



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA INSTITUTO DE
BIOTECNOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**EFEITO ANTINOCICEPTIVO E ANTI-INFLAMATÓRIO DO ALCALÓIDE
APORFÍNICO ESTEFALAGINA EM UM MODELO DE GOTA EM
CAMUNDONGOS**

Discente: Priscilla Dias Santos

Orientadora: Profa. Dra. Cássia Regina da Silva

UBERLÂNDIA-MG

2020



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA INSTITUTO DE
BIOTECNOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**EFEITO ANTINOCICEPTIVO E ANTI-INFLAMATÓRIO DO ALCALÓIDE
APORFÍNICO ESTEFALAGINA EM UM MODELO DE GOTA EM
CAMUNDONGOS**

Discente: Priscilla Dias Santos

Orientador: Prof. Dra. Cássia Regina da Silva

**Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Uberlândia
como parte dos requisitos para
obtenção do Título de Mestre em
Genética e Bioquímica (Área
Bioquímica).**

UBERLÂNDIA-MG

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

- S237e
2020 Santos, Priscilla Dias, 1995-
Efeito antinociceptivo e anti-inflamatório do alcaloide aporfínico estefalagina em um modelo de gota em camundongos [recurso eletrônico] / Priscilla Dias Santos. - 2020.
- Orientadora: Cássia Regina da Silva.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2023.8117>
Inclui bibliografia.
1. Bioquímica. I. Silva, Cássia Regina da, 1984-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 577.1

André Carlos Francisco
Bibliotecário - CRB-6/3408



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica
 Av. Pará 1720, Bloco 2E, Sala 244 - Bairro Umarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
 Telefone: +55 (34) 3225-8438 - www.ppggb.ibtec.ufu.br - ppggb@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Genética e Bioquímica				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico - 11/2020 - PPGGB.				
Data:	Vinte e oito de janeiro de dois mil e vinte e um	Hora de início:	10:10h	Hora de encerramento:	10:50h
Matrícula do Discente:	11822GBI014				
Nome do Discente:	Priscilla Dias Santos				
Título do Trabalho:	Efeito antinociceptivo e anti-inflamatório do alcaloide aporfínico estefalagina em um modelo de gota em camundongos.				
Área de concentração:	Bioquímica				
Linha de pesquisa:	Estrutura e Função de Proteínas.				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Efeito antinociceptivo e anti-edematogênico da planta <i>Annona crassiflora</i> em um modelo de gota em camundongos.				

Aos vinte e oito dias do mês de janeiro de dois mil e vinte e um, às 10:10 horas, reuniu-se via web conferência pela plataforma Google Meet, em conformidade com a Portaria nº 36, de 19 de março de 2020 da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e Resolução de nº 06/2020 do Conselho de Pesquisa e Pós-graduação pela Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica, assim composta: Professores Doutores: Cássia Regina da Silva (Orientador), Gabriela Trevisan Santos e Celina Monteiro da Cruz Lotufo. A participação dos dois últimos se deu por epístola. Iniciando os trabalhos o (a) presidente Dr (a). Cássia Regina da Silva apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença dos participantes, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa. A seguir o senhor(a) presidente procedeu a leitura das epístolas enviadas pelos membros da banca. Em seguida os membros presentes, passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a leitura das epístolas e a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

(A) PROVADO.

Esta defesa de Dissertação de Mestrado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do

Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU. Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Cassia Regina da Silva, Professor(a) do Magistério Superior**, em 28/01/2021, às 10:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gabriela Trevisan dos Santos, Usuário Externo**, em 28/01/2021, às 11:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Celina Monteiro da Cruz Lotufo, Professor(a) do Magistério Superior**, em 28/01/2021, às 13:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2473239** e o código CRC **034BDF1C**.

“Só há duas opções nesta vida: se resignar ou se indignar. E eu não vou me resignar nunca.” Darcy Ribeiro.

Dedico este trabalho a minha mãe, Maria das Dores, pelo apoio incondicional. E a todos os professores que tive a honra e o privilégio de conhecer durante minha jornada acadêmica e que lutam diariamente para manter as pesquisas em seus laboratórios.

Agradecimentos

À Universidade Federal de Uberlândia (UFU), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), a Rede de Biotérios da Universidade Federal de Uberlândia (REBIR-UFU) e a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-graduação (ProPP) pelo suporte e apoio financeiro.

A minha mãe, Maria das Dores Dias dos Santos, por todo o suporte, pelos conselhos, por sempre me ajudar a manter a calma e a paciência mesmo nos momentos mais difíceis.

Aos meus amigos e familiares, Lucas Alves, Thais Bergmann, Beatriz Coêlho, Kamilla Vasconcelos. Obrigada pelos momentos de descontração, pelos desabafos e pelos conselhos.

Aos meus colegas de laboratório, especialmente ao Vitor Freitas, Ana Cláudia Couto e Thiago Neves por estarem sempre dispostos a me ajudar em experimentos e por me ensinarem tanto.

A minha orientadora, Profa. Dra. Cássia Regina da Silva, pela oportunidade concedida, por ter confiado em mim e por ter me ensinado tanto.

Aos membros da Banca Examinadora, que gentilmente aceitaram o convite para avaliarem este trabalho.

Resumo

A gota é uma doença inflamatória caracterizada pelo acúmulo de cristais de urato monossódico (MSU) nas articulações, o que causa dor severa e inflamação no local atingido. Os medicamentos mais utilizados para o tratamento da doença possuem muitas contraindicações principalmente relacionadas a comorbidades, portanto, vê-se a necessidade de encontrar novas formas de tratamento, mais eficazes e seguras. Uma linha muito estudada é a de produtos naturais. Diversos medicamentos já foram produzidos a partir dessa fonte, como é o caso da colchicina, um alcaloide utilizado para o tratamento da gota. Os alcaloides são compostos já conhecidos na literatura por apresentarem ações bioativas, como antinocicepção e anti-inflamação. Portanto, o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito antinociceptivo e anti-inflamatório do alcaloide aporfínico estefalagina extraído da *Annona crassiflora mart.*. A estefalagina (1 mg/kg por via oral) apresentou um efeito antinociceptivo (pelo teste de Von Frey) significativo quando comparado com o grupo que recebeu somente a injeção intra-articular (IA) de MSU (100 µg/articulação) em 2, 4 e 6 h após a aplicação. A estefalagina também foi capaz de reduzir de forma significativa a presença da enzima mieloperoxidase nos tecidos articulares quando comparados com o grupo que recebeu apenas MSU. Além disso, foram feitos testes para avaliar a toxicidade do alcaloide. A estefalagina não foi capaz de alterar a presença das enzimas AST e ALT na corrente sanguínea, assim como dos compostos ureia e creatinina. Também foi observado (por 7 dias após o tratamento) que o composto não causa alterações macroscópicas nos camundongos, como alteração brusca de peso, deformações, mudanças na pelagem e nas fezes. Portanto, observa-se que a estefalagina pode ser uma alternativa para o tratamento da gota, visto que foi capaz de apresentar efeitos antinociceptivos e anti-inflamatórios e nenhum efeito tóxico/colateral.

Palavras chave: alcaloide, gota, nocicepção, inflamação.

Abstract

Gout is an inflammatory disease characterized by the accumulation of monosodium urate crystals (MSU) in the joints, which causes severe pain and inflammation in the affected area. The drugs most used to treat the disease have many contraindications, mainly related to comorbidities, therefore, there is a need to find new and more effective ways. A widely studied line is that of natural products, several medications have already been produced from this source, such as colchicine, an alkaloid used to treat gout. Alkaloids are compounds already known in the literature for having bioactive actions, such as antinociception and anti-inflammation. Therefore, the aim of this study was to evaluate the antinociceptive and anti-inflammatory effect of the aporphine alkaloid stephalagine extracted from *Annona crassiflora* Mart. Stephalagine (1 mg/kg) had a significant antinociceptive effect (by Von Frey test) when compared to the group that received the intra-articular injection of MSU (100 µg/joint) in 2, 4 and 6 h after application. Stephalagine was also able to significantly reduce the presence of the myeloperoxidase enzyme in the joint tissues of the mice when compared to the group that received only MSU. In addition, tests were carried out to assess the toxicity of the alkaloid. The stephalagine was not able to alter the presence of the enzymes AST and ALT in the bloodstream or the compounds urea and creatinine. It was also observed for 7 days if the compound causes any macroscopic changes in the mice, such as sudden changes in weight, deformations, changes in the coat, in the feces and none of this was seen. Therefore, it is observed that stephalagine may be an alternative for the treatment of gout, since it was able to have antinociceptive and anti-inflammatory effects and no toxic/side effects.

Keywords: alkaloid, gout, nociception, inflammation.

Lista de figuras

Figura 1 Efeito antinociceptivo da estefalagina sobre o ataque agudo de gota induzido por MSU em camundongos. A) Hiperalgisia mecânica, B) Nocicepção espontânea, e C) Sensibilidade térmica ao frio, medidas em diferentes tempos após a injeção IA de MSU. N = 7 por grupo. Cada coluna representa a média \pm SEM. #p <0,05 e ## p <0,01 representam diferenças significativas em comparação com o grupo naive; * p <0,05, e *** p <0,001 representam diferenças significativas em comparação com o grupo que teve a IA de MSU, não tratado. ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Dunnet para cada tempo analisado. 30

Figura 2 . Efeitos da estefalagina no edema de camundongos com gota induzida. A) Edema articular (paquímetro); B) Edema articular (pletismômetro) medidos em diferentes tempos após a injeção de IA MSU. N = 7 por grupo. Cada coluna representa a média \pm SEM. ANOVA de uma via seguida pelo pós- teste de Dunnet para cada tempo analisado..... 31

Figura 3. Efeito da estefalagina na atividade da enzima MPO. Amostras obtidas da homogeneização da articulação do tornozelo para análise da atividade da MPO coletadas 2 h após a injeção IA de MSU (100 μ g / articulação). N = 7 por grupo. Cada coluna representa a média \pm SEM. #### p <0,001 representam diferenças significativas em comparação com o grupo naive; * p <0,05 representam diferenças significativas em comparação com o grupo que recebeu apenas MSU. ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Bonferroni. 32

Figura 4 Efeito da estefalagina na produção da citocina pró-inflamatória IL-1 β . As amostras obtidas do lavado sinovial da articulação do joelho dos camundongos e foram coletadas 2 h após a injeção IA de MSU. N = 7 por grupo. Cada coluna representa a média \pm SEM. #### p <0,001 representam diferenças significativas em comparação com o grupo naive. A análise estatística foi realizada usando a análise de variância ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparação múltipla de Dunnet 33

Figura 5 Avaliação do efeito anti-hiperuricêmico da estefalagina. N = 3 por grupo. Cada coluna representa a média \pm SEM. ## p <0,01 representa diferenças significativas em comparação com o grupo estefalagina; * p <0,05 representa diferenças significativas em comparação com o grupo que recebeu apenas ácido oxônico e ° p <0,05 representa diferenças significativas em comparação com o grupo naive.. A análise estatística foi realizada usando a análise de variância ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparação múltipla de Dunnet. 34

Figura 6 Avaliação da inibição da enzima xantina oxidase pela estefalagina. N = 11 por grupo. Cada coluna representa a média \pm SEM; ** p <0,01 representa diferenças significativas em comparação com o veículo. ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Bonferroni. 35

Figura 7. Resultados dos parâmetros sanguíneos. A) AST (asparatato aminotransferase), B) ALT (alanina aminotransferase), C) uréia e D) creatinina. As amostras foram comparadas entre si pelo teste t (e testes não paramétricos) considerando $p < 0,05$. Não houve diferenças significativas entre os grupos..... 35

