

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE  
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**RONALDO PERFOLL**

**ENVOLVIMENTO DO RECEPTOR DE POTENCIAL  
TRANSITÓRIO ANQUIRINA 1 (TRPA1) NA NOCICEPÇÃO E  
INFLAMAÇÃO CAUSADAS POR LESÃO TÉRMICA EM  
RATOS**

Dissertação de Mestrado  
Apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Ciências da Saúde da  
Universidade do Extremo Sul  
Catarinense – UNESC para  
obtenção do título de Mestre em  
Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gabriela  
Trevisan dos Santos.

**CRICIÚMA  
2016**

#### Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

P428e Perfol, Ronaldo.

Envolvimento do Receptor de Potencial Transitório Anquirina 1 (TRPA1) na nocicepção e inflamação causadas por lesão térmica em ratos / Ronaldo Perfol ; orientadora : Gabriela Trevisan dos Santos. – Criciúma, SC : Ed. do Autor, 2016.

91 p. : il. ; 21 cm.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2016.

1. Receptor de Potencial Transitório Anquirina 1. 2. Peróxido de hidrogênio. 3. Sulfadiazina de prata. 4. Dor nociceptiva. 5. Alodínia. 6. Queimaduras - Tratamento. I. Título.

CDD 22. ed. 615.1

Bibliotecária Eliziane de Lucca Alosilla – CRB 14/1101

Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC

Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão.

Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde

**Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)**

Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de 03.06.2005

---

**ATA DE MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – Nº 257**

Com início às 16h00 (dezesesseis horas) do dia vinte e um do mês de julho de 2016 (dois mil e dezesseis), realizou-se, no bloco S, sala 25 na Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), o seminário formal de apresentação dos resultados da dissertação de Mestrado de **Ronaldo Perfolli**, sob a orientação da Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> **Gabriela Trevisan dos Santos**, intitulada “**Envolvimento do receptor de potencial transitório anquirina 1 (trpa1) na nocicepção e inflamação causadas por lesão térmica em ratos**”. A dissertação foi examinada por uma banca examinadora constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. Ricardo Andrez Machado de Ávila (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovado; Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Josiane Budni (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovado e Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sara Marchesan de Oliveira (Universidade Federal de Santa Maria - UFSM) – Conceito final: Aprovado. Com o resultado final: **APROVADO**, o aluno finalizou seus estudos em nível de Mestrado, fazendo jus ao grau de MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE. Os trabalhos foram concluídos às 17h00 (dezesete horas), dos quais eu, Diana Ghisi Daniel, Secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, lavrei a presente ata, que assino juntamente com o Prof. Dr. Claudio Teodoro de Souza Coordenador do Programa. Criciúma, 21 (vinte e um) de julho de 2016 (dois mil e dezesseis).

  
Prof. Dr. Claudio Teodoro de Souza  
Coordenador PPGCS  
Prof. Dr. Claudio Teodoro de Souza  
Coordenador do PPGCS

*Diana Ghisi Daniel*  
Auxiliar Administrativo PPGCS  
*Diana Ghisi*  
Diana Ghisi Daniel  
Secretária



### **Folha Informativa**

A dissertação foi elaborada seguindo o estilo Vancouver e será apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Biologia Molecular e Celular do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde na Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.



## AGRADECIMENTOS

Quero em primeiro lugar agradecer a DEUS, pois sem sua presença em minha vida, certamente não poderia ter superado os percalços desta caminhada; também nesta jornada foram essenciais a minha querida esposa Dirlene e meu filho Vinícius que acompanharam todos os momentos em que estive dedicando a este objetivo que fora terminar mais esta etapa de meus estudos. Sem dúvida a pessoa que me incentivou e me motivou para iniciar o Mestrado, minha colega e amiga de longa caminhada Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Luciane B. Ceretta e certamente a pessoa que com sua paciência, dedicação e conhecimento pode me levar ao final desta jornada; minha Professora, Gabriela Trevisan, que com certeza sem sua indispensável dedicação este momento se tornaria mais longo e com muito mais percalços. Gabriela eu a tenho como uma grande amiga que levo para sempre em minha caminhada. Paula, não poderia esquecer de você que deste de o início dos trabalhos no laboratório me acompanhou e me auxiliou. Sou lhe muito grato; a você Professora a gratidão será eterna, pois és muito humana e só tenho a lhe desejar tudo de bom em sua caminhada. Gostaria *in memoriam* agradecer aos meus pais, Helmuth e Iolanda, por tudo que fizeram por mim em vida.

Obrigado a todos que de alguma maneira contribuíram para o término de meu Mestrado, e não foram aqui citados.



