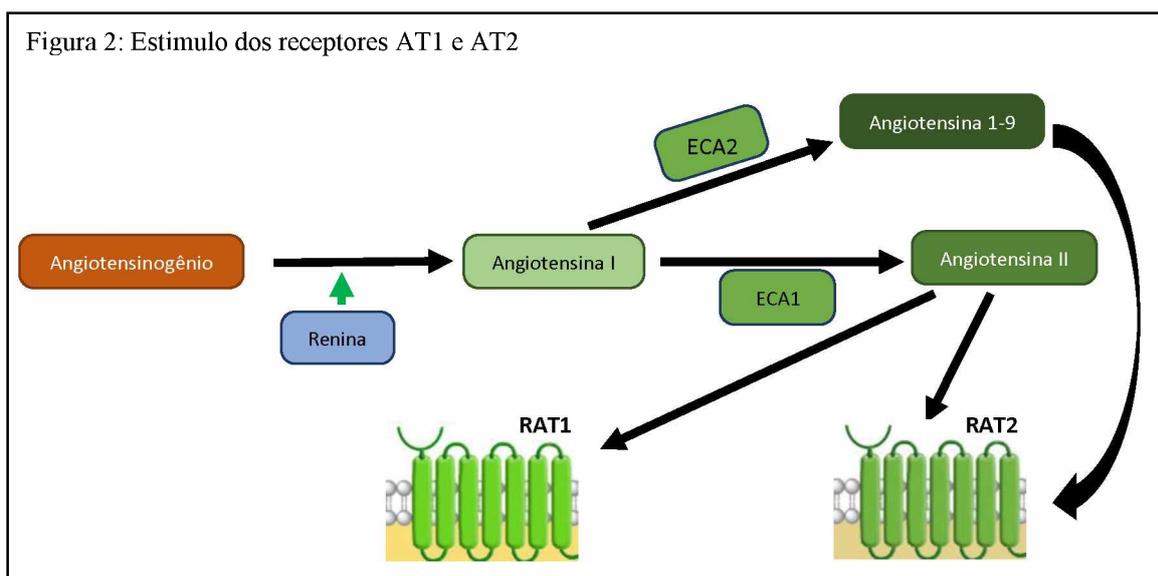


Figura 2. Visão simplificada das vias de estímulo aos receptores AT1 e AT2. Abreviações: RAT1, Receptor para angiotensina tipo 1; RAT2, receptor para angiotensina tipo 2; ECA, enzima conversora de angiotensina; ECA2, enzima conversora de angiotensina tipo 2.

Há dados demonstrando efeito analgésico em modelos animais de dor neuropática (CHAKRABARTY et al., 2017; MURALIDHARAN et al., 2014). Além disso, um ensaio clínico de fase II demonstra que o antagonismo de receptores AT2 reduziu a dor neuropática em indivíduos com neuralgia pós-herpética, apoiando a eficácia e a segurança para o seu uso em humanos (RICE et al., 2014).

Assim, a hipótese do presente trabalho é que a ativação dos receptores AT2 no ambiente articular esteja relacionada com a iniciação do ataque agudo de gota, incluindo aqueles precipitados pelo uso de fármacos anti-hipertensivos. Neste contexto, propõem-se investigar o papel que o antagonismo dos receptores AT2 podem exercer sobre a dor e inflamação do ataque agudo de gota, incluindo aqueles precipitados pelo uso de iECA e BRAT1.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo do presente estudo é avaliar o potencial analgésico do antagonismo dos receptores AT2 sobre o ataque agudo de gota em roedores, incluindo aqueles relacionados ao uso da iECA e BRAT1, visando o desenvolvimento de antagonistas do receptor AT2 como estratégia terapêutica para o tratamento da gota e outras condições inflamatórias dolorosas agudas.

2.2 Objetivos Específicos

- 2.2.1.** Avaliar o desenvolvimento de dor e edema de articulação após a injeção intra-articular de diferentes doses de MSU;
- 2.2.2.** Analisar o papel do antagonismo dos receptores AT2 sobre a resposta nociceptiva e edematogênica induzida pela injeção intra-articular (IA) de uma alta dose de cristais de urato monossódico (MSU);
- 2.2.3.** Verificar a ocorrência de efeito nociceptivo com a injeção intra-articular do agonista não seletivo do receptor AT2 em animais naïve, e a possível prevenção desta nocicepção pelo antagonismo dos receptores AT2;
- 2.2.4.** Avaliar a resposta nociceptiva e edematogênica em ataque agudo de gota precipitado pelo uso de iECA e BRAT1, e verificar o papel do antagonismo dos receptores AT2 sobre estas respostas;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos C57BL/6 machos de seis a oito semanas de idade (20 - 25 g) provenientes do biotério do Centro de Criação de Camundongos – UFU/Umuarama. Todos os animais serão mantidos no biotério setorial sob condições de temperatura (23-25 °C) e ciclo claro/escuro de 12 h, com livre acesso à ração e água. Será fornecido enriquecimento do meio para os animais na forma de papeis, algodão e demais materiais. Os experimentos com animais serão conduzidos de acordo com as normas do comitê de ética para animais de experimentação da UFU-Umuarama e normas recomendadas pela IASP (*International Association for the Study of Pain*) (Zimmermann, 1983). Sobre o protocolo n° 080/16 aprovado pela CEUA (Comissão de Ética na utilização de animais).

3.2 Injeção de cristais de MSU e demais tratamentos

Para investigar o possível envolvimento dos receptores AT2 no ataque agudo de gota, foi utilizado um modelo de gota induzida pela injeção intra-articular (IA) de MSU, para verificar o potencial nociceptivo de cada concentração (0,01 – 100 µg/articulação), foi utilizado o volume final de 10 µl para as injeções intra-articulares. Sempre que se fizer necessária a injeção intra-articular os animais serão anestesiados com isoflurano (O₂ 2%). Logo após as injeções intra-articulares os animais serão avaliados quanto ao desenvolvimento de respostas nociceptivas e inflamatórias características do ataque agudo de gota.

Para verificar o possível efeito analgésico do antagonista dos receptores AT2, os animais foram tratados com o antagonista seletivo AT2, PD123319, por via intra-articular (30 nmol/articulação, segundo Ogata et al., 2016) e via oral (1 mg/kg, segundo Muralidharan et al., 2014), meia hora antes de receber a injeção IA da alta dose de MSU (30 µg/articulação).

Para verificar a ação do estímulo de receptores AT2, foi utilizado a Angiotensina II, como agonista não seletivo, nas doses de (5 – 0,05 µg/articulação) via IA. Os animais foram avaliados quanto ao desenvolvimento de respostas nociceptivas e inflamatória meia hora após a injeção até 24 horas após a injeção. Para verificar o possível efeito do bloqueio de receptores AT2 no ambiente articular foi feita uma coadministração da Angiotensina II (0,05 µg/articulação) via IA e do antagonista seletivo dos receptores

AT2, PD123319 (30 nmol/articulação) via IA e suas medidas foram comparadas a animais que receberam apenas Angiotensina II.

Em outro grupo de animais, o inibidor da ECA (Enalapril, 3 mg/kg, via oral, segundo Silva et al., 2015) ou o bloqueador do receptor AT1 de angiotensina II (valsartan, 20 mg/kg, via oral, Ha et al., 2014) foi administrados meia hora antes das injeções intra-articulares da baixa dose de MSU (1 µg/articulação) ou ainda, da co-injeção do antagonista do receptor AT2, PD123319, mais a baixa dose de MSU (1 µg/articulação) (SILVA et al., 2014; Ha et al., 2014).