Lista de abreviaturas e siglas

ALT–Alanina aminotransferase

AST–Aspartato aminotransferase

CEUA– Comitê de Ética na Utilização de Animais

HE– Hematoxilina-Eosina

HTAB– Tampão acetato e brometo de hexadeciltrimetilamonio

IA– Intra-articular

IASP– Associação Internacional para o Estudo da Dor

IL– 1 β - Interleucina 1 beta

IL-6– Interleucina 6

IL-8– Interleucina 8

MPO– Mieloperoxidase

MSU– Cristais de urato monossódico

PBS– Tampão fosfato-salino

PBS-EDTA– Tampão fosfato-salino e ácido etilenodiamino tetra-acético

REBIR/UFU– Rede de Biotérios da Universidade Federal de Uberlândia

TFG– Taxa de filtração glomerular

TMB– Tetrametilbenzidina

TRPA1– Canal do receptor de potencial transitório A1

TRPs– Receptores de potencial transitório

TRPV1– Canal do receptor de potencial transitório V1

UFU– Universidade Federal de Uberlândia

Sumário

1. Introdução	15
1.1 Artrite gotosa	15
1.2 Tratamentos	17
1.3 Produtos naturais.....	20
2. Objetivos	22
2.1 Objetivo geral	22
2.2 Objetivos específicos	22
3. Metodologia	23
3.1 Animais	23
3.2 Indução do modelo de ataque agudo de gota e tratamento.....	23
3.3 Parâmetros nociceptivos	23
3.3.1 Hiperalgisia mecânica.....	23
3.3.2 Nocicepção espontânea.....	24
3.3.3. Sensibilidade térmica ao frio.....	25
3.4 Parâmetros inflamatórios	25
3.4.1 Edema	25
3.4.2 Atividade da enzima mieloperoxidase	26
3.4.3 Citocina pró-inflamatória IL-1 β	26
3.5 Avaliação do efeito anti-hiperuricêmico da estefalagina.....	26
3.5.1.Indução da hiperuricemia por inibição da uricase	26
3.5.2 Atividade da xantina oxidase.....	27
3.6 Avaliação de possíveis efeitos colaterais	27
3.6.1 Análises toxicológicas	28
3.6.2. Toxicidade	28
3.7 Análises estatísticas	28
4. Resultados	29

4.1 Efeitos antinociceptivos da estefalagina.....	29
4.2 Efeitos anti-inflamatórios da estefalagina.....	30
4.2.1 Edema	30
4.2.2 Atividade da enzima mieloperoxidase.....	31
4.2.3 Citocina pró-inflamatória IL-1 β	32
4.3 Avaliação do efeito anti-hiperuricêmico da estefalagina.....	33
4.3.2 Avaliação da atividade da enzima xantina oxidase	34
4.4 Avaliação de possíveis efeitos colaterais.....	35
4.4.1 Análises toxicológicas	35
4.3.2 Toxicidade	36
5. Discussão	36
6. Conclusão.....	40
Referências	41

1. Introdução

1.1 Artrite gotosa

A artrite gotosa ou simplesmente gota, é uma artrite inflamatória desencadeada pelo acúmulo e cristalização do ácido úrico nas articulações. A doença pode apresentar quatro estágios, sendo o primeiro a hiperuricemia assintomática, em que o paciente apresenta níveis de ácido úrico acima do normal no sangue, no entanto, não há nenhum tipo de sintoma. A 2ª fase é caracterizada pelos ataques agudos, nos quais os pacientes apresentam picos de dor nas articulações, principalmente durante a noite. A 3ª fase é o período intercrítico, período que caracteriza os períodos entre os ataques agudos, não há apresentação de sintomas e a duração dessa fase pode ser variável. A 4ª e a última fase é a crônica, que caracteriza-se pelo desenvolvimento de estruturas rígidas de ácido úrico denominadas tofos, o que pode levar a dificuldade de movimentação das articulações, dor intensa, perda função e até mutilações dos membros afetados (MANDELL, 2008).

A gota é a artrite inflamatória mais comum entre os adultos (XIA et al., 2019). O principal fator de risco para o desenvolvimento da doença é o aumento dos níveis de ácido úrico no sangue, ou seja, a hiperuricemia. Bioquimicamente, a hiperuricemia se refere a concentrações séricas ou plasmáticas de urato monossódico superiores a 6,8 mg / dL, pois esse é o limite de solubidade do urato no sangue (LOEB, 1972). Fatores como a alta ingestão de comidas ricas em purinas ou de alimentos que podem levar ao aumento dos níveis de purina, uma vez que o ácido úrico é o metabólito final do metabolismo de purinas; condições médicas como doença renal crônica, síndromes metabólicas e diuréticas podem favorecer o aumento dos níveis de ácido úrico (DALBERTH et al., 2019).

Outros fatores de risco associados ao desenvolvimento da artrite gotosa é o sexo e a idade do indivíduo. Uma pesquisa realizada nos Estados Unidos demonstrou que homens são mais predispostos a adquirir a doença do que mulheres: a prevalência da gota em homens foi de 5,2% (5.9 milhões) enquanto

que em mulheres foi de 2,7% (3.3 milhões) (CHEN-XU et al., 2019). O desenvolvimento da gota é mais comum em mulheres após a menopausa e o risco de ter a doença é menor quando há a terapia de reposição hormonal nestas mulheres (HAK et al., 2010).

A artrite gotosa pode apresentar sintomas moleculares e clínicos. Em relação aos sintomas moleculares, o principal marcador molecular da artrite gotosa é a citocina pró-inflamatória interleucina 1 beta (IL-1 β), pois está amplamente envolvida no processo inflamatório agudo da doença. Essa citocina é produzida por macrófagos, monócitos e neutrófilos, ou seja, células imunes inatas, e pode atuar em seus alvos por meio do complexo do receptor IL-1 (PALOMO et al., 2015).

Os sintomas clínicos podem ser divididos em manifestações clínicas agudas e manifestações clínicas persistentes (PEREZ-RUIZ et al., 2014). As manifestações clínicas parecem estar ligadas com o nível de hiperuricemia e o tempo em que o paciente é exposto a esse estado de altos níveis de ácido úrico (CAMPION; GLYNN; DELABRY, 1987). A principal característica aguda clínica da gota é a cristalização do ácido úrico nas articulações distais, nos membros inferiores, principalmente na articulação metatarsofalângica, entretanto, em pacientes portadores da doença há longo prazo podem apresentar a cristalização do ácido úrico em articulações centrais e até em articulações do esqueleto axial (PEREZ-RUIZ et al., 2014). Além desses fatores, os pacientes com gota apresentam sinais clássicos de inflamação na região afetada, como: dor (sendo o início em períodos noturnos e pico nas primeiras 12 a 24 horas), edema, distúrbio de função e vermelhidão local (eritema) (ZYCHOWICZ; POPE; GRASER, 2010).

As manifestações clínicas persistentes dizem respeito ao estágio crônico da gota e a principal característica dessa fase é a formação de uma estrutura rígida denominada tofo, que pode ser definida como um agregado macroscópico de cristais de urato monossódico. Normalmente, essa estrutura é desenvolvida em pacientes que ficam longos períodos sem tratar a doença, no entanto, há casos não comuns em que o tofo aparece como a primeira manifestação clínica (WERNICK; WINKLER; CAMPBELL, 1992).

Em suma, vê-se que pacientes portadores da gota sofrem com fortes

dores e processos inflamatórios, o que causa muito desconforto e até debilidade. Há uma grande dificuldade em relação a adesão ao tratamento, pois pacientes com essa artrite inflamatória normalmente apresentam algumas comorbidades que também estão relacionadas com a hiperuricemia e isso acaba limitando muito o uso dos medicamentos disponíveis atualmente. Além disso, os medicamentos mais utilizados também podem apresentar um alto risco de toxicidade e/ou alergias (WILSON; SASEEN, 2016).

1.2 Tratamentos

Os tratamentos disponíveis atualmente buscam, principalmente, amenizar o processo inflamatório e a dor durante a crise aguda. Alguns fármacos podem atuar diminuindo a concentração e/ou a produção de ácido úrico e outras classes de medicamentos atuam ajudando os rins a eliminarem o excesso de ácido úrico. Medidas não farmacológicas também são importantes para o tratamento da doença, como a mudança do estilo de vida do paciente, diminuindo o consumo de alimentos ricos em purinas (carnes vermelhas, crustáceos) e a ingestão de bebidas alcoólicas (DALBERTH et al., 2019).

O medicamento mais utilizado no tratamento da artrite gotosa é a colchicina. A colchicina é um alcaloide extraído da planta *Colchicum autumnale* e seu mecanismo de ação é atuar sobre dímeros de tubulina, impedindo a polimerização de microtúbulos ligando a suas subunidades proteicas e impedindo a aglomeração de leucócitos. Isso dificulta a diapedese e, conseqüentemente, atrapalha a função dos leucócitos, impedindo a mobilização, granulação lipossômica e quimiotaxia (SCHLESINGER, 2004). Considerando que o neutrófilo é a principal célula encontrada no fluido sinovial de indivíduos com gota, e o principal responsável pela liberação de IL-1 β , a interferência na sua quimiotaxia tem efeitos benéficos significativos na gota (PALOMO et al, 2015). Esse fármaco se encontra disponível na forma de uso oral e intravenoso, contudo, há relatos de diversas reações sistêmicas sérias com o uso via intravenoso, como supressão da medula óssea, insuficiência renal, alopecia, coagulação intravascular disseminada, necrose hepática, diarreia, convulsões e até morte (WALLACE; SINGER, 1998). Além disso, outra problemática

associada ao uso da colchicina é a toxicidade, pois a diferença entre a dose terapêutica e a dose tóxica é muito pequena, além de ter uma longa meia-vida (20 a 30 horas) o que a torna contra- indicada a pacientes com insuficiência renal e hepática, devido a maior chance de acumulação e toxicidade (SCHLESINGER, 2012).

O alopurinol e o febuxostat são medicamentos inibidores da enzima xantina oxidase, diminuindo assim a concentração sérica de ácido úrico. A enzima xantina oxidase está envolvida na via de catabolismo das purinas, sendo responsável pela conversão da xantina em ácido úrico, portanto, com a inibição dessa enzima, há uma menor produção de ácido úrico. A maior problemática relacionada com o uso do alopurinol é a síndrome de hipersensibilidade ao alopurinol, principalmente em

pacientes com doença crônica nos rins (NARANG; DALBETH 2018), sendo que essa hipersensibilidade pode ocorrer em cerca de 10% dos usuários, dentre estes, 20% pode vir a morte (RIVAS-GONZÁLES et al, 2001). O febuxostat possui um alto custo financeiro, além de, em alguns casos, se mostrar ineficaz para diminuir os níveis de urato até 6,8 mg / dL (CRITTENDEN; PILLINGER, 2013).

Outra classe de medicamentos bastante utilizada é a dos anti-inflamatórios não estoidais (AINEs), usados para controlar a inflamação e para analgesia. O mecanismo de ação deles tem como alvo a inibição da atividade de subtipos de enzimas da ciclo- oxigenase (COX), o que impede a síntese de eicosanoides pela via do ácido araquidônico, diminuindo então a liberação de mediadores químicos de inflamação e dor, como as prostaglandinas e os tromboxanos (KHANAPURE et al, 2007). Alguns exemplos dessa classe são: ácido acetilsalicílico, ibuprofeno e naproxeno. O uso desses medicamentos deve ser cauteloso, pois sabe-se que o uso crônico pode levar a quadros de nefropatia, insuficiência renal e até a níveis irreversíveis de nefrotoxicidade, além disso, o efeito adverso mais comum é a toxicidade ao sistema gastrointestinal, como úlceras gástricas e hemorragias (SULEYMAN; DEMIRCAN; KARAGOZ, 2007). Esses medicamentos também são contraindicados a pacientes com insuficiência renal e hepática, úlcera péptica, gastrite e hipertensão, que são condições comuns em pacientes com gota, como veremos mais a frente (SCHLESINGER,

2012).

O glicocorticóides são indicados no uso do tratamento da gota em casos de intolerância ou contra-indicações em relação aos AINEs ou a colchicina. Eles são análogos ao hormônio humano cortisol e agem sobre receptores intranucleares regulando a transcrição gênica, principalmente do gene ligado as ciclo-oxigenases, produzindo um efeito similar ao dos AINEs, diminuindo a dor e a inflamação nos pacientes. No entanto, eles também agem diminuindo a síntese das colagenases, que são enzimas que auxiliam o sistema imune, destruindo estruturas extracelulares na patogênese de bactérias. Portanto, causam imunossupressão nos pacientes que os utilizam, os deixando suscetíveis a infecções (GARNNER; WANG; YAMAMOTO, 2015).

A pegloticase é uma forma recombinante da enzima uricase, a qual converte o ácido úrico em alantoína, sendo esse último composto mais fácil de ser eliminado pela urina, por ser muito solúvel. Esse tratamento é utilizado em casos de pacientes que não são tolerantes aos outros medicamentos disponíveis ou que possuem quadros severos de gota. A pegloticase consegue reduzir profundamente os níveis séricos de urato monossódico, dissolver os tofos e melhorar a dor, no entanto, está associada com um aumento das crises de gota a curto prazo (SUNDY et al, 2011). Como efeitos adversos, a pegloticase está associada a reações infusionais devido a via de administração, que é endovenosa, o que também requer a ida do paciente a unidades de saúde para receber o tratamento, dificultando a adesão (SUNDY et al., 2011; BECKER et al., 2013).

É extremamente comum em pacientes gotosos a presença de comorbidades, ou seja, a presença simultânea de outras doenças com a gota. Normalmente, a presença dessas comorbidades está relacionada com a hiperuricemia, que como dito anteriormente, é o principal fator de risco para o desenvolvimento da artrite gotosa. As comorbidades mais comuns são: hipertensão, que acomete cerca de 73,9% dos indivíduos com gota; doença crônica dos rins, presente em 71,1% dos pacientes e obesidade, em aproximadamente 53% dos casos (SUMPTER et al., 2020). Existem outras comorbidades que aparecem em menor porcentagem, mas ainda de forma bem significativa, como: diabetes (25,7%), nefrolitíase (23,8%), infarto do miocárdio

(14,4%) e insuficiência cardíaca (11,2%) (SUMPTER et al., 2020). A presença dessas doenças concomitantemente dificulta muito o tratamento da artrite gotosa, pois a maioria dos medicamentos, como descrito acima, possui contraindicações a portadores dessas comorbidades.

Portanto, após essa descrição dos tratamentos disponíveis, observamos que, apesar da disponibilidade de terapias clínicas, elas tem baixa aderência devido aos efeitos adversos, então a busca de novos tratamentos, mais eficazes e seguros, ainda se fez necessária. Nesse contexto, produtos naturais vem sendo utilizados para o tratamento de diferentes doenças, inclusive para artrites.

1.3 Produtos naturais

O Brasil possui uma ampla biodiversidade no que diz respeito a fauna e flora, sendo uma das maiores do mundo, detendo cerca de 20% de todas as espécies do reino vegetal do planeta, muitas delas com grande potencial farmacêutico (DUTRA, 2009). Os produtos naturais são usados popularmente como tratamentos para diversas doenças desde os primórdios da civilização. É uma fonte muito importante de descobertas de novos fármacos em potencial, sendo que, cerca de 25 a 30% de todas as drogas disponíveis no mercado são provenientes dessas plantas medicinais (NEWMAN; CRAGG, 2007).

Diversas plantas já são usadas popularmente para o tratamento de artrites, sendo elas: *Arnica montana*, conhecida popularmente como arnica; *Curcuma longa L.*, ou açafrão da terra e a *Pterodon spp*, mais conhecida por sucupira branca, são exemplos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015; LESSA; CAVALCANTI; FIGUEIREDO,

2016). Essas plantas tiveram sua eficácia comprovada em estudos científicos e seus princípios ativos descobertos. A arnica, por exemplo, possui atividade anti-inflamatória e cicatrizante, seu derivado principal é o Helanalin, sendo que este composto demonstrou diversas atividades biológicas como efeitos anti-inflamatórios, antibióticos e analgesia (ARNILLAS, 2015). Já a sucupira branca é utilizada em forma de extrato de sua casca e sua ação farmacológica é atribuída a presença do composto beta- cariofileno (BAVARESCO et al, 2016), tendo como alvo as enzimas COX, bloqueando a

cadeia inflamatória, reduzindo assim o processo inflamatório e a dor (FUKAHORI, 2017).

Um dos compostos mais estudados no campo de produtos naturais, são os alcaloides. Os alcaloides são compostos extraídos de folhas, flores e frutos das plantas e são conhecidos por possuírem diversas atividades biológicas como vasodilatação, ação anti-hipertensiva e ação antinociceptiva (TENG et al., 1991; TSAI; WANG; LIN, 2008; MONTRUCCHIO et al., 2012). Um exemplo clássico é a morfina, possivelmente é o alcaloide mais conhecido com efeito analgésico. A morfina foi extraída de uma planta chamada *Papaver somniferum*, conhecida popularmente como papoula do oriente. Seu mecanismo de ação envolve a ativação de receptores opioides do tipo mu, que são amplamente expressos no sistema nervoso central humano. Os receptores opióides tem uma importante função na regulação da nocicepção e eles resultam na modulação de neurotransmissores (opióides endógenos), como as endorfinas e as encefalinas (TRESCOT et al., 2008). Portanto, a morfina tem a capacidade de mimetizar a função desses opióides endógenos. Outro exemplo de alcalóide que deve ser citado é a colchicina, como já descrito a cima, é utilizada para o tratamento da artrite gotosa e foi previamente isolada da planta *Colchicum autumnale* (RICHETE; BARDIN, 2010).

Estudos com alcaloides aporfínicos demonstraram que eles possuem um grande potencial antinociceptivo e anti-inflamatório, como observado por Montrucchio, Córdova e Soares (2013) com o alcaloide aporfínico s-(+)-*dicentrina* em modelos de dor inflamatória. Neste sentido ainda, nosso grupo de pesquisa demonstrou recentemente, que um alcalóide denominado estefalagina possui atividade antinociceptiva por modulação de canais de potencial transitório TRPA1 e TRPV1 em camundongos (JUSTINO et al., 2020).

A estefalagina é um alcaloide aporfínico isolado da casca do fruto da *Annona crassiflora* Mart., conhecido popularmente como araticum (JUSTINO et al, 2016). Esse fruto pertence à família *Annonaceae* e é amplamente distribuído no cerrado brasileiro, principalmente nos estados da Bahia, Minas Gerais, São Paulo, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Goiás e Tocantins. Os extratos de diferentes partes da *A. crassiflora*, como de sementes e da casca, já foram testados e demonstraram efeitos bioativos como antiparasitário, antibacteriano,

antioxidante e antimutagênico (DE SOUZA et al., 2012; JUSTINO et al., 2016; LIAW et al., 2016). Além disso, Justino e colaboradores (2019) mostraram que uma fração enriquecida em polifenol extraída dessa planta apresentou uma grande atividade anti-inflamatória em modelos de dores inflamatórias agudas e crônicas. Contudo, o possível efeito antinociceptivo e anti-inflamatório do alcaloide estefalagina não foi explorado em outros modelos de dor.

Portanto, esse trabalho visou avaliar o potencial antinociceptivo e anti-inflamatório da estefalagina, como forma de identificar um tratamento alternativo para a gota, tendo em vista que os tratamentos atuais são bem limitados devido às contraindicações.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste estudo foi verificar o potencial antinociceptivo e anti-inflamatório do alcaloide aporfínico estefalagina, isolado a partir da casca do fruto da *Annona crassiflora* Mart., em um modelo de gota em camundongos.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o potencial antinociceptivo da estefalagina em testes de nocicepção mecânica, térmica e espontânea.
- Verificar o potencial anti-inflamatório da estefalagina através da atividade da enzima mieloperoxidase, infiltração leucocitária, presença de edema e produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β).
- Avaliar o possível efeito protetor da estefalagina em reduzir os níveis de ácido úrico.
- Analisar os possíveis efeitos adversos e toxicidade causados pela estefalagina.

3. Metodologia

3.1 Animais

Todos os animais utilizados nesse trabalho foram aprovados em projeto submetido ao Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), sob o projeto de número 018/17. Os animais usados foram provenientes da Rede de Biotérios da Universidade Federal de Uberlândia (REBIR/UFU), machos da linhagem C57BL6/J/UFU, entre seis e oito semanas de idade, pesando entre 20 a 25 g. Eles foram mantidos no biotério central da universidade sob condições controladas de temperatura (23-25 ° C) e luminosidade (ciclo 12 h claro / escuro) e tiveram livre acesso a água e a comida. Os experimentos foram conduzidos de acordo com os padrões do CEUA/UFU e foram seguidas as recomendações da Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP). Todos os animais foram mantidos nas salas de experimentação pelo período de uma hora, durante três dias consecutivos, para ambientação, incluindo o dia do experimento.

3.2 Indução do modelo de ataque agudo de gota e tratamento

Foi utilizado um modelo de ataque agudo de gota induzido por injeção intra-articular (IA) de cristais de urato monossódico (MSU) na concentração de 100 µg / articulação, em um volume final de 10 µL. O MSU foi solubilizado no tampão fosfato-salino (PBS) esterilizado (SILVA et al., 2016). Os grupos tratados receberam a estefalagina uma vez, sempre uma hora antes da aplicação do MSU, na dose de 1 mg/kg por via oral (gavagem), conforme Justino e colaboradores, 2020. Os animais controle receberam veículo (salina) por via oral, uma vez, sempre uma hora antes da aplicação do MSU. Os animais foram anestesiados com isoflurano 2%, 100% O₂ 1 L/min para a administração das injeções intra-articulares.

3.3 Parâmetros nociceptivos

3.3.1 Hiperalgisia mecânica

Os camundongos foram alocados individualmente em caixas de plástico transparente (9 x 7 x 11 cm) em uma plataforma elevada com um fundo gradeado que permite ao pesquisador ter acesso a região plantar da pata traseira dos animais. A sensibilidade mecânica foi analisada com a ajuda de filamentos de Von Frey (0.008-1,4 g), em que um estímulo foi realizado na pata referente a articulação em que o MSU foi aplicado (ipsilateral). O método up- and-down descrito por Chaplan e colaboradores (1994) foi utilizado. Foi usado primeiro um filamento intermediário (0.4 g), se o animal respondeu ao estímulo, um estímulo de menor intensidade foi feito (0.16 g), se não houve resposta, um estímulo maior intensidade foi realizado (0.6 g) e assim por diante até a determinação do menor filamento possível em que houve a resposta de retirada de pata do animal (limiar de retirada de pata). O limiar de retirada de pata foi expresso em mg/log (CUNHA et al., 2004).

3.3.2 Nocicepção espontânea

Para avaliar a nocicepção espontânea, em todos os tempos observados, antes da medida da sensibilidade mecânica, os animais foram classificados de acordo com a distribuição de peso corporal na pata correspondente a articulação em o que MSU foi injetado, seguindo uma escala de nocicepção sem a necessidade de um estímulo, ou seja, espontânea. A escala varia de 0 a 3, de acordo com Coderre e Wall (1987) e adaptações de Silva et al., (2016). A avaliação da nocicepção espontânea foi realizada considerando quatro estágios: 0 para quando a pata do animal estivesse apoiada normalmente, 1 para quando a pata estivesse levemente erguida, mas ainda apoiada a grade, 2 para quando a pata estivesse apoiada lateralmente e 3 para quando o animal estivesse com a pata completamente erguida, sem tocar a grade.

Adicionalmente a utilização da escala visual, outra forma de avaliação da nocicepção espontânea em camundongos que utilizamos foi o *burrowing*, que é um comportamento normal dos animais em que eles fazem tocas cavando. Porém, quando os camundongos estão sob efeito de estresse ou dor, esse comportamento é bastante reduzido. Conforme descrito por Deacon (2016), foi

utilizado um aparato denominado *burrow*: um cano de 20 cm de comprimento, com uma extremidade fechada e outra aberta suspensa a 3 cm do solo, contendo 200 g de *pellet* de ração dentro. Os camundongos foram previamente treinados a utilizar o aparato e os que não desenvolveram o comportamento de cavar foram eliminados do teste. O grupo que recebeu a estefalagina foi tratado uma hora antes da aplicação do MSU. Três horas após aplicação do MSU, os camundongos foram alocados individualmente em gaiolas com um *burrow* e ali permaneceram por duas horas para realizar o comportamento de cavar. Depois de duas horas, foi pesado quanta ração foi retirada dos canos. Os 200 g de ração foram repostos e o experimento continuou *overnight*. No dia seguinte, novamente foi pesada a ração do lado de fora do *burrow*. O comportamento de *burrowing* foi comparado entre os grupos naive, animais que receberam veículo por via oral e MSU, e animais tratados com estefalagina (1mg/kg, vo) mais MSU.

3.3.3. Sensibilidade térmica ao frio

A sensibilidade térmica foi avaliada contra um estímulo frio usando acetona (20 μ L) aplicada topicamente no centro da região plantar da pata do animal com o auxílio de uma pipeta. As respostas foram classificadas de acordo com uma escala de quatro estágios, em que 0 representa sem resposta, 1 retirada rápida ou leves batidas de pata, 2 retirada de pata rápida com pouca lambida, 3 retiradas prolongadas e muita lambida. A acetona foi aplicada três vezes e a soma dos *scores* foi o resultado final (ZHENG; XIAO; BENNETT, 2012).

3.4 Parâmetros inflamatórios

3.4.1 Edema

Como um parâmetro inflamatório foi avaliado o edema de articulação por meio de duas metodologias: 1) foi 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., (2016). 2) também foi medido o volume de água deslocada pela introdução da articulação dos camundongos com o auxílio de um

pletismômetro.