3.3 Parâmetros nociceptivos

Como parâmetros nociceptivos serão avaliadas a sensibilidade mecânica e nocicepção espontânea. Serão utilizados camundongos aclimatizados (1-2 h) em caixas desobstruídas individuais de plástico (9 x 7 x 11 cm) em uma plataforma elevada com fundo gradeado, para permitir o acesso por parte do experimentador à articulação do tornozelo. A sensibilidade mecânica será então analisada com o auxílio de filamentos de Von Frey (0,008-6 g) aplicados na articulação dos animais com uma pressão que faz com que o filamento se dobre. Será utilizado o método de “Up-and-Down” descrito por CHAPLAN (1994), onde serão aplicados estímulos seguidos, iniciando com o filamento de intensidade intermediária (0,4 g). Se o animal responder ao estímulo será usado o próximo filamento menor (0,16 g). Se o animal não responder ao estímulo será utilizado o próximo filamento maior (2 g), e este procedimento se segue por até 6 estimulações seguidas ou até haver a determinação do menor filamento ao qual o animal responde com a retirada de pata. O limiar de retirada de pata será expresso em miligramas por log (Cunha et al., 2004).

Para avaliarmos a nocicepção espontânea, em todos os tempos observados, antes das medidas de sensibilidade mecânica os animais serão classificados conforme seu comportamento de apoiar a pata correspondente a articulação injetada em uma escala de nocicepção espontânea (sem a necessidade de estímulo), conforme Coderre e Wall (1987). A avaliação de dor espontânea dos animais será realizada considerando-se 4 “scores”: 0 para quando a pata do animal estiver normal sem nenhuma mudança, 1 para quando a pata estiver levemente erguida, mas ainda tocando a grade, 2 para quando a pata estiver de lado, mas ainda tocando a grade, e 3 para quando o animal estiver com a pata recolhida.

A nociceção térmica ao frio foi avaliada através da aplicação tópica de acetona (50 uL) com o auxílio de uma seringa. O tempo de resposta nociceptiva (lambida de pata ou chacoalhar da pata) dos animais foi cronometrado por 2 minutos e expresso em segundos.

3.4. Parâmetros inflamatórios

Como parâmetros inflamatórios serão avaliados o edema de articulação. Ele será expresso pela espessura da articulação, em mm, medida antes e depois da injeção de MSU, com o auxílio de um paquímetro digital, segundo SILVA et al., (2015).

3.5 Análises Estatísticas

As análises estatísticas dos dados serão realizadas pelos métodos de variância multivariada (MANOVA), variância a um critério (one-way ANOVA), e teste de comparações múltiplas de Bonferroni (teste t), de acordo com as variáveis e grupos comparados, sendo que as diferenças serão consideradas significativas para valores de $P < 0,05$. Será utilizado o programa Graph prism versão 5.

4 RESULTADOS

4.1. Desenvolvimento de dor e edema de articulação após a injeção intra-articular de diferentes concentrações de MSU

A figura 3 demonstra o limiar de retirada da pata dos animais frente aos estímulos mecânicos feitos com filamentos de von frey, a nociceção espontânea, nociceção térmica e edema induzidos pela injeção IA de diferentes concentrações de MSU que levam ao desenvolvimento de nociceção.

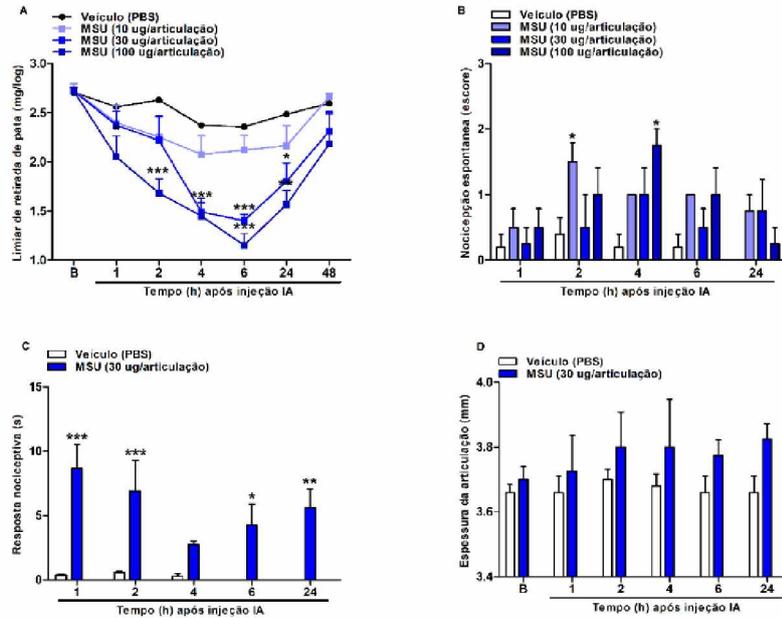


Fig 3. Curva dose da hiperalgesia mecânica (A), nocicepção espontânea (B), nocicepção térmica (C) e edema articular (D) induzido pela injeção IA de MSU. Cada ponto representa a média de 6 animais e as linhas verticais mostram o SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ e *** $P < 0.001$ indicam a diferença significativa em comparação com o grupo veículo. ANOVA de duas vias seguida do pós teste de Bonferroni.

Podemos observar na Fig. 3A que as concentrações de 30 – 100 $\mu\text{g}/\text{articulação}$ levam ao desenvolvimento de efeitos nociceptivos. A dose de 100 $\mu\text{g}/\text{articulação}$ leva a uma resposta nociceptiva que tem início uma 1 h sua injeção e dura até 24 h, ao passo que, a dose de 30 $\mu\text{g}/\text{articulação}$ causa dor de 4 a 24 h após sua administração, enquanto a dose de 10 $\mu\text{g}/\text{articulação}$ leva a uma leve queda no limiar, porém, sem efeitos significativos. Os dados da Fig. 3B indicam que a concentração de 10 $\mu\text{g}/\text{articulação}$ levou a alterações no comportamento nociceptivo espontâneo em 2 h, enquanto a concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{articulação}$ levou a uma alteração em 4 h. Para tal, a dose escolhida para se observar os efeitos nociceptivos nos experimentos seguintes foi a de 30 $\mu\text{g}/\text{articulação}$, visto que ambas têm efeito similar, não sendo necessária uma concentração tão alta como a de 100 $\mu\text{g}/\text{articulação}$. Os dados da Fig. 3C indicam uma sensibilidade térmica significativamente maior em todos os tempos exceto às 4 h, em relação ao veículo. Os dados da Fig. 3D indicam que a dose de 30 $\mu\text{g}/\text{articulação}$ causa um pequeno aumento na espessura da articulação dos animais, porém o mesmo não é significativo.