3.4.2 Atividade da enzima mieloperoxidase

A atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) foi avaliada usando todo o tecido articular, conforme Rossato et al., 2019. Duas horas após a aplicação do MSU, as articulações foram coletadas e colocadas em microtubos contendo

300 µL de tampão acetato + brometo de hexadeciltrimetilamonio (HTAB). Essas amostras foram homogeneizadas com o auxílio de um equipamento chamado *Polytron*. Depois da homogeneização completa do tecido, as amostras foram centrifugadas a 11000 g por 30 minutos a 4 ° C e o sobrenadante foi coletado. A dosagem da proteína foi feita usando o kit BCA. Para mensurar a atividade da enzima MPO, 10 µL do sobrenadante diluído 1:10 em tetrametilbenzidina (TMB) foi incubado em uma placa de 96 poços por 5 minutos por 37 ° C, depois foi realizada uma leitura a 630 nm. Os resultados foram expressos como OD/mg de proteína.

3.4.3 Citocina pró-inflamatória IL-1β

Para a obtenção do lavado sinovial, foram realizados 3 lavados de 10 µL de tampão fosfato-salino e ácido etilenodiamino tetra-acético (PBS-EDTA) na articulação dos joelhos dos camundongos com o auxílio de uma pipeta, 2 horas após a injeção do MSU. Depois, as amostras foram centrifugadas a 800 g, a uma temperatura de 4 °C, por 8 minutos para remover o resíduos de células. O sobrenadante foi coletado e ressuscitado em 20 µL de PBS-EDTA para dosagem da citocina IL-1β. Para medir os níveis de IL-1β, foi utilizado o *Kit Duo Set* para realizar o *ELISA* de acordo com as instruções do fabricante (*R&D Systems, Minneapolis, MN, USA*). As concentrações foram expressas em pg/mL.

3.5 Avaliação do efeito anti-hiperuricêmico da estefalagina

3.5.1. Indução da hiperuricemia por inibição da uricase

Para avaliar um possível efeito anti-hiperuricêmico da estefalagina, foi utilizado um modelo animal de hiperuricemia induzida pelo inibidor da enzima uricase, o ácido oxônico, conforme Sato et al., 2020 e Silva et al, 2013, com modificações. Os camundongos foram divididos em 4 grupos (6 por grupo). O grupo 1 não recebeu tratamento, apenas água por via oral. Os grupos 2, 3 e 4 foram induzidos a hiperuricemia por administração intraperitoneal de ácido oxônico (250 mg/kg), sendo que o grupo 2 foi tratado previamente (1 hora antes) com a estefalagina na concentração de 1 mg/kg e o grupo 3 com alopurinol (5 mg/kg), utilizado como um controle positivo. Portanto, o grupo 4 recebeu apenas o ácido oxônico. Duas horas após a administração da droga, as amostras de sangue foram coletadas por punção da aorta abdominal, sangue foi colocado em um microtubo até a completa coagulação e, posteriormente, foi centrifugado a 2000 g por 10 minutos a 25 ° C para a obtenção do soro. As amostras de soro foram alocadas em caixas isotérmicas e imediatamente levadas para o laboratório de análises clínicas do hospital veterinário da Universidade Federal de Uberlândia. O ácido úrico foi dosado utilizando um analisador automatizado (*Cobas Mira; Roche Diagnostic Systems, Basel, Switzerland*) e os kits comerciais biológicos (*Labtest Diagnostic; Lagoa Santa, Brasil*).

3.5.2 Atividade da xantina oxidase

A atividade da enzima xantina oxidase foi determinada de acordo com Fischer et al. (2018). A enzima xantina oxidase (0,5 U / mL) foi incubada por 30 minutos a 37 °C com seu substrato pterina (20 µM) e a estefalagina (0,01 - 1 µg / mL), alopurinol (10 µg / mL; controle positivo) ou veículo (tampão de acetato de sódio 0,1 M, pH 5,5). A seguir, a reação foi fervida por 3 minutos e centrifugada por 10 minutos (10.000 g, temperatura ambiente). O sobrenadante foi diluído (1: 2) em tampão de acetato de sódio (0,1 M, pH 5,5). A atividade da xantina oxidase foi avaliada usando um espectrofluorômetro [*SpectraMAX i3 (Molecular Devices Sunnyvale, CA)*], e a fluorescência foi monitorada com excitação de 345 nm e emissão de 405 nm.

3.6 Avaliação de possíveis efeitos colaterais

3.6.1 Análises toxicológicas

Amostras de sangue foram coletadas por punção da aorta abdominal de animais tratados com estefalagina (1 mg/kg) 6 horas após a administração e de animais *naïves*. O sangue foi colocado em um microtubo até a completa coagulação e, posteriormente, foi centrifugado a 2000 g por 10 minutos a 25 ° C para a obtenção do soro. As amostras de soro foram alocadas em caixas isotérmicas e imediatamente levadas para o laboratório de análises clínicas do hospital veterinário da Universidade Federal de Uberlândia. A concentração de hemoglobinas foi analisada no soro e concentrações menores de 45 mg / dL foram consideradas adequadas para as análises bioquímicas das enzimas aspartato aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) e os metabólitos ureia e creatinina. Todos os protocolos foram realizados usando um analisador automatizado (*Cobas Mira; Roche Diagnostic Systems, Basel, Switzerland*) e os kits comerciais biológicos (*Labtest Diagnostic; Lagoa Santa, Brasil*).

3.6.2. Toxicidade

Para avaliar uma possível toxicidade aguda e crônica da estefalagina, ela foi administrada por via oral (via gavagem) e os camundongos foram monitorados diariamente por 7 dias, de acordo com Yin et al. (2016). Foram observados parâmetros como anormalidades na dieta, peso corporal, alterações nos pelos, nas fezes, no comportamento e na anatomia macroscópica dos camundongos.

3.7 Análises estatísticas

As diferenças entre três ou mais grupos em um ponto foram analisadas pela análise de variância unidirecional (ANOVA), seguido pelo pós-teste de *Newman-Keuls* ou *Dunnett*. As diferenças entre três ou mais grupos em diferentes momentos foram analisadas pela ANOVA de duas vias seguido pelo

pós-teste de *Bonferroni*. A análise estatística foi realizada usando o *GraphPad Software 5.0* (*GraphPad Software, San Diego, CA, EUA*). Valores de *p* menores que 0,05 foram considerados significativos. Para atender às premissas da ANOVA, os dados de hiperalgesia mecânica foram transformados em log antes da análise estatística.

4. Resultados

4.1 Efeitos antinociceptivos da estefalagina

Pode-se observar na figura 1 que a injeção IA de MSU foi capaz de mimetizar o ataque agudo de gota nos animais, desenvolvendo intensa nocicepção (dor). Na figura 1A observa-se que o limiar de retirada de pata, ou seja, o menor filamento possível em que há resposta de retirada de pata dos camundongos, foi muito menor no grupo que recebeu apenas a injeção de MSU, nos três tempos observados. Já o grupo tratado com a estefalagina 1 h antes da aplicação do MSU, teve uma redução significativa na hiperalgesia mecânica quando comparado com o grupo MSU, portanto, demonstra-se que a estefalagina teve um efeito protetor no que diz respeito ao desenvolvimento da nocicepção mecânica. O grupo *naive*, como esperado, não apresentou alterações significativas no limiar de retirada de pata.

Na figura 1B podemos ver que, em 4 h houve uma alteração significativa no comportamento nociceptivo espontâneo dos animais que receberam apenas o MSU, quando comparado com o grupo *naive*. A estefalagina não foi capaz de reduzir significativamente a nocicepção espontânea dos camundongos, mas observa-se uma tendência de redução no escore apresentado. Na figura 1C pode-se visualizar que o grupo que recebeu apenas MSU teve a nocicepção térmica ao frio aumentada significativamente quando comparado com o grupo *naive* em 2 h. Já nos outros tempos medidos, não houve diferenças significativas entre os grupos, apenas em 6 h vemos uma tendência de redução da nocicepção térmica do grupo tratado com a estefalagina.

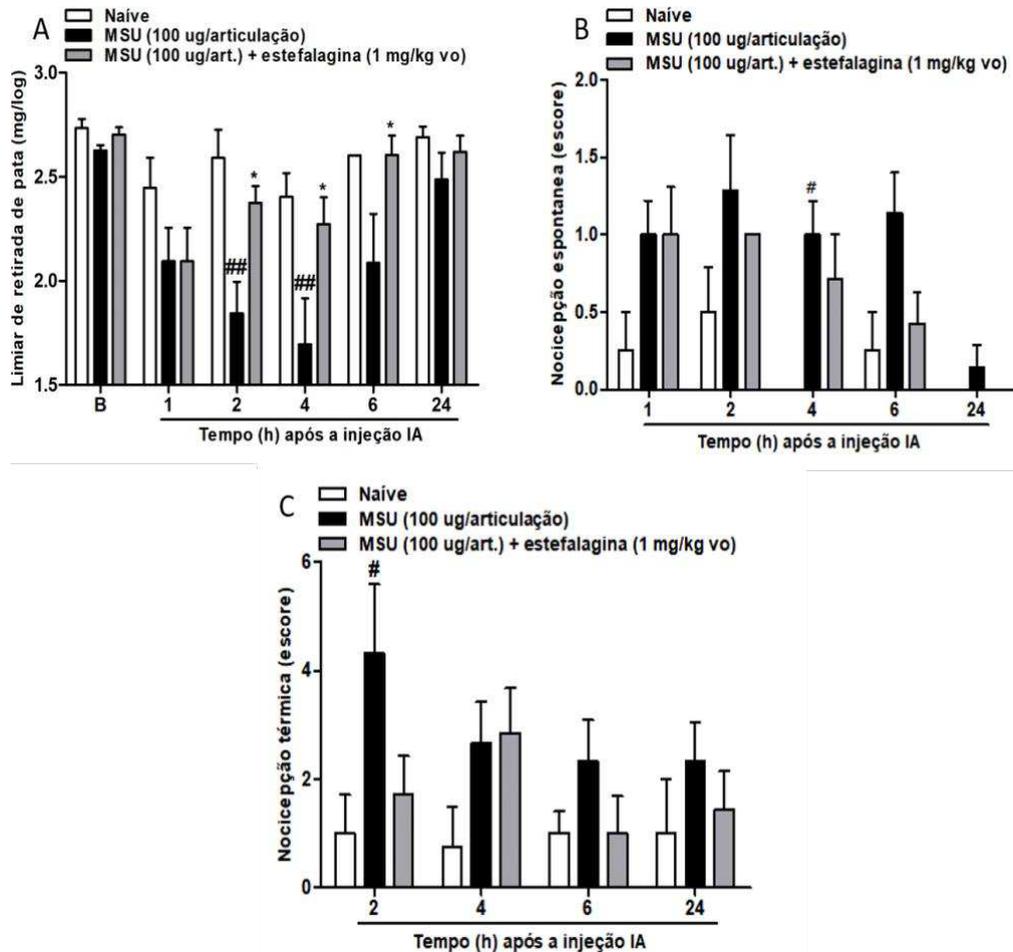


Figura 1 Efeito antinociceptivo da estefalagina sobre o ataque agudo de gota induzido por MSU em camundongos. A) Hiperalgesia mecânica, B) Nocicepção espontânea, e C) Sensibilidade térmica ao frio, medidas em diferentes tempos após a injeção IA de MSU. N = 7 por grupo. Cada coluna representa a média ± SEM. #p <0,05 e ## p <0,01 representam diferenças significativas em comparação com o grupo naive; * p <0,05, e *** p <0,001 representam diferenças significativas em comparação com o grupo que teve a IA de MSU, não tratado. ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Dunnett para cada tempo analisado.

4.2 Efeitos anti-inflamatórios da estefalagina

4.2.1 Edema

Como já dito anteriormente, o edema da articulação dos camundongos foi medido de duas formas: com o auxílio de um paquímetro digital e com o equipamento pletismômetro. Na figura 2A, observa-se que não houve diferença entre os grupos analisados com o paquímetro, nem entre os tempos medidos. Já na figura 2B, apesar de não se observar uma diferença estatística entre os grupos, ve-se uma tendência da estefalagina em reduzir o edema na articulação

dos camundongos quando comparado com o grupo que recebeu apenas o MSU. O grupo naive, como esperado, praticamente não apresentou inchaço na articulação. Essa diferença entre as metodologias deve-se a sensibilidade de cada uma, sendo o pletismômetro muito mais sensível, pois consegue mensurar o nível de deslocamento de água com a pata e articulação inteira do animal imersa no aparato. O paquímetro, por sua vez, perde eficiência devido a pequena espessura dos membros dos camundongos, pequena área de contato, e a diferença entre um animal edemaciado e um normal ser mínima.

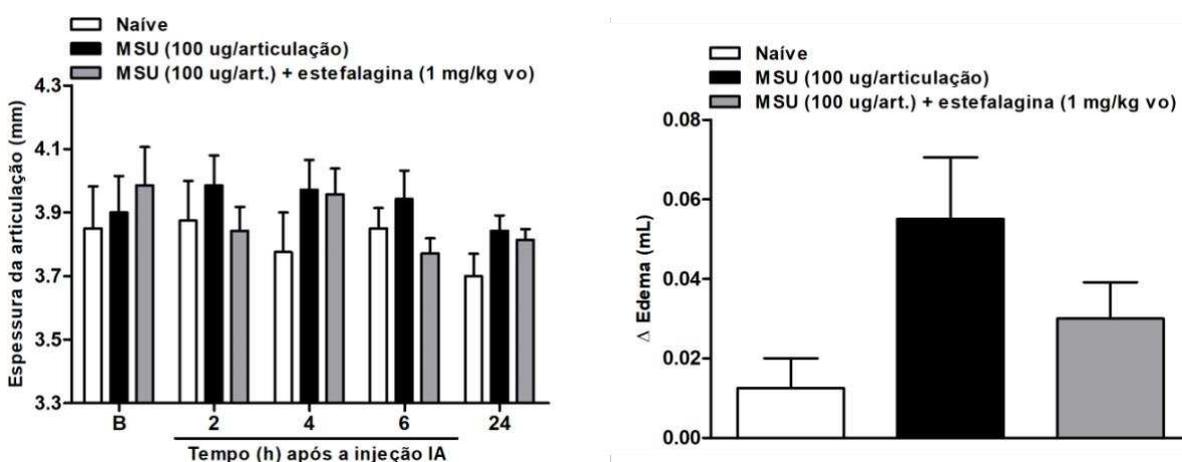


Figura 2 . Efeitos da estefalagina no edema de camundongos com gota induzida. A) Edema articular (paquímetro); B) Edema articular (pletismômetro) medidos em diferentes tempos após a injeção de IA MSU. N = 7 por grupo. Cada coluna representa a média \pm SEM. ANOVA de uma via seguida pelo pós- teste de Dunnet para cada tempo analisado.

4.2.2 Atividade da enzima mieloperoxidase

A enzima mieloperoxidase (MPO) é produzida por leucócitos, mais especificamente neutrófilos. Os neutrófilos são as primeiras células a migrarem para tecidos danificados e desencadear o processo de inflamação, portanto, a enzima MPO é um importante marcador de inflamação. Como podemos ver na figura 3, o grupo MSU não tratado apresentou uma alta atividade da enzima mieloperoxidase, enquanto que os animais que receberam MSU-IA e foram tratados com a estefalagina tiveram uma diminuição significativa da atividade dessa enzima. Já o grupo naive apresentou baixa atividade da MPO.

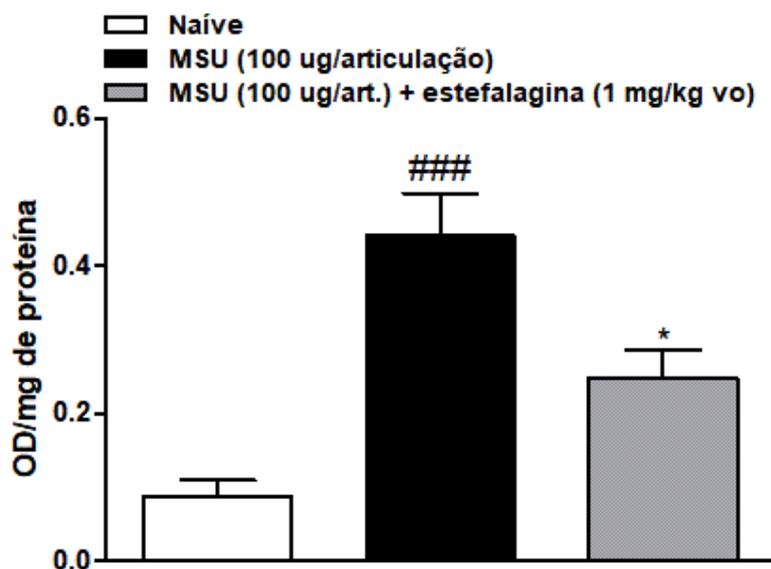


Figura 3. Efeito da estefalagina na atividade da enzima MPO. Amostras obtidas da homogeneização da articulação do tornozelo para análise da atividade da MPO coletadas 2 h após a injeção IA de MSU (100 µg / articulação). N = 7 por grupo. Cada coluna representa a média ± SEM. ### p <0,001 representam diferenças significativas em comparação com o grupo naive; * p <0,05 representam diferenças significativas em comparação com o grupo que recebeu apenas MSU. ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Bonferroni.

4.2.3 Citocina pró-inflamatória IL-1 β

A interleucina-1 beta (IL-1 β) é uma citocina que apresenta um importante papel na resposta inflamatória e também é envolvida em diversos processos celulares como proliferação celular, diferenciação e apoptose, sendo a citocina chave no processo inflamatório da artrite gotosa. Na figura 4, observamos uma tendência do grupo tratado com a estefalagina de reduzir a produção dessa citocina pró-inflamatória, quando comparado com o grupo que recebeu apenas o MSU.

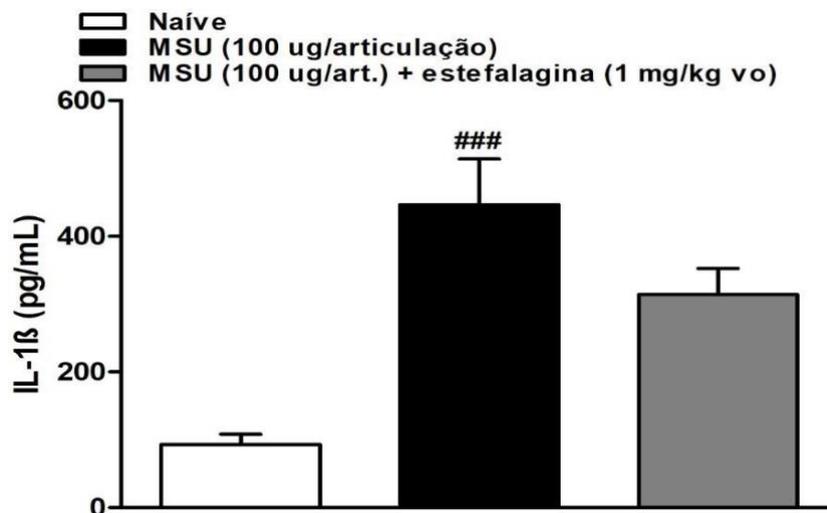


Figura 4 Efeito da estefalagina na produção da citocina pró-inflamatória IL-1 β . As amostras obtidas do lavado sinovial da articulação do joelho dos camundongos e foram coletadas 2 h após a injeção IA de MSU. N = 7 por grupo. Cada coluna representa a média \pm SEM. ### p <0,001 representam diferenças significativas em comparação com o grupo naive. A análise estatística foi realizada usando a análise de variância ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparação múltipla de Dunnet

4.3 Avaliação do efeito anti-hiperuricêmico da estefalagina

4.3.1 Indução de hiperuricemia pela inibição da uricase

A estelagina (1 mg/kg) não demonstrou ter seu mecanismo de ação associado com a redução das concentrações séricas de ácido úrico. Os níveis foram analisados em um modelo de hiperuricemia induzida por injeção de ácido oxônico (250 mg/kg), um inibidor da uricase, a enzima responsável por converter o ácido úrico em alantoina nos roedores. O medicamento allopurinol (5 mg/kg) foi utilizado como controle positivo e demonstrou ser efetivo, como esperado, para a redução do ácido úrico nos animais, visto que apresentou diferenças significativas quando comparado com os outros três grupos presentes no experimento.

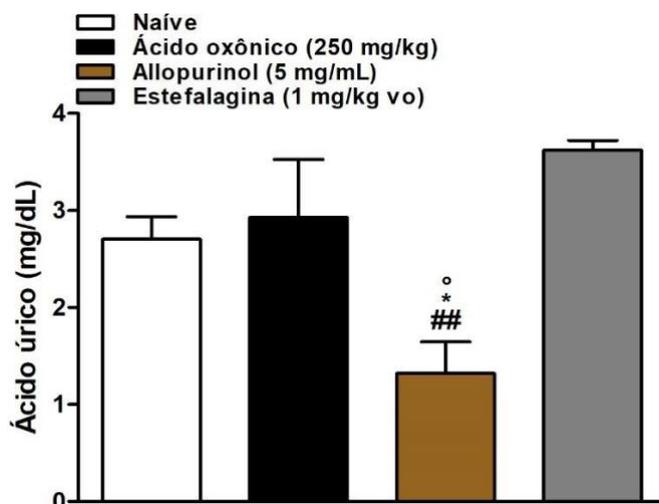


Figura 5 Avaliação do efeito anti-hiperuricêmico da estefalagina. N = 3 por grupo. Cada coluna representa a média \pm SEM. ## p < 0,01 representa diferenças significativas em comparação com o grupo estefalagina; * p < 0,05 representa diferenças significativas em comparação com o grupo que recebeu apenas ácido oxônico e ° p < 0,05 representa diferenças significativas em comparação com o grupo naïve.. A análise estatística foi realizada usando a análise de variância ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparação múltipla de Dunnet.

4.3.2 Avaliação da atividade da enzima xantina oxidase

Foi avaliada a atividade da xantina oxidase utilizando pterina como substrato in vitro. A estefalagina não apresentou efeito na inibição da atividade da xantina oxidase, como mostrado na figura 5. Conforme o esperado, o allopurinol, usado como controle positivo (10 μ g/mL) inibiu a atividade da xantina oxidase em $50 \pm 9\%$.

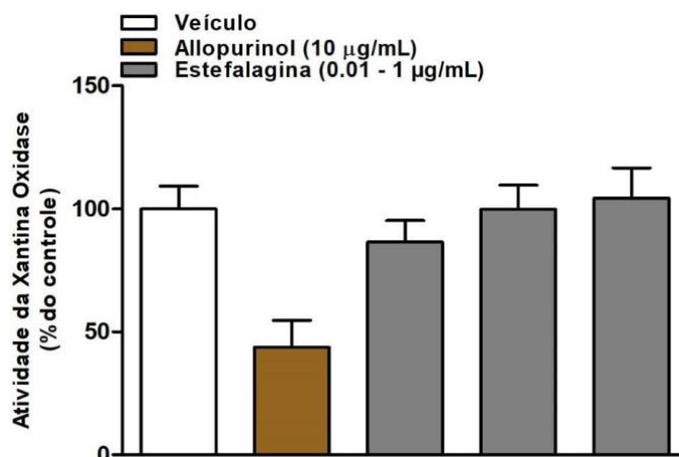


Figura 6 Avaliação da inibição da enzima xantina oxidase pela estefalagina. N = 11 por grupo. Cada coluna representa a média \pm SEM; ** p <0,01 representa diferenças significativas em comparação com o veículo. ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Bonferroni.

4.4 Avaliação de possíveis efeitos colaterais

4.4.1 Análises toxicológicas

Os resultados dos parâmetros sanguíneos são mostrados na figura 6. O grupo estefalagina não apresentou diferenças significativas em relação ao grupo naive em nenhum dos parâmetros analisados. Nos ensaios AST e ALT, o grupo estefalagina apresentou atividade de $51,8 \pm 3,4$ e $43,3 \pm 5,9$ U / L, enquanto o grupo naive apresentou $49,0 \pm 3,8$ e $43,1 \pm 2,6$ U / L. Já nos ensaios de uréia e creatinina, o grupo estefalagina apresentou atividade de $53,6 \pm 2,0$ e $0,26 \pm 0,02$ mg / dL e o grupo naive apresentou $50,9 \pm 1,2$ e $0,27 \pm 0,01$ mg / dL.