4.2 Efeito antinociceptivo do antagonista dos receptores AT2 sobre o ataque agudo de gota

A figura 4 indica o limiar de retirada da pata dos animais frente aos estímulos feitos com filamentos de von frey, a nocicepção espontânea, térmica e o edema de articulação induzidos pela injeção IA de MSU (30 μ g/articulação) após tratamento com PD123319 por via intra-articular ou por via oral,

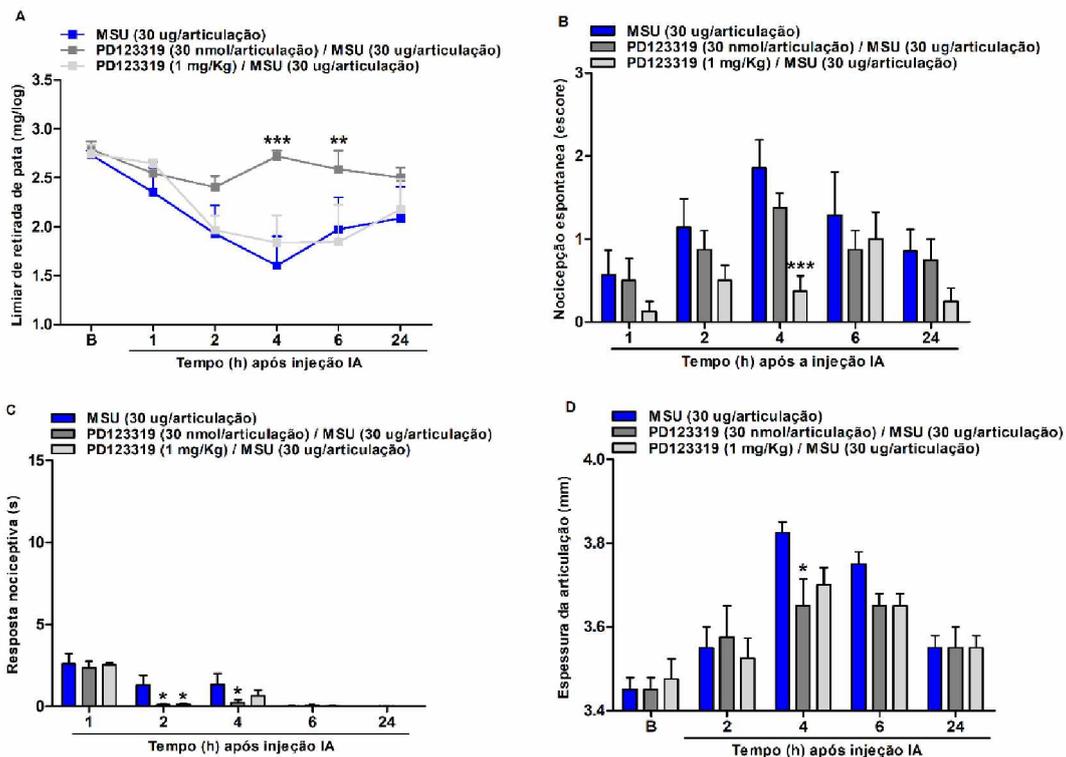


Fig 4. Resposta antinociceptiva do tratamento com PD123319 na hiperalgisia mecânica (A), nocicepção espontânea (B), nocicepção térmica (C) e edema articular (D) induzido pela injeção IA de MSU. Cada ponto representa a média de 6 animais e as linhas verticais mostram o SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ e *** $P < 0.001$ indicam a diferença significativa em comparação com o grupo controle. ANOVA de duas vias seguida do pós teste de Bonferroni.

A Fig. 4A demonstra o limiar mecânico de retirada de pata, na qual o tratamento intra-articular com o antagonista AT2 foi capaz de prevenir a hiperalgisia mecânica em 4 e 6 h, quando comparados ao grupo controle. Os dados da Fig. 4B demonstra prevenção da nocicepção espontânea as 4 h no grupo de animais tratados via oral. Os dados da Fig. 4C indicam que houve prevenção da resposta nociceptiva ao frio nos animais tratados via intra-articular de 2 a 4 h, e nos animais tratados via oral 2 h após a

injeção. A Fig. 4D indica que houve diferença significativa quanto a espessura das articulações do grupo tratado via IA 4 h após a injeção.

4.3 Resposta nociceptiva induzida pela injeção intra-articular do agonista não seletivo do receptor AT2 em animais naive, e o papel protetor do antagonista dos receptores AT2

Para verificar o possível efeito nociceptivo da injeção IA do agonista AT2, angiotensina II, os animais receberam uma injeção IA de diferentes doses (0,05 – 5 $\mu\text{g}/\text{articulação}$), meia hora antes de iniciar a avaliação do desenvolvimento de dor.

A figura 5 indica o limiar de retirada da pata dos animais frente aos estímulos mecânicos feitos com filamentos de von frey, a nocicepção espontânea, nocicepção térmica e edema avaliados após a injeção IA de angiotensina II.

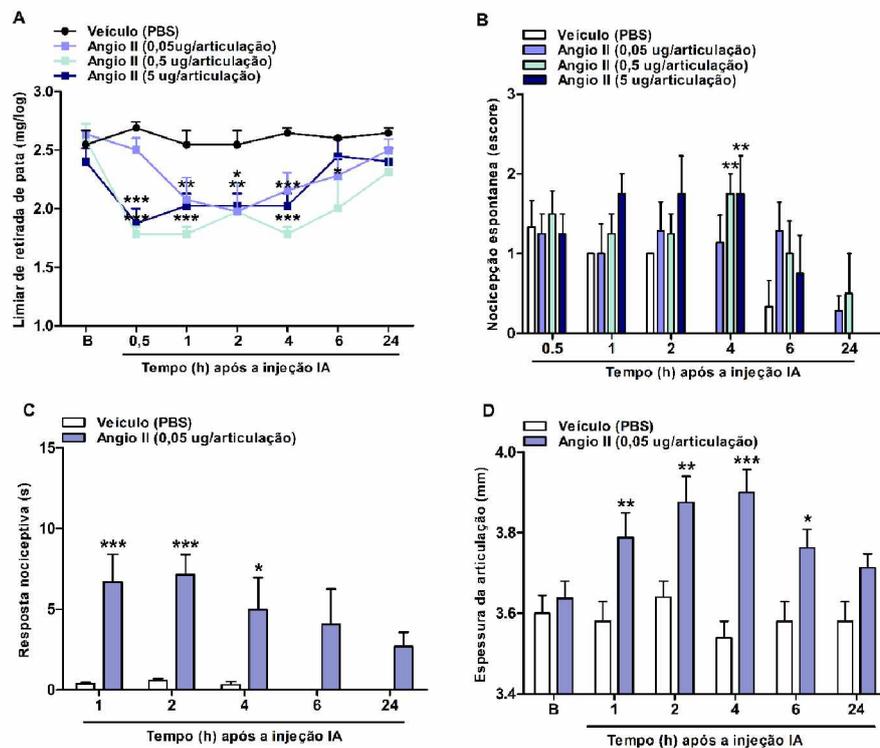


Fig 5. Curva de dose para o desenvolvimento de hiperalgesia mecânica (A), nocicepção espontânea (B), nocicepção térmica (C) e edema articular (D) induzido pela injeção IA de Angiotensina II. Cada ponto representa a média de 6 animais e as linhas verticais mostram o SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ e *** $P < 0.001$ indicam a diferença significativa em comparação com o grupo veículo. ANOVA de duas vias seguida do pós teste de Bonferroni.

A Fig. 5A demonstra que, em comparação aos animais que receberam a injeção intra-articular de veículo, os animais que receberam a injeção IA de angiotensina II na

dose de 0,05 μg desenvolveram hiperalgesia mecânica em 2 h após a injeção. Enquanto os animais que receberam a dose de 0,5 μg tiveram sensibilidade mecânica de 0,5 a 6 h. O grupo que recebeu a dose de 5 μg desenvolveu hiperalgesia mecânica de 0,5 a 4 h. A Fig. 5B confirma o perfil pró-nociceptivo da injeção IA de angiotensina II, onde observa-se o desenvolvimento de nocicepção espontânea 4 h após as injeções nas concentrações de 5 e 0,5 $\mu\text{g}/\text{articulação}$. A Fig. 5C indica o desenvolvimento de nocicepção térmica quando comparada aos animais controle, em 1, 2 e 4 h após a injeção. A Fig. 5D evidencia o desenvolvimento de edema nos animais que receberam injeção IA de Angiotensina II entre 1 e 6 horas.