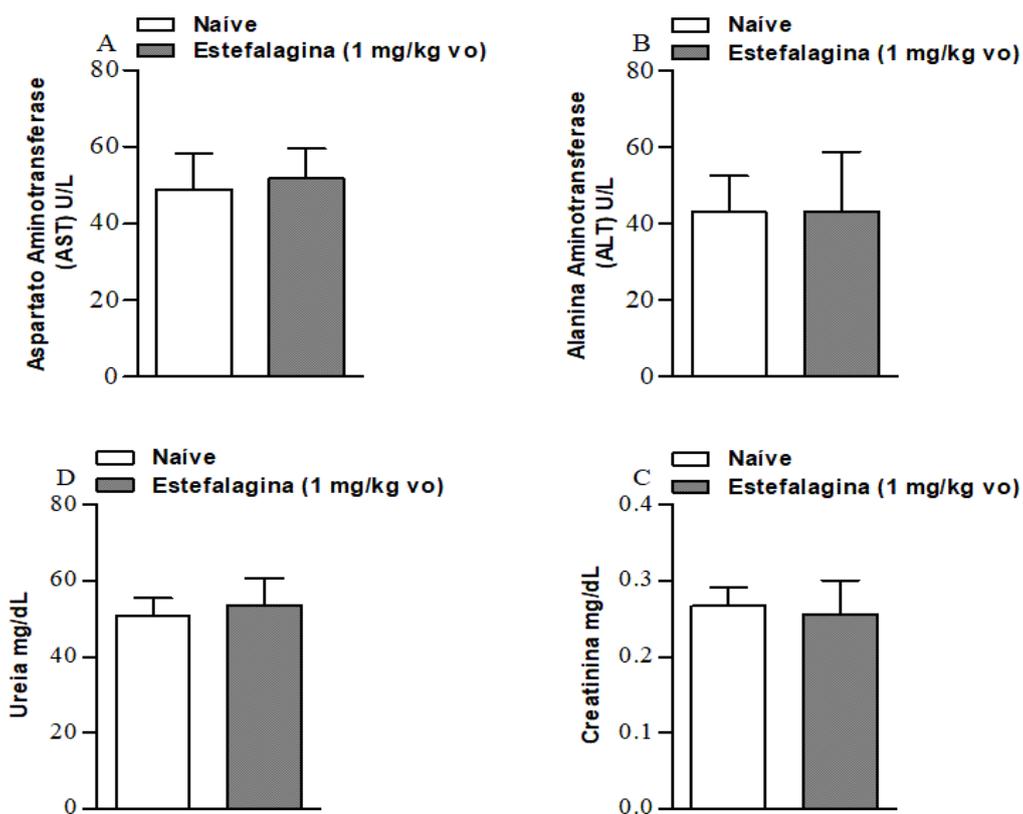


Figura 7. Resultados dos parâmetros sanguíneos. A) AST (asparatato aminotransferase), B) ALT (alanina aminotransferase), C) uréia e D) creatinina. As amostras foram comparadas

entre si pelo teste t (e testes não paramétricos) considerando $p < 0,05$. Não houve diferenças significativas entre os grupos.

4.3.2 Toxicidade

A administração da estefalagina não causou nenhuma alteração nos parâmetros analisados durante os 7 dias, como: anormalidades na dieta, mudanças bruscas no peso corporal, alterações nos pelos, nas fezes, no comportamento e na anatomia macroscópica dos camundongos. Esse resultado indica que a estefalagina, aparentemente, não causa nenhuma toxicidade aguda ou crônica.

5. Discussão

A gota é uma artrite inflamatória desencadeada pela cristalização de urato monossódico nas articulações e é considerada um grande problema de saúde pública. A maior problemática relacionada ao tratamento da doença é a presença de comorbidades, as quais inviabilizam o uso de diversos medicamentos, e devido a isso, muitos indivíduos acabam buscando por formas alternativas, como o uso de produtos naturais. No Brasil existe uma extensa, rica e diversa flora, o que nos permite ter acesso a uma grande quantidade de produtos naturais que podem ser potencialmente ativos do ponto de vista farmacológico. Também apresenta uma extensa biodiversidade ainda pouco explorada, sendo o cerrado o segundo maior bioma brasileiro e a maior biodiversidade dentre as savanas em todo o mundo (KLINK et al., 2005). Nosso grupo tem realizado estudos a cerca dos possíveis efeitos antinociceptivos de algumas plantas do cerrado, entre elas, a *Annona crassiflora* mart., o araticum (JUSTINO et al., 2020). Nesse sentido, este estudo propôs a investigação dos possíveis efeitos antinociceptivos e anti-inflamatórios de um alcalóide aporfínico, estefalagina, isolada da fração diclorometânica da casca do fruto da *Annona crassiflora* mart., o araticum do cerrado, em um modelo de gota induzida pela injeção de cristais de MSU em camundongos.

Existem diferentes modelos de gota e hiperuricemia induzida em camundongo para o estudo dessas condições, no entanto, esses modelos apresentam algumas características importantes para serem pontuadas. Uma

forma de indução da gota em roedores é por aplicação de MSU via intraperitoneal e nas articulações do joelho ou da pata (referencias de artigos com cada modelo). Já para ocorrer a hiperuricemia, pode-se administrar ácido oxônico, que é um inibidor da enzima uricase, aumentando assim os níveis de ácido úrico no animal (SATO et al., 2020). Porém, não é possível mensurar a nocicepção nos modelos de aplicação via intraperitoneal e hiperuricemia, sendo a dor um sintoma muito importante para ser estudado na artrite gotosa, pois é uma reclamação comum dos pacientes que a doença acomete. Assim, o modelo escolhido para a indução do ataque agudo de gota neste estudo é induzido pela injeção intra-articular de cristais de MSU.

De acordo, em nosso estudo constatamos que há o desenvolvimento de dor nos animais submetidos a injeção intra-articular de MSU, e o pico da nocicepção nos animais foi em torno de 4 horas após a administração IA dos cristais de MSU (100 µg/articulação) e, após 6 horas, os animais começavam a retornar a linha basal e 24 horas após, já não apresentavam mais dor. Dados clínicos corroboram com nossos achados, pois mostram que na crise aguda de gota em humanos, há o desenvolvimento rápido de dor intensa, inchaço e sensibilidade que atinge seu pico dentro de 6 a 12 horas (ZYCHOWICZ; POPE; GRASER, 2010). Se não tratado, o ataque agudo da doença em humanos pode durar de 3 a 14 dias e crises subsequentes tendem a ser prolongadas e podem envolver mais articulações e/ou tendões (MANDELL, 2008).

Com os resultados obtidos nos ensaios de nocicepção mecânica, vimos que a estefalagina foi capaz de reduzir significativamente a nocicepção nos animais com gota, prevenindo a queda do limiar mecânico de retirada de pata na metodologia utilizada, denominada Von Frey. Alguns estudos mostram que um alvo molecular comum de alcaloides aporfínicos para a redução da dor e da inflamação são os receptores de potencial transitório (TRPs) (MONTRUCCHIO; CÓRDOVA; SOARES, 2013). Os TRPs são canais iônicos amplamente expressos em neurônios sensoriais e sua ativação leva ao aumento de cálcio e liberação de neuropeptídeos, como a substância P, por exemplo, que atua induzindo processos nociceptivos e inflamatórios (CORTRIGHT; SZALLASI et al., 2007; CALIXTO et al., 2005). Assim, sua modulação inibitória seria uma interessante estratégia analgésica.

Um estudo de 2013 realizado por Montrucchio e colaboradores, demonstrou que um alcaloide aporfínico denominado S-(+)-Dicentrine teve efeito antinociceptivo em modelos de dor inflamatória atuando sobre canais TRP. Outros alcaloides comprovadamente moduladores de canais TRP são: nicotina, piperina e a voacangina (TALAVERA et al., 2009; MCNAMARA; RANDALL; GUNTHORPE, 2005; TERADA et

al., 2014). Além disso, recentemente nosso grupo realizou um estudo em que evidenciamos que canais TRPs, mais especificamente TRPV1 e TRPA1 são, pelo menos em parte, alvos da estefalagina para desencadear o efeito antinociceptivo e anti-inflamatório (JUSTINO et al., 2020).

Em relação ao ensaio nociceptivo denominado *burrowing*, não foi observado uma grande alteração no comportamento dos animais com gota em relação ao grupo *naive*. Esse resultado corrobora com outros dados presentes na literatura, como no caso do estudo feito por Shepherd e colaboradores em 2018, em que eles demonstraram que o *burrowing* é uma boa metodologia para ser aplicada em ensaios de nocicepção relacionados com modelos de dor neuropática, ou seja, modelos de dor crônica. Já para modelos de dor aguda em camundongos, essa metodologia não evidencia grandes diferenças entre os grupos analisados.

No ensaio de nocicepção espontânea vimos que apesar de não haver diferença significativa entre os grupos, houve uma tendência de redução do escore do grupo tratado com estefalagina em 2, 4 e 6 horas após a injeção IA de MSU. Esses resultados vão de acordo com o ensaio descrito anteriormente, de hiperalgesia mecânica, pois com a redução da sensação de dor nos animais, eles conseguiam posicionar de forma mais confortável a pata no solo.

Outra característica importante é o desenvolvimento de edema na articulação atingida. Constatamos que o pico de nocicepção nos animais foi em torno de 4 horas após a administração IA dos cristais de MSU (100 µg/articulação) e depois de 6 horas, os animais começavam a retornar a linha basal e 24 horas após, já não apresentavam mais dor. Dados clínicos mostram que a crise aguda de gota apresenta dor contínua grave durante um período de 12 horas, sendo o pico por volta de 4 horas e após 72 horas, os pacientes não relatam mais dor (FAIRES; MCCARTY, 1962; KEITH; GILLILAND, 2007; ZYCHOWICZ; POPE;

GRASER, 2010). Outra característica

importante na clínica é a formação de queimação e edema na articulação atingida, que também foi observado nesse modelo usado, tendo início em torno de 2 horas após a IA, atingindo o pico máximo em 4 horas. Da mesma forma já foi descrito em humanos, inclusive nos mesmos tempos indicados (FAIRES; MCCARTY, 1962).

Como forma de uma possível elucidação dos mecanismos de ação da estefalagina, alguns ensaios foram realizados. Vimos que ela foi capaz de atuar diminuindo a atividade da enzima mieloperoxidase, conseqüentemente, atenuando os mecanismos inflamatórios do ataque agudo de gota. Além disso, apesar de não ter sido significativo, foi possível observar que os animais tratados com a estefalagina tiveram uma diminuição da presença da citocina pró-inflamatória IL-1 β , o que também causa uma atenuação dos sinais inflamatórios, visto que essa é a principal citocina envolvida na resposta inflamatória a cristais de MSU. Diversos estudos já demonstraram que durante a formação do processo inflamatório em resposta ao ácido úrico, em um ataque agudo de gota, há o influxo de neutrófilos para o líquido sinovial das articulações e em resposta ao MSU, essas células começam a produzir e liberar diferentes moléculas inflamatórias como as citocinas interleucina 6 (IL-6), IL-1 β e interleucina 8 (IL-8) (SO; THORENS, 2010; MITROULIS; KAMBAS; RITIS, 2013).

Além disso, alguns autores sugerem que macrófagos também sejam importantes para a produção e liberação desses mediadores inflamatórios (DALBETH; HASKARD, 2005; MALAWISTA; DE BOISFLEURY; NACCACHE, 2011). A IL-1 β é o mediador

responsável por recrutar e ativar mais neutrófilos para a região inflamada, o que gera uma cascata de eventos que agrava o processo inflamatório (SCANU et al., 2012; MITROULIS; KAMBAS; RITIS et al., 2013). Alguns fármacos, como o Canakinumab e o Riloncept, são inibidores da ação da citocina IL-1 β e demonstraram ser capazes de atenuar a dor e o processo inflamatório em indivíduos com gota, tanto durante a fase aguda, quanto na fase crônica (SO; THORENS, 2007; SCHLESINGER, 2014).

Por outro lado, vimos que o alcaloide aporfínico não possui uma atividade anti-hiperuricêmica, pois ele não foi capaz de inibir a atividade da enzima xantina

oxidase. A xantina oxidase é uma enzima chave na via de catabolismo de purinas, pois ela é a responsável pela catalisação da oxidação do composto hipoxantina em xantina e, em seguida, para ácido úrico, sendo este o produto final da via em humanos. Portanto, caso essa enzima seja inibida, menos ácido úrico seria formado. A fim de tentar encontrar um possível mecanismo de ação da estefalagina, esse teste foi realizado, pois há fármacos no mercado que atuam no controle dos níveis de ácido úrico em pacientes com gota, como é o caso do alopurinol e conforme citado anteriormente, esse medicamento é amplamente utilizado no tratamento da artrite gotosa.