A figura 6 indica o limiar de retirada da pata dos animais frente aos estímulos mecânicos feitos com filamentos de von frey, a nocicepção espontânea, nocicepção térmica e edema induzidos pela co-injeção IA do agonista AT2, Angiotensina II com o antagonista AT2, PD123319.

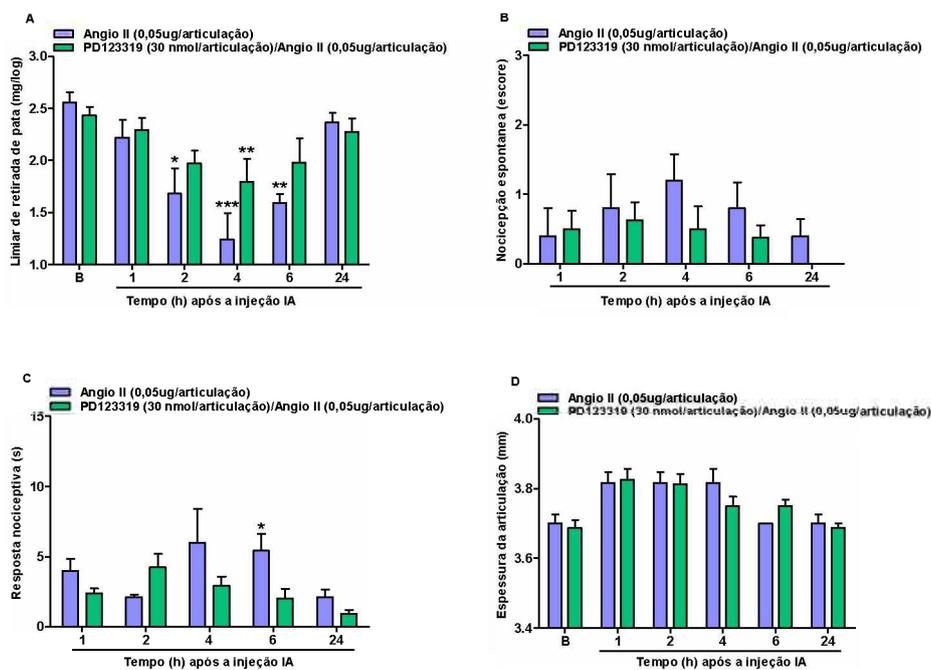


Fig 6. Papel protetor do tratamento com PD123319 sobre a hiperalgesia mecânica (A), nocicepção espontânea (B), nocicepção térmica (C) e edema articular (D) induzido pela injeção IA de Angiotensina II. Cada ponto representa a média de 6 animais e as linhas verticais mostram o SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ e *** $P < 0.001$ indicam a diferença significativa em comparação com o grupo controle. ANOVA de duas vias seguida do pós teste de Bonferroni.

Os dados da Fig. 6A demonstram que os animais que receberam a co-injeção tiveram proteção parcial dos efeitos nociceptivos de 2 a 6 h após as injeções. A Fig. 6B

não demonstrou nenhuma alteração significativa na nocicepção espontânea. A Fig. 6C indicam que os animais que receberam apenas injeção de Angiotensina II apresentaram nocicepção térmica 6 h, que foi prevenida quando comparada ao grupo tratado. A Fig. 6D demonstra que não houve alterações significativas na espessura da articulação dos animais.

4.4 Efeito antinociceptivo do antagonista dos receptores AT2 sobre o ataque agudo de gota precipitado pelo uso de iECA e BRAT1

A figura 7 indica o limiar de retirada da pata dos animais frente aos estímulos mecânicos feitos com filamentos de von frey, a ausência de nocicepção espontânea, nocicepção térmica e edema, após a injeção intra-articular das diferentes concentrações de MSU consideradas como baixas concentrações de MSU, que não tem efeito por si só.

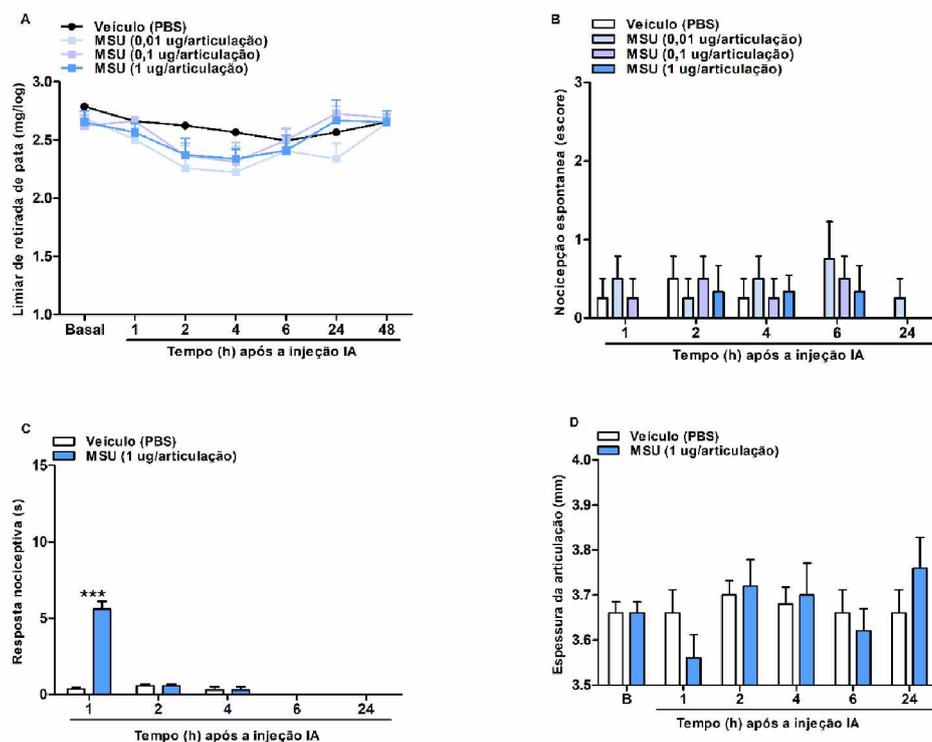


Fig 7. Efeito na hiperalgesia mecânica (A), nocicepção espontânea (B), nocicepção térmica (C) e edema articular (D) induzido por uma baixa concentração de MSU injetado via IA. Cada ponto representa a média de 6 animais e as linhas verticais mostram o SEM. *** $P < 0.001$ indicam a diferença significativa em comparação com o grupo controle. ANOVA de duas vias seguida do pós teste de Bonferroni.

Os dados da Fig. 7A, 7B, 7C e 7D indicam que nenhuma concentração testada (0,01 - 1 ug/articulação) levou ao desenvolvimento de nocicepção mecânica, espontânea

e térmica, bem como a espessura da articulação não sofreu alteração significativa, sendo que todas as concentrações demonstraram um efeito bem semelhante ao basal. Apesar da resposta observada na Fig 7C, pode-se avaliar que é inferior a evocada pela dose de 30 μg /articulação, observada na Fig 3C, e se apresenta apenas 1 h após a injeção de MSU. Portanto, a dose de 1 μg /articulação será utilizada como baixa concentração de MSU nos experimentos subsequentes.

A figura a seguir indica o limiar de retirada de pata dos animais frente aos estímulos mecânicos feitos com filamentos de von frey, a nocicepção espontânea, nocicepção térmica e perfil edematogênico avaliados após a injeção de uma baixa dose de MSU, que por si só não tem efeito, em animais tratados com Enalapril (iECA).