Diversos ensaios relacionados com a segurança da estefalagina foram realizados e os resultados até agora foram muito satisfatórios. A estefalagina demonstrou que não causa lesões hepáticas ou renais nos camundongos, como demonstrado pelas análises toxicológicas das enzimas aminotransferase de aspartato e de alanina (AST e ALT). Essas enzimas residem dentro de células do fígado, mas quando há danos no órgão, elas caem na corrente sanguínea e, assim, conseguimos avaliar possíveis lesões. Já para avaliar danos renais, foram dosados ureia e creatinina, compostos filtrados nos rins. Quando os rins não estão em perfeito funcionamento, há uma queda na taxa de filtração glomerular (TFG), sendo esse um parâmetro que indica se as impurezas sanguíneas estão sendo filtradas corretamente pelos rins e eliminados na urina. Portanto, quando isso acontece, as taxas de ureia e creatinina no sangue aumentam. A fim de analisar alterações morfológicas em camundongos causados pela estefalagina, administramos o alcaloide e observamos os animais por 7 dias. No entanto, não constatamos nenhum tipo de alteração macroscópica, nem nas fezes ou peso dos animais, durante o tempo analisado. Ainda, a estefalagina também não interfere na atividade motora dos animais, como demonstrado por Justino e colaboradores em 2020, pelo ensaio de campo aberto. Portanto, com esses resultados obtidos até o momento, o alcaloide proveniente do araticum aparenta ser muito seguro para o uso terapêutico.

6. Conclusão

Em suma, com este estudo conseguimos demonstrar que o alcalóide

aporfínico estefalagina possui um grande potencial de vir a se tornar um fármaco para o tratamento da artrite gotosa. Vimos que o composto foi capaz de prevenir a dor e o edema nos animais com a doença induzida, além de atenuar parâmetros inflamatórios como demonstrado nos experimentos da enzima MPO e da citocina IL-1 β . Mostramos que o alcaloide aparenta ser seguro, pois em diversos ensaios feitos, ele não causou nenhum tipo de alteração no que diz respeito a efeitos adversos e colaterais. No entanto, vê-se a necessidade de uma maior investigação para a elucidação do seu mecanismo de ação, visto que nesse trabalho mostramos que a estefalagina não tem como alvo a enzima xantina oxidase e também não parece estar associada com a diminuição dos níveis séricos de ácido úrico nos animais, como demonstrado no experimento utilizando o ácido oxônico, um inibidor da uricase.

Referências

ÁLVAREZ-LARIO, B.; MACARRÓN-VICENTE, J. Uric acid and evolution. **Rheumatology**, v. 49, n. 11, p. 2010-2015, 2010.
<https://doi.org/10.1093/rheumatology/keq204>

ARNILLAS, E. A. P. **Obtenção e caracterização de formulação fitoterápica contendo extrato e tintura padronizados de *Arnica Montana* L. e *Aesculus hippocastanum* L.** 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacéuticas). Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, Belém, 2015.

BAVARESCO, O. S. A.; PEREIRA, I. C. P.; MELO, C. D.; LOBATO, F.; FALCAI, A.; BOMFIM, M. R. Q. Utilização popular da *Pterodon* spp no tratamento de doenças reumáticas. **Revista de Investigação Biomédica**, v. 8, p. 81-91. 2016. <https://doi.org/10.24863/rib.v8i1.32>

BECKER, M. A.; BARAF H. S. B.; YOOD, R. A.; DILON, A.; VÁZQUEZ-MELLADO, J.; OTTERY, F. D.; KHANNA, D.; SUNDY, J. S. Long-term safety of pegloticase in chronic gout refractory to conventional treatment. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 72, n. 9, p. 1469-1474, 2013.
<https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2012-201795>

CALIXTO, J. B.; KASSUYA, C. A.; ANDRÉ, E.; FERREIRA, J. Contribution of natural products to the discovery of the transient receptor potential (TRP) channels family and their functions. **Pharmacology & therapeutics**, v. 106, n. 2, p. 179-208, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2004.11.008>

CAMPION E. W.; GLYNN R. J., DELABRY L. O. Asymptomatic hyperuricemia. Risks and consequences in the Normative Aging Study. **The**

American journal of medicine, v. 82, n. 3, p.421-426, 1987.
[https://doi.org/10.1016/0002-9343\(87\)90441-4](https://doi.org/10.1016/0002-9343(87)90441-4)

CHAPLAN, S. R.; BACH, F. W.; POGREL, J. W.; CHUNG, J. M.; YAKSH, T. L. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **Journal of neuroscience methods**, v. 53, n.1, p. 55-63, 1994.
[https://doi.org/10.1016/0165-0270\(94\)90144-9](https://doi.org/10.1016/0165-0270(94)90144-9)

CHEN-XU, M.; YOKOSE, C.; RAI, S. K.; PILLINGER, M. H.; CHOI, H. K. Contemporary prevalence of gout and hyperuricemia in the United States and decadal trends: the national health and nutrition examination survey, 2007–2016. **Arthritis & Rheumatology**, v. 71, n. 6, p. 991-999, 2019.
<https://doi.org/10.1002/art.40807>

CODERRE, T. J.; WALL, P. D. Ankle joint urate arthritis (AJUA) in rats: an alternative animal model of arthritis to that produced by Freund's adjuvant. **Pain**, v. 28, n. 3, p. 379-393, 1987. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(87\)90072-8](https://doi.org/10.1016/0304-3959(87)90072-8)

CORTRIGHT, D. N.; SZALLASI, A. TRP channels and pain. **Current pharmaceutical design**, v. 15, n. 15, p. 1736-1749, 2009.
<https://doi.org/10.2174/138161209788186308>

CRITTENDEN, D. B.; PILLINGER, M. H. New therapies for gout. **Annual review of medicine**, v. 64, p. 325-337, 2013. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-080911-105830>

CUNHA, T. M.; VERRI-JÚNIOR, W. A.; VIVANCOS, G. G.; MOREIRA, I. F.; REIS, S.; PARADA, C. A.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 37, n. 3, p. 401-407, 2004.
<https://doi.org/10.1590/S0100-879X2004000300018>

DALBERTH, N.; CHOI, H. K.; JOOSTEN, L. A. B.; KHANNA P. P.; MATSUO, H.; PEREZ-RUIZ, F.; STAMP, L. K. Gout. **Nature reviews disease primers**, v. 5, n. 69, p. 1-17, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0115-y>

DALBETH, N.; HASKARD, D. O. Mechanisms of inflammation in gout. **Rheumatology**, v. 44, n. 9, p. 1090-1096, 2005.
<https://doi.org/10.1093/rheumatology/keh640>

DE SOUZA, V. R.; PEREIRA, P. A. P.; QUEIROZ, F.; BORGES, S. V.; CARNEIRO, J. D. D. S. Determination of bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Cerrado Brazilian fruits. **Food chemistry**, v. 134, n. 1, p. 381-386, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.191>

DEACON, R. M. J. Burrowing in rodents: a sensitive method for detecting behavioral dysfunction. **Nature protocols**, v. 1, n. 1, p. 118-121, 2006
<https://doi.org/10.1038/nprot.2006.19>

DUTRA, M. G. **Plantas medicinais, fitoterápicos e saúde pública: um diagnóstico situacional em Anápolis, Goiás**. 2009. Dissertação (Mestrado Sociedade, Tecnologia e Meio Ambiente), Centro Universitário de Anápolis, Anápolis, 2009.

FAIRES, J. S.; MCCARTY, D. J. Acute arthritis in man and dog after intrasynovial injection of sodium urate crystals. **The Lancet**, v. 280, n. 7258, p. 682-685, 1962. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(62\)90501-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(62)90501-9)

FISCHER, S. P. M.; BRUCO, I.; CAMPONOGARA, C. PIANA, M.; FACCIN, H.; GOBO, L. A.; DE CARVALHO, L. M.; OLIVEIRA, S. M. *Arctium minus* crude extract presents antinociceptive effect in a mice acute gout attack model. **Inflammopharmacology**, v. 26, n. 2, p. 505-519, 2018. <https://doi.org/10.1007/s10787-017-0384-6>

FUKAHORI, F. L. P. **Avaliação da ação anti-inflamatória da semente de sucupira branca (*Pterodon emarginatus*, Vogel) utilizando cães portadores de doenças inflamatórias da articulação coxofemoral diagnosticado pela termografia infravermelha**. 2017. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Programa de Pós- Graduação em Ciência Veterinária, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2017.

GRANNER, D. K.; WANG, J. C.; YAMAMOTO, K. R. **Regulatory actions of glucocorticoid hormones: from organisms to mechanisms**. In: *Glucocorticoid Signaling.*, New York, Springer, 2015 https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2895-8_1.

HAK, A. E.; CURHAN, G. C.; GRODSTEIN, F.; CHOI, H. K. Menopause, postmenopausal hormone use and risk of incident gout. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 69, n. 7, p. 1305-1309, 2010. <https://doi.org/10.1136/ard.2009.109884>

JUSTINO, A. B.; BARBOSA, M. F.; NEVES, T. V.; CAPPATO, H.; SILVA, G.; BRUM, E. S.; FIALHO, M. F. P.; COUTO, A. C.; SARAIVA, A. L.; AVILA, V. M. R.; OLIVEIRA, S. M.; PIVATTO, M.; ESPINDOLA, F. S.; SILVA, C. R. Stephalagine, an aporphine alkaloid from *Annona crassiflora* fruit peel, induces antinociceptive effects by TRPA1 and TRPV1 channels modulation in mice. **Bioorganic Chemistry**, v. 96, p. 1-10, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103562>

JUSTINO, A. B.; COSTA, M. S.; SARAIVA, A. L.; SILVA, P. H.; VIEIRA, T. N.; DIAS, P.; LINHARES, C. R.; DECHICHI, P.; AVILA, V. M. R.; ESPINDOLA, F. S.; SILVA, C. R. Protective effects of a polyphenol-enriched fraction of the fruit peel of *Annona crassiflora* Mart. on acute and persistent inflammatory pain. **Inflammopharmacology**, v. 28, p. 759-771, 2020. <https://doi.org/10.1007/s10787-019-00673-7>

JUSTINO, A. B.; PEREIRA, M. N.; VILELA, D. D.; PEIXOTO, L. G.; MARTINS, M. M.; TEIXEIRA, R. R.; MIRANDA, N. C.; SILVA, N. M.; DE SOUDA, R. M. F.; DE OLIVEIRA, A.; ESPINDOLA F. S. Peel of araticum fruit (*Annona crassiflora* Mart.) as a source of antioxidant compounds with α -amylase, α -glucosidase and glycation inhibitory activities. **Bioorganic chemistry**, v. 69, p. 167-182, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2016.11.001>

KEITH, M. P.; GILLILAND, W. R. Updates in the management of gout. **The American journal of medicine**, v. 120, n. 3, p. 221-224, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2006.02.044>

KHANAPURE, S. P.; GARVEY, D. S.; JANERO, D. R.; GORDON LETTS, L. Eicosanoids in inflammation: biosynthesis, pharmacology, and therapeutic frontiers. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 7, n. 3, p. 311-340, 2007. <https://doi.org/10.2174/156802607779941314>

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. A conservação do Cerrado brasileiro. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 147-155, 2005.

LESSA, M. A.; CAVALCANTI, I. L.; FIGUEIREDO, N. V. Cannabioid derivatives and the pharmacological management of pain. **Revista Dor**, v. 17, n. 1, p. 47-51, 2016. <https://doi.org/10.5935/1806-0013.20160012>

LIAW, C. C.; LIOU, J. R.; WU, T. Y.; CHANG, F. R.; WU, Y. C. Acetogenins from annonaceae. In: **Progress in the Chemistry of Organic Natural Products**. Springer, Cham, v. 101, p. 113-230, 2016. https://doi.org/10.1007/978-3-319-22692-7_2

LOEB, J. N. The influence of temperature on the solubility of monosodium urate. **Arthritis & Rheumatism: Official journal of the American college of rheumatology**, v. 15, n. 2, p. 189-192, 1972. <https://doi.org/10.1002/art.1780150209>

MALAWISTA, S. E.; DE BOISFLEURY, A. C.; NACCACHE, P. H. Inflammatory gout: observations over a half-century. **The federation of American societies for experimental biology journal**, v. 25, n. 12, p. 4073-4078, 2011. <https://doi.org/10.1096/fj.11-1201ufm>

MANDELL, B. F. Clinical manifestations of hyperuricemia and gout. **Cleveland clinic journal of medicine**, v. 75, n.7, p. 5-8, 2008. https://doi.org/10.3949/ccjm.75.Suppl_5.S5

MARTINON, F.; PÉTRILLI, V.; MAYOR, A.; TARDIVEL, A.; TSCHOPP, J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. **Nature**, v. 440, n. 7081, p. 237-241, 2006. <https://doi.org/10.1038/nature04516>

MCNAMARA, F. N.; RANDALL, A.; GUNTHORPE, M. J. Effects of piperine, the pungent component of black pepper, at the human vanilloid receptor

(TRPV1). **British journal of pharmacology**, v. 144, n. 6, p. 781-790, 2005. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706040>

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Uso de fitoterápicos e plantas medicinais cresce no SUS. Disponível em: <<https://www.saude.gov.br/noticias/agencia-saude/24205-uso-de-fitotropicos-e-plantas-medicinais-cresce-no-sus> > Acesso em: 15 de maio 2020.