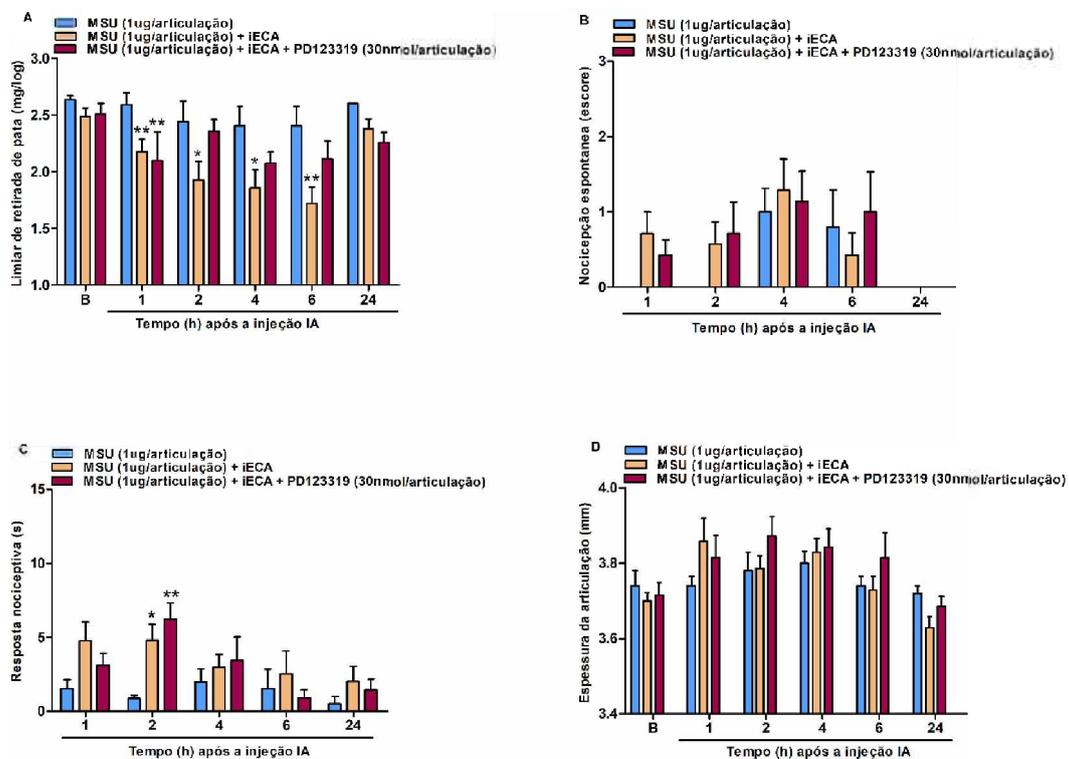


Fig 8. Efeito antinociceptivo do tratamento com enalapril via oral e o Antagonista PD123319 IA. hiperalgesia mecânica (A), nocicepção espontânea (B), nocicepção térmica (C) e edema articular (D) induzido pela injeção de uma baixa dose de MSU injetado via IA. Cada ponto representa a média de 6 animais e as linhas verticais mostram o SEM. * $P < 0.05$ e ** $P < 0.01$ indicam a diferença significativa em comparação com o grupo controle. ANOVA de duas vias seguida do pós teste de Bonferroni.

Na Fig. 8A é possível observar que os animais que foram tratados com enalapril (iECA) desenvolveram respostas nociceptivas características do ataque agudo de gota como a nocicepção mecânica (Fig 3A) observada de 1 a 6 horas após as injeções IA da

baixa dose de MSU. O grupo tratado com o Antagonista AT2, PD123319, não desenvolveu hiperalgesia mecânica de 2 a 6 h quando comparado ao grupo controle. Na Fig. 8B não houve diferença entre os grupos quanto a nocicepção espontânea observada. É possível observar na Fig. 8C nocicepção térmica em 2 h após a injeção no grupo de animais tratados com iECA e o antagonista AT2, bem como os animais que só receberam iECA. Na Fig. 8D não foi verificada diferença estatística entre os grupos quanto a espessura da articulação medida.

A figura a seguir indica o limiar de retirada de pata dos animais frente aos estímulos mecânicos feitos com filamentos de von frey, a nocicepção espontânea, nocicepção térmica e perfil edematogênico avaliados após a injeção de uma baixa dose de MSU, que por si só não tem efeito nociceptivo ou edematogênico, em animais tratados com Valsartana (BRAT1).

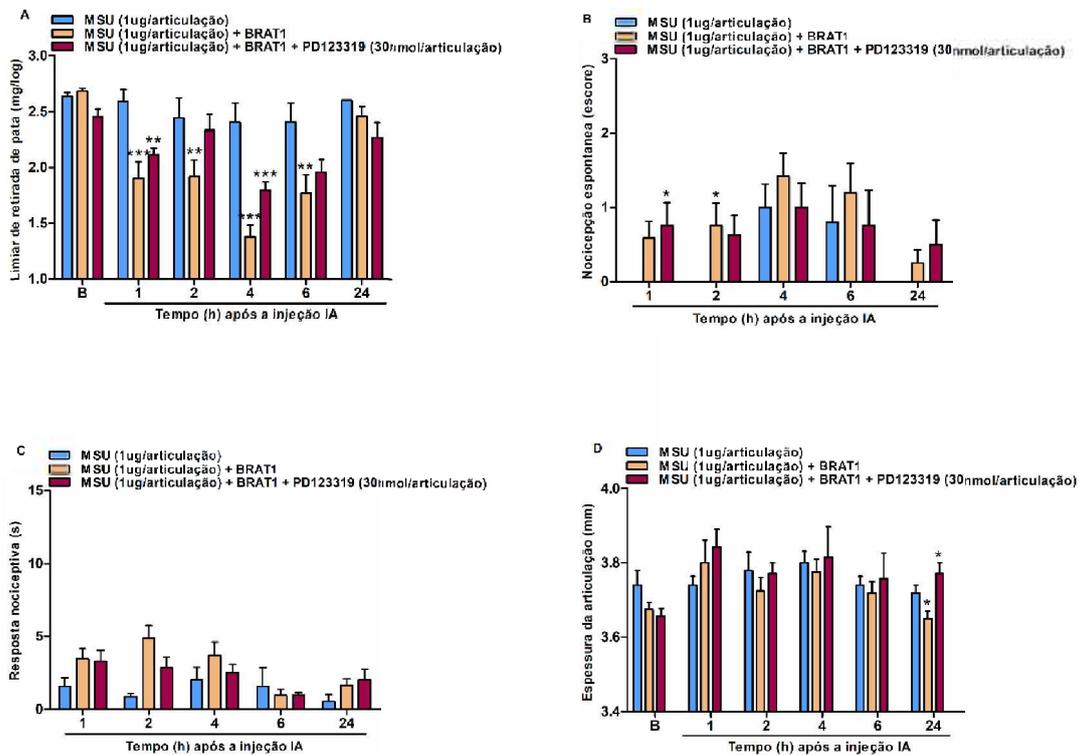


Fig 9. Efeito antinociceptivo do tratamento com valsartana via oral e o Antagonista PD123319 IA. hiperalgesia mecânica (A), nocicepção espontânea (B), nocicepção térmica (C) e edema articular (D) induzido pela injeção de uma baixa dose de MSU injetado via IA. Cada ponto representa e média de 6 animais e as linhas verticais mostram o SEM. * $P < 0.05$ e ** $P < 0.01$ indicam a diferença significativa em comparação com o grupo controle. ANOVA de duas vias seguida do pós teste de Bonferroni.