MITROULIS, I.; KAMBAS, K.; RITIS, K. Neutrophils, IL-1 β , and gout: is there a link? In: **Seminars in immunopathology**. Springer-Verlag, p. 501-512, 2013. <https://doi.org/10.1007/s00281-013-0361-0>

MONTRUCCHIO, D. P.; CÓRDOVA, M. M.; SOARES, A. R. S. Plant Derived Aporphinic Alkaloid S-(+)-Dicentrine Induces Antinociceptive Effect in Both Acute and Chronic Inflammatory Pain Models: Evidence for a Role of TRPA1 Channels. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. 2–10, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067730>

MONTRUCCHIO, D. P.; MIGUEL, O. G.; ZANIN, S. M. W.; DA SILVA, G. A.; CARDOZO, A. M.; SANTOS, A. R. S. Antinociceptive effects of a chloroform extract and the alkaloid dicentrine isolated from fruits of *Ocotea puberula*. **Planta medica**, v. 78, n. 14, p. 1543-1548, 2012. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1315026>

NARANG, R. K.; DALBETH, N. Management of complex gout in clinical practice: Update on therapeutic approaches. **Best practice & research clinical rheumatology**, v. 32, n. 6, p. 813-834, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.berh.2019.03.010>

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of natural products**, v. 70, n. 3, p. 461-477, 2007. <https://doi.org/10.1021/np068054v>

PALOMO, J.; DIETRICH, D.; MARTIN, P.; PALMER, G.; GABAY. The interleukin (IL)-1 cytokine family-Balance between agonists and antagonists in inflammatory diseases. **Cytokine**, v. 76, n. 1, p. 25-37, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2015.06.017>

PEREZ-RUIZ, F.; CASTILLO, E.; CHINCHILLA, S. P.; HERRERO-BEITES, A. M. Clinical manifestations and diagnosis of gout. **Rheumatic disease clinics**, v. 40, n. 2, p.193-206, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.rdc.2014.01.003>

RICHETTE, P.; BARDIN, T. Colchicine for the treatment of gout. **Expert opinion on pharmacotherapy**, v. 11, n. 17, p. 2933-2938, 2010. <https://doi.org/10.1517/14656566.2010.529432>

RIVAS-GONZÁLEZ, P.; CALVO-HERNANDEZ, R.; MOLINELLI-BARRANCO, M.; DIAZ-CURIEL, M. Síndrome de hipersensibilidad al alopurinol. **Revista clínica Española**, v. 201, n. 8, p. 493-493, 2001.

[https://doi.org/10.1016/S0014-2565\(01\)70893-4](https://doi.org/10.1016/S0014-2565(01)70893-4)

ROSSATO, M. F.; HOFFMEISTER, C.; TREVISAN, G.; BEZERRA, F.; CUNHA, T. M.; FERREIRA, J.; SILVA, C. R. Monosodium urate crystal interleukin-1 β release is dependent on Toll-like receptor 4 and transient receptor potential V1 activation. **Rheumatology**, v. 59, n. 1, p. 233-242, 2020. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kez384>

SATO, V. H.; CHEWCHINDA, S.; PARICHATIKANOND, W.; VONGSAK, B. In vitro and in vivo evidence of hypouricemic and anti-inflammatory activities of *Maclura cochinchinensis* (Lour.) Corner heartwood extract. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 10, n. 1, p. 85-94, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2019.03.003>

SCANU, A.; OLIVIERO, F.; RAMONDA, R.; FRALLINARDO, P.; DAYER, J. M.; PUNZI, L. Cytokine levels in human synovial fluid during the different stages of acute gout: role of transforming growth factor β 1 in the resolution phase. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 71, n. 4, p. 621-624, 2012. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2011-200711>

SCHLESINGER, N. Anti-interleukin-1 therapy in the management of gout. **Current rheumatology reports**, v. 16, n. 2, p. 1-6, 2014. <https://doi.org/10.1007/s11926-013-0398-z>

SCHLESINGER, N. Difficult-to-treat gouty arthritis. **Drugs**, v. 71, n. 11, p. 1413-1439, 2011. <https://doi.org/10.2165/11592290-000000000-00000>

SCHLESINGER, N. Management of acute and chronic gouty arthritis. **Drugs**, v. 64, n. 21, p. 2399-2416, 2004. <https://doi.org/10.2165/00003495-200464210-00003>

SCHLESINGER, N. Treatment of chronic gouty arthritis: it is not just about urate-lowering therapy. In: **Seminars in arthritis and rheumatism**, v. 42, p. 155-165, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.semarthrit.2012.03.010>

SHEPHERD, A. J.; CLOUD, M. E.; CAO, Y. Q.; MOHAPATRA, D. P. Deficits in burrowing behaviors are associated with mouse models of neuropathic but not inflammatory pain or migraine. **Frontiers in behavioral neuroscience**, v. 12, p. 1-11, 2018. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2018.00124>

SILVA, C. R. **Papel do receptor B1 para cininas e o efeito da inibição da enzima conversora de angiotensina em ataques agudos de gota em roedores**. 2014. Tese (Doutorado em Bioquímica e Toxicológica). Programa de pós-graduação em ciências biológicas: bioquímica e toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2014.

SILVA, C. R.; FRÖHLICH, J. K.; OLIVEIRA, S. M.; CABREIRA, T. N.; ROSSATO, M. F.; TREVISAN, G.; FROEDER, A. L.; BOCHI, G. V.; MORESCO, R. N.; ATHAYDE, M. L.; FERREIRA, J. The antinociceptive and

anti-inflammatory effects of the crude extract of *Jatropha isabellei* in a rat gout model. **Journal of ethnopharmacology**, v. 145, n. 1, p. 205-213, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.10.054>

SILVA, C. R.; OLIVEIRA, S. M.; HOFFMEISTER, C.; FUNCK, V.; GUERRA, G. P.; TREVISAN, G.; TONELLO, R.; ROSSATO, M. F.; PESQUERO, J. B.; BADER, M.; OLIVEIRA, M. S.; MCDUGALL, J. J.; FERREIRA, J. 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**, v. 75, n. 1, p. 260-268, 2016. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2014-205739>

SO, A.; DE SMEDT, T.; REVAZ, S.; TSCHOPP, J. A. pilot study of IL-1 inhibition by anakinra in acute gout. **Arthritis research & therapy**, v. 9, n. 2, p. 1-6, 2007. <https://doi.org/10.1186/ar2143>

SO, A.; THORENS, B. Uric acid transport and disease. **The Journal of clinical investigation**, v. 120, n. 6, p. 1791-1799, 2010. <https://doi.org/10.1172/JCI42344>

SULEYMAN, H.; DEMIRCAN, B.; KARAGOZ, Y. Anti-inflammatory and side effects of cyclooxygenase inhibitors. **Pharmacological reports**, v. 59, n. 3, p. 247-258, 2007.

SUMPTER, N. A.; SAAG, K. G.; REYNOLDS, R. J.; MERRIMAN, T. R. Comorbidities in gout and hyperuricemia: causality or epiphenomena? **Current opinion in rheumatology**, v. 32, n. 2, p. 126-133, 2020. <https://doi.org/10.1097/BOR.0000000000000691>

SUNDY, J. S.; BARAF, H. S. B.; YOOD, R. A.; GUTIERREZ-URENA, S. R.; TREADWELL, E. L.; VÁZQUEZ-MELLADO, J.; WHITE, W. B.; LIPSKY, P. E.; HOROWITZ, Z.; HUANG, W.; MAROLI, A. N.; WALTRIP, R. W.; HAMBURGER, S. A.; BECKER, M. A. Efficacy and tolerability of pegloticase for the treatment of chronic gout in patients refractory to conventional treatment: two randomized controlled trials. **Journal of American medical association**, v. 306, n. 7, p. 711-720, 2011. <https://doi.org/10.1001/jama.2011.1169>

TALAVERA, K.; GEES, M.; KARASHIMA, Y.; MESEGUER, V.; VANOIRBEEK, J. A.; DAMANN, N.; EVERAERTS, W.; BENOIT, M.; JANSSENS, A.; VENNEKENS, R. VIANA, F.; NEMERY, B.; NILIUS, B.; VOETS, T. Nicotine activates the chemosensory cation channel TRPA1. **Nature neuroscience**, v. 12, n. 10, p. 1293-1299, 2009. <https://doi.org/10.1038/nn.2379>

TENG, C. M.; YU, S. M.; KO, F. N.; CHEN, C. C.; HUANG, Y. L.; HUANG, T. F. Dicentrine, a natural vascular α 1-adrenoceptor antagonist, isolated from *Lindera megaphylla*. **British journal of pharmacology**, v. 104, n. 3, p. 651-656, 1991. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1991.tb12484.x>

TERADA, Y.; HORIE, S.; TAKAYAMA, H.; UCHIDA, K.; TOMINAGA, M.; WATANABE, T. Activation and inhibition of thermosensitive TRP channels by

voacangine, an alkaloid present in *Voacanga africana*, an African tree. **Journal of natural products**, v. 77, n. 2, p. 285-297, 2014. <https://doi.org/10.1021/np400885u>

TRESCOT, A. M.; DATTA, S.; LEE, M.; HANSEN, H. Opioid pharmacology. **Pain physician**, v. 11, n. 2, p. 133-153, 2008. <https://doi.org/10.36076/ppj.2008/11/S133>.

TSAI, T. H.; WANG, G. J.; LIN, L. C. Vasorelaxing alkaloids and flavonoids from *Cassytha filiformis*. **Journal of natural products**, v. 71, n. 2, p. 289-291, 2008. <https://doi.org/10.1021/np070564h>

WALLACE, S. L.; SINGER, J. Z. Therapy in gout. **Rheumatic diseases clinics of North America**, v. 14, n. 2, p. 441-457, 1988 [https://doi.org/10.1016/S0889-857X\(21\)00975-3](https://doi.org/10.1016/S0889-857X(21)00975-3).

WERNICK, R.; WINKLER, C.; CAMPBELL, S. Tophi as the initial manifestation of gout: report of six cases and review of the literature. **Archives of internal medicine**, v. 152, n. 4, p. 873-876, 1992. <https://doi.org/10.1001/archinte.152.4.873>

WILSON, L.; SASEEN, J. J. Gouty arthritis: a review of acute management and prevention. **Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy**, v. 36, n. 8, p. 906-922, 2016. <https://doi.org/10.1002/phar.1788>

XIA, Y.; WU, Q.; WANG, H.; ZHANG, S.; JIANG, Y.; GONG, T.; XU, X.; CHANG, Q.; NIU, K.; ZHAO, Y. Global, regional and national burden of gout, 1990–2017: a systematic analysis of the Global Burden of Disease Study. **Rheumatology**, v. 59, n. 7, p. 1529-1538, 2019. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kez476>

YIN, Z. Y.; LI, L.; CHU, S. S.; SUN, Q.; MA, Z. L.; GU, X. P. Antinociceptive effects of dehydrocorydaline in mouse models of inflammatory pain involve the opioid receptor and inflammatory cytokines. **Scientific reports**, v. 6, p. 1-9, 2016. <https://doi.org/10.1038/srep27129>

ZHENG, H.; XIAO, W. H.; BENNETT, G. J. Mitotoxicity and bortezomib-induced chronic painful peripheral neuropathy. **Experimental neurology**, v. 238, n. 2, p. 225-234, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.08.023>

ZYCHOWICZ, M. E.; POPE, R. S.; GRASER, E. The current state of care in gout: Addressing the need for better understanding of an ancient disease. **Journal of the American academy of nurse practitioners**, v. 22, n. 1, p. 623-636, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7599.2010.00556.x>