Na Fig. 9A é possível verificar que o grupo de animais que foi tratado com o Antagonista AT2, PD123319, teve prevenção da hiperalgesia mecânica em 2 e 6 h. O grupo que recebeu a baixa dose de MSU e o BRAT1 desenvolveu hiperalgesia mecânica de 1 a 6 h. A Fig. 9B foi verificado nos animais nocicepção espontânea no grupo tratado com BRAT1 em 1 h após a injeção, e no grupo controle foi verificada nocicepção espontânea 2 h após a injeção. A Fig. 9C não demonstrou alterações significativas entre os grupos de animais analisados. Na Fig. 9D foi verificado nos animais diferenças significativas 24 h nos animais tratados com o Antagonista AT2 e nos animais que apenas receberam BRAT1 e uma baixa dose de MSU.

5. DISCUSSÃO

A gota é uma artrite inflamatória considerada um grande problema de saúde pública. É caracterizada pela deposição de cristais de MSU nas articulações. Tem como característica uma grande presença de comorbidades, na qual verifica-se uma alta ocorrência de indivíduos que sofrem de gota e também de hipertensão (ZHU et al., 2012). Estudos demonstram casos de ataques agudos de gota com ocorrência posterior ao uso de fármacos anti-hipertensivos como os iECA e BRAT1 (CHOI et al., 2012). Esses fármacos atuam principalmente pelo sistema das angiotensinas, através da inibição da enzima conversora de angiotensina I e bloqueio dos receptores AT1. Apesar da eficácia do uso de tais medicamentos no tratamento da hipertensão, pouco se sabe sobre a ação deles em outras condições inflamatórias (BADER, 2010). Desta forma, no presente estudo avaliamos o potencial terapêutico do bloqueio de receptores AT2 através do uso de seu antagonista seletivo, PD123319. Para os experimentos foi utilizado um modelo de ataque agudo de gota induzido pela injeção de cristais de MSU, bem como pela precipitação do ataque através da administração dos fármacos anti-hipertensivos e uma baixa dose de MSU.

Para mimetizar a crise aguda característica da 2ª fase da gota, foi utilizado um modelo bem descrito que avalia a hiperalgesia mecânica e inflamação, através do auxílio de filamentos de vonfrey. Este modelo foi padronizado por Torres e colaboradores em 2009, onde verificou o desenvolvimento de respostas nociceptivas, infiltração leucocitária e nocicepção térmica, característicos do ataque agudo. O ataque agudo de gota tem como grande característica a dor extenuante, portanto, é interessante um modelo animal que mimetize estes sintomas. O modelo tem eficácia comprovada

uma vez que é possível verificar características comuns de uma artrite inflamatória quando os animais recebem a injeção IA de MSU. De acordo com os achados os cristais são capazes de induzir hiperalgesia mecânica acentuada de 2 a 6 horas após a injeção de MSU nas concentrações de 30 µg e 100 µg/articulação. Foi possível observar ainda respostas nociceptivas ao estímulo frio de 1 a 24 horas após a injeção, e edema. Esses resultados demonstram efeitos semelhantes aos observados em humanos frente a um ataque agudo de gota causado pela formação natural dos cristais de urato monossódico (CHOI et al., 2005).

Ainda em relação ao modelo escolhido, podemos observar que indivíduos com gota apresentam uma primeira fase de hiperuricemia, na qual há altos índices de ácido úrico no sangue. Nos mamíferos o ácido úrico é o metabolismo final das purinas, bases nitrogenadas com funções fundamentais ao metabolismo celular (ÁLVAREZ-LARIO e MACARRÓN-VICENTE, 2010). As purinas são degradadas a hipoxantina e esta em xantina, e por ação da enzima xantina oxidase a xantina é então convertida em ácido úrico. Essa é uma característica específica de humanos, uma vez que roedores possuem a enzima uricase, responsável por converter o ácido úrico em alantóina, um composto mais solúvel e facilmente excretado pela urina (ROCK et al., 2013). O modelo utilizado consiste na injeção direta de cristais de MSU, pois é um método mais prático de mimetizar a gota, devido ao fato de roedores possuírem a enzima uricase.

A gota se mantém como uma doença de difícil tratamento devido a diversas contraindicações e seu tratamento se resume em duas etapas, manejo da crise aguda e terapia de longo prazo. Na primeira etapa são usados medicamentos com o intuito de aliviar a dor, prevenir a inflamação e incapacitação articular como anti-inflamatórios não esteroidais e colchicina. Na segunda etapa são usados meios de prevenir novos ataques e diminuir a concentração de ácido úrico no sangue como controle da dieta e alopurinol. A prescrição medicamentosa nem sempre é eficiente em prevenir a gota pois há baixa adesão a terapia devido aos efeitos colaterais associados aos medicamentos prescritos, por exemplo alta toxicidade para a colchicina e reações alérgicas cutâneas para o alopurinol. Ainda, a grande taxa de comorbidades como hipertensão, doenças cardiovasculares, doença renal crônica e diabetes fazem com que se tenha contraindicações devido as diferentes medicações as quais estes indivíduos estão expostos (SCHLESINGER, 2014).

Portanto, é importante estudar os mecanismos de ação da gota, buscando novos alvos terapêuticos. Neste sentido, nosso grupo vem desenvolvendo estudos que

investigam os mecanismos de ação pela qual se dá a iniciação e manutenção do ataque agudo de gota, onde um trabalho demonstra que as cininas estão parcialmente envolvidas com a dor e inflamação do ataque agudo de gota. As cininas fazem parte de um complexo sistema de peptídeos responsáveis pela sinalização na inflamação, esse efeito é parcialmente regulado pela ativação de receptores B1 (SILVA et al., 2015). Portanto, acredita-se que outro fator possa estar envolvido nesta resposta. É bem claro o envolvimento do sistema das cininas com o sistema da renina-angiotensina onde a inibição da ECA pode modular os dois sistemas. Nesse sentido, nós hipotetizamos que o sistema das angiotensinas e seus metabólitos possam contribuir para o desenvolvimento da gota.

O sistema das angiotensinas envolve a produção de diferentes metabólitos que podem ter atividade sobre receptores AT2 de angiotensina II. Os receptores AT2 podem ser expressos em células do sistema imune como macrófagos, neurônios sensoriais e células dos vasos sanguíneos (ANAND et al., 2013). Sua ativação pode ocorrer através da Angiotensina II e Angiotensina 1-9, Angiotensina III, Angiotensina IV, Angiotensina 1-7, todas provenientes de clivagens feitas pela ECA, ECA2 e algumas peptidases (YATABE et al., 2011). Um estudo recente demonstrou que há a expressão de receptores AT2 no ambiente articular, verificados em amostras obtidas de pacientes com osteoartrite e artrite reumatoide. Ainda, que essa expressão é aumentada através da ação de citocinas pró inflamatórias como TNF- α e IL-1 β , sugerindo que esses receptores podem estar envolvidos com o mecanismo de tais artrites (TERENZI et al., 2017).

Após confirmar o perfil pró nociceptivo da injeção de MSU já verificado antes em outros trabalhos (SILVA et al., 2015; RUIZ-MIYAZAWA et al., 2018; MARCOTTI et al., 2018; REBER et al., 2018). Em nosso trabalho foi observado que o uso do Antagonista AT2, PD123319, por via intra-articular, foi capaz de prevenir a dor característica do ataque agudo de gota em roedores. A análise dos resultados demonstra que houve efeito antinociceptivo frente a estímulo mecânico com duração de 4 e 6 horas após o tratamento, houve ainda prevenção de nocicepção térmica ao frio, 2 e 4 horas após o tratamento intra-articular com o antagonista AT2, PD123319. Por outro lado, não foi verificado efeito protetor nos animais tratados por via oral, porém, é preciso observar que foi testada apenas a dose de 1 mg/kg, doses maiores não foram testadas por questões de protocolo. O potencial terapêutico do antagonismo dos receptores AT2 já foi observado em modelos de dor neuropática como neuropatia diabética e neuralgia pós-herpética, onde se evidenciou efeito analgésico com o uso do antagonista

(CHAKRABARTY et al., 2018; MURALIDHARAN et al., 2014). Além disso há também estudos clínicos de fase II onde é utilizado o Antagonista AT2 por via oral para tratamento de dor neuropática em indivíduos com neuralgia pós herpética (RICE et al., 2014). Estes resultados corroboram com nossos achados apoiando o uso de tais antagonistas no tratamento de condições dolorosas agudas.

Não é possível confirmar por qual mecanismo molecular o antagonismo dos receptores AT2 causou os efeitos nociceptivos observados, porém sabe-se que os receptores AT2 são regulados positivamente pelo óxido nítrico (ON) em células endoteliais, bem como a ativação dos receptores leva a um aumento na síntese e liberação de ON, um produto pró-inflamatório (DAO et al., 2016). O óxido nítrico é envolvido no contexto da inflamação na artrite e a literatura demonstra que o MSU é capaz de levar ao aumento na expressão da óxido nítrico sintase, induzível em cultura de macrófagos, e que o tecido sinovial de indivíduos com gota exibe níveis aumentados de óxido nítrico sintase induzível (CHEN et al., 2014; ST. CLAIR et al., 1996). Ainda, a expressão dos receptores AT2 em neurônios sensoriais também sugere que sua ativação pode estar relacionada a mecanismos de modulação da dor (ANAND et al., 2013)

Um estudo recente demonstra que há a expressão de receptores AT2 na articulação de indivíduos com osteoartrite e artrite reumatoide (Terenzi et al., 2017). Ainda, sabe-se que os receptores AT2 podem estar presentes no ambiente articular, pois podem ser expressos por células neuronais e não neuronais ali presentes como sinoviócitos do tipo A e neurônios sensoriais. A injeção IA de diferentes concentrações de Angiotensina II, um agonista não seletivo de receptores AT2, causou nocicepção de 1 a 4 horas após a injeção IA. Ao realizar o mesmo experimento com animais tratados meia hora antes com o antagonista seletivo do receptor AT2, PD123319, foi verificada a prevenção parcial da hiperalgesia mecânica de 2 a 6 horas após a injeção, nos levando a crer que parte deste efeito pode ocorrer via ativação de receptores AT2. O efeito do antagonista é específico sobre receptores AT2 e é eficaz em reduzir, mesmo que parcialmente, a resposta nociceptiva induzida pela angiotensina II. Acreditamos, portanto que o antagonismo dos receptores AT2 se apresenta como uma estratégia terapêutica promissora para pacientes com artrites como a gota. Contudo, devemos levar em consideração que a angiotensina II pode ainda ativar receptores AT1 para angiotensina, assim como ser convertida em outras moléculas como angiotensina 1-7, e angiotensina III. Em razão disso, acreditamos que a análise do possível efeito nociceptivo da administração IA do agonista seletivo AT2, como o composto 21 (C21),

poderia reforçar nossos achados e indicar com maior segurança o envolvimento de receptores AT2 em respostas nociceptivas articulares. O C21 é um agonista não peptídico específico para receptores AT2 devida sua alta afinidade, é amplamente usado para verificar o papel dos receptores AT2 (BROUWERS et al., 2013; MENK et al., 2018).

Até aqui observamos que o uso de um antagonista AT2, pode prevenir a dor do ataque agudo de gota, assim, o antagonismo também poderia ter efeito nos ataques agudos de gota precipitados pelo uso de fármacos anti-hipertensivos, para isso foi utilizado um modelo de ataque agudo de gota precipitado pelo uso de fármacos anti-hipertensivos (SILVA et al., 2014). Com esta abordagem experimental, observamos que o pré tratamento com inibidores da ECA é capaz de levar a uma precipitação ao ataque agudo de gota e verificamos aqui que o uso de BRAT1 levou a um desenvolvimento de uma resposta similar. Estes achados estão de acordo com CHOI et al., 2012 que demonstra um risco maior no desenvolvimento de ataque agudo de gota em indivíduos que fazem uso de iECA e BRAT1, e corroboram com nossa hipótese de que alguns dos metabolitos do sistema das angiotensinas pode estar ativando os receptores AT2, causando as respostas nociceptivas características do ataque agudo de gota. Tanto a inibição da ECA quanto o bloqueio dos receptores AT1 levam a um cenário onde alguns metabolitos do sistema das angiotensinas pode se acumular levando a ativação dos receptores AT2. Contudo, a identificação de tais metabólitos requer uma análise criteriosa deste sistema, com dosagens de angiotensinas no fluido sinovial de animais submetidos ao ataque agudo de gota, ou ainda, do fluido sinovial de indivíduos com ataque agudo de gota.

6. CONCLUSÃO

Desta forma, é possível sugerir até o momento, que a ativação do receptor AT2 para angiotensina 2 está associada as respostas nociceptivas do ataque agudo de gota, bem como aqueles precipitados pelo uso de fármacos anti-hipertensivos. Contudo mais experimentos são necessários para chegar a elucidação do mecanismo molecular pelo qual estes receptores estão sendo ativados durante a gota.

7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ÁLVAREZ-LARIO B, MACARRÓN-VICENTE J. Uric acid and evolution. **Rheumatology (Oxford)**. 49(11). Nov. 2010.

ANAND U, FACER P, YIANGOU Y, SINISI M, FOX M, MCCARTHY T, BOUNTRA, C, KORCHEV Y. AND ANAND P. (2013), AT2 receptor localization and function in DRG neurons. **EJP**, 17: 1012-1026. Aug. 2013.

BADER, M. Tissue renin–angiotensin–aldosterone systems: targets for pharmacological therapy. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** 50, 439–465. 2010

BENNETT, DL. & WOODS, CG. Painful and painless channelopathies. **Lancet Neurol.** 13, 587–599. 2014.

BROUWERS S, SMOLDERS I, MASSIE A, DUPONT AG. Angiotensin II type 2 receptor agonist Compound 21 attenuates pulmonary inflammation in a model of acute lung injury. **J Inflamm Res.** 1;11:169-178. May. 2018.

CAMPION EW, GLYNN RJ, DELABRY LO. Asymptomatic hyperuricemia. Risks and consequences in the Normative Aging Study. **Am J Med.** 82(3):421-6. 1987.

CAREY RM. Newly discovered components and actions of the renin- angiotensin system. **Hypertension.** 62:818–822. 2013.

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

CHOI HK. et al. Antihypertensive drugs and risk of incident gout among patients with hypertension: population based case-control study. **Br. Med. J.** v. 12, p. 344:d8190. 2012.

CODERRE TJ, WALL PD. Ankle joint urate arthritis (AJUA) in rats: an alternative animal model of arthritis to that produced by Freund's adjuvant. **Pain.** 28(3):379-93. 1987.

COX, JJ., REIMANN, F., NICHOLAS, AK., THORNTON, G., ROBERTS, E., SPRINGELL, K., et al. An SCN9A channelopathy causes congenital inability to experience pain. **Nature** 444, 894–898. 2006.

CHAPLAN SR. et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **J Neurosci Methods**. 53(1):55-63. 1994.

CHAKRABARTY A et al. Inflammatory Renin-Angiotensin System Disruption Attenuates Sensory Hyperinnervation and Mechanical Hypersensitivity in a Rat Model of Provoked Vestibulodynia. **J Pain**. 19(3):264-277. Mar. 2018.

Chen, L.; Hsieh, MS.; Ho, HC.; Liu, YH.; Chou, DT.; Tsai, SH. Stimulation of inducible nitric oxide synthase by monosodium urate crystals in macrophages and expression of iNOS in gouty arthritis. **Nitric Oxide**. 11, 228–236. 2004.

CRACKOWER et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. **Nature**. 417:822– 828. 2002.

CUNHA TM, VERRI WA JR., VIVANCOS GG, MOREIRA IF, REIS S, PARADA CA, CUNHA FQ, FERREIRA SH. An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. **Braz J Med Biol Res** 37:401–407. 2004.

DANYEL LA, SCHMERLER P, PAULIS L, UNGER T, STECKELINGS UM. Impact of AT2-receptor stimulation on vascular biology, kidney function, and blood pressure. **Integr Blood Control**. 6:153–161. 2013.

DANSER et al. The Angiotensin II Type 2 Receptor for Pain Control. **Cell Press**. v. 157, p. 1504-1506. 2014.

DAO VT et al. Nitric oxide up-regulates endothelial expression of angiotensin II type 2 receptors. **Biochem Pharmacol**. 112:24–36. 2016.

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

GEORGE J, STRUTHERS AD. Role of urate, xanthine oxidase and the effects of allopurinol in vascular oxidative stress. **VascHealth Risk Manag**. 5:265–72.4. 2009.

HA YM, PARK EJ, KANG YJ, PARK SW, KIM HJ, CHANG KC. Valsartan independent of AT₁ receptor inhibits tissue factor, TLR-2 and -4 expression by regulation of Egr-1 through activation of AMPK in diabetic conditions. **J Cell Mol Med.** (10):2031-43. 2014.

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

KANDEL, ER.; SCHWARTZ, JH.; JESSEL, TM. Princípios de Neurociência. **São Paulo: Manole.** 2003.

KEENAN RT et al. (2011). Prevalence of contraindications and prescription of pharmacologic therapies for gout. **Am J Med.** 124(2):155-63. Feb. 2011.

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

KOBORI H, NANGAKU M, NAVAR LG, AND NISHIYAMA A. The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. **Pharmacol Rev** 59:251–287. 2007.

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

MARCOTTI A et al., Joint nociceptor nerve activity and pain in an animal model of acute gout and its modulation by intra-articular hyaluronan. **Pain.** 159(4):739-748. Apr. 2018.

MENK M et al., Angiotensin II type 2 receptor agonist Compound 21 attenuates pulmonary inflammation in a model of acute lung injury. **J Inflamm Res.** 1;11:169-178. May. 2018.

MILLAN, MJ. Descending control of pain. **Prog Neurobiol** 66(6): 355 – 474. 2002.

MOGIL, JS. Animal models of pain: progress and challenges. **Nat. Rev. Neurosci.** 10, 283–294. 2009.

MURALIDHARAN A¹, WYSE BD, SMITH MT. (2014). Analgesic Efficacy and Mode of Action of a Selective Small Molecule Angiotensin II Type 2 Receptor Antagonist in a Rat Model of Prostate Cancer-Induced Bone Pain. **Pain Med.** 15(1):93-110. 2014.

NEOGI, T. Clinical practice. Gout. **N Engl J Med**, v. 364, p. 443-452. 2011.

OGATA Y et al. Involvement of Spinal Angiotensin II System in Streptozotocin-Induced Diabetic Neuropathic Pain in Mice. **Molecular Pharmacology** 016, 90 (3) 205-213. 2013.

REBER LL et al., The tyrosine kinase inhibitor imatinib mesylate suppresses uric acid crystal-induced acute gouty arthritis in mice. **PLoS One.** 5;12(10):e0185704. Oct. 2017.

REES et al. Optimizing current treatment of gout. **Nature Reviews Rheumatology.** 10, 271–283. 2014.

RICE ASC et al. EMA401, an orally administered highly selective angiotensin II type 2 receptor antagonist, as a novel treatment for postherpetic neuralgia: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2 clinical trial. **Lancet**; 383(9929):1637-47. 2014

RICHETTE P, BARDIN T. Gout. **Lancet**; 375:318-28. 2010.

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

RUIZ-MIYAZAWA KW et al. Hesperidin Methylchalcone Suppresses Experimental Gout Arthritis in Mice by Inhibiting NF- κ B Activation. **J Agric Food Chem.** 66(25) pp 6269–6280. Jun. 2018.

SCHLESINGER N. Treatment of acute gout. **Rheum Dis ClinNorth Am.** 40:329–41. 2014.

SILVA CR, OLIVEIRA SM, HOFFMEISTER C, et al. The role of kinin B₁ receptor and the effect of angiotensin I-converting enzyme inhibition on acute gout attacks in rodents. **Annals of the Rheumatic Diseases** .75:260-268. 2016.

SMITH, MAREE & MURALIDHARAN, ARJUN. Targeting angiotensin II type 2 receptor pathways to treat neuropathic pain and inflammatory pain. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**. 18(12). 2014.

SHERRINGTON, CS. *The Integrative Action of the Nervous System*. Cambridge, UK: **Cambridge Univ. Press**. 1906.

ST.CLAIR, EW.; WILKINSON, WE.; LANG, T.; SANDERS, L.; MISUKONIS, MA.; GIL KESON, GS.; PISETSKY, DS.; GRANGER, DI.; WEINBERG, JB. Increased expression of blood mononuclear cell nitric oxide synthase type 2 in rheumatoid arthritis patients. **J. Exp. Med**. 184, 1173–1178. 1996.

TEIXEIRA M.J., SHIBATA M.K., PIMENTA C.A.M., CORRÊA C.F. Dor no Brasil: estado atual e perspectivas. In: Teixeira MJ, Corrêa CF, and Pimenta CAM, organizadores. *Dor: conceitos gerais*. São Paulo (SP): **Limay**. 1995.

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

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

VON BANCHET GS, RICHTER J, HÜCKEL M, ROSE C, BRÄUER R, SCHAIBLEHG. Fibroblast-like synovial cells from normal and inflamed knee joints differently affect the expression of painrelated receptors in sensory neurones: a co-culture study. **Arthritis Res Ther**; 9(1):R6. 2007.

VON KORFF M., DWORKIN S., LERESCHE L. Graded chronic pain status: na epidemiologic evaluation. **Pain**; 40: 279-91. 1990.

WAN Y, WALLINDER C, PLOUFFE B, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of the first selective nonpeptide AT2 receptor agonist. **J Med Chem**. 47:5995–6008. 2004.

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

XU J, CARRETERO OA, ZHU L, SHESELY EG, RHALEB NE, DAI X, WANG L, YANG JJ, YANG XP. Protective role of AT(2) and B(1) receptors in kinin B(2)-receptor-knockout mice with myocardial infarction. **Clin Sci (Lond)**. 124(2):87-96. 2013.

YATABE J, YONEDA M, YATABE MS, WATANABE T, FELDER RA, JOSE PA, SANDA H. Angiotensin III stimulates aldosterone secretion from adrenal gland partially via angiotensin II type 2 receptor but not angiotensin II type 1 receptor. **Endocrinology**. 152:1582–1588. 2011.

ZHU Y, PANDYA BJ, CHOI HK. Comorbidities of gout and hyperuricemia in the US general population: NHANES 2007-2008. **Am J Med**. 125(7):679-687. 2012.

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