## RESUMO

A lesão térmica (queimadura) pode ser causada pela ação direta ou indireta do calor sobre um organismo. Este processo causa o desenvolvimento de inflamação tecidual, levando a hipersensibilidade dolorosa e redução da qualidade de vida dos pacientes. Até o momento, os tratamentos utilizados para tratar esta patologia dolorosa não apresentaram eficácia significativa. Desta maneira, a procura por novos tratamentos baseados em mecanismos inovadores é relevante. O receptor de potencial transitório anquirina 1 (TRPA1) é um canal iônico ativado por substâncias oxidantes (peróxido de hidrogênio) produzidas após lesão tecidual e compostos irritantes naturais (óleo de mostarda). Este canal tem sido estudado como um alvo para a descoberta de novos analgésicos e anti-inflamatórios. No entanto, mesmo que o TRPA1 já tenha sido estudado em diferentes modelos de dor e inflamação, a sua participação em modelos causados por lesão térmica carece de maiores estudos. Assim, o objetivo desta dissertação foi avaliar a participação deste receptor na nocicepção e inflamação provocadas por modelo de lesão térmica em ratos. Para isso foram utilizados ratos Wistar machos (150-300 g). Primeiramente, para escolher a melhor dose do creme não iônico contendo o antagonista TRPA1 (HC-030031, concentrações de 0,5; 0,05 e 0,005%) foi utilizado o modelo de nocicepção causado pela administração subcutânea na pata traseira direita de alil isotiocianato (AITC, 10 nmol/pata, agonista TRPA1). Observou-se que as concentrações de 0,05 e 0,5% mostraram efeito antinociceptivo, então se escolheu a concentração de 0,05% do creme não iônico contendo HC-030031 para desenvolver o modelo de lesão térmica (causado por banho-maria, 70 °C, 5 segundos, na pata traseira direita). O controle positivo do estudo para o modelo de lesão térmica foi a sulfadiazina de prata a 1%. Os animais foram divididos em Grupo 1 (controle sem tratamento), Grupo 2 (lesão térmica sem tratamento), Grupo 3 (queimadura e aplicação tópica de veículo, creme não iônico), Grupo 4 (queimadura e aplicação tópica de sulfadiazina de prata a 1%), Grupo 5 (lesão térmica e aplicação tópica de HC-030031 a 0,05%). Assim, após aplicação por 6 dias dos tratamentos (1 vez ao dia por via tópica na pata traseira direita) foram avaliadas medidas de nocicepção (alodínia mecânica, estática e dinâmica, alodínia ao calor, dor espontânea, score facial de nocicepção e edema). No 6º dia foram retiradas amostras da pele da pata traseira direita para determinar parâmetros de inflamação (análise histológica e atividade das enzimas mieloperoxidase e NAGase), estresse oxidativo (dosagem de peróxido de hidrogênio e medida da



atividade de enzimas oxidantes - superóxido dismutase e NADPH oxidase) e a imunoreatividade para o receptor TRPA1. Os resultados obtidos mostraram que o creme não iônico contendo HC-030031 apresentou efeito antinociceptivo em relação aos diferentes parâmetros de nocicepção avaliados, semelhantes aos detectados para o creme contendo sulfadiazina de prata. Ainda, o creme não iônico contendo HC-030031 reduziu o edema e a infiltração de células inflamatórias e a atividade das enzimas mieloperoxidase e NAGase . Assim, esta preparação reduziu parâmetros associados à atividade de enzimas oxidantes e a concentração de peróxido de hidrogênio, bem como a expressão do receptor TRPA1 na pele da pata após a queimadura. O creme contendo sulfadiazina de prata apresentou efeito anti-inflamatório, antioxidante, e reduziu a imunoreatividade do receptor TRPA1 no tecido da pele da pata. Dessa forma, o presente estudo buscou determinar no receptor de TRPA1 novas formas de tratamento da dor e inflamação observadas após lesão térmica.

**Palavras-chave:** Peróxido de hidrogênio; HC-030031; Sulfadiazina de prata; NADPH oxidase; superóxido dismutase; alodínia.



## ABSTRACT

Thermal injury (burn) may be caused by direct or indirect action of heat on the human body. This process causes the development of tissue inflammation, which leads to the pain hypersensitivity and reduced quality of life of patients. Moreover, the treatments used to treat this painful disease do not show significant efficacy. Thus, the search for new treatment alternatives based on innovative mechanisms is relevant. The ankyrin transient receptor potential 1 (TRPA1) is an ion channel activated by oxidizing substance produced after tissue injury (hydrogen peroxide) and natural irritants compounds (mustard oil), this channel has been studied as a target for the discovery of new analgesics and anti-inflammatory agents. However, even if TRPA1 has been studied in various models of pain and inflammation, participating in models caused by thermal injury has not been studied yet. The objective of this study was to evaluate the participation of the TRPA1 receptor in nociception and inflammation caused by thermal injury model in the hind paw of mice. To this male Wistar rats (150-300 g) were used. First to choose the best dose of anionic cream containing the TRPA1 antagonist (HC-030 031, concentrations of 0.5, 0.05 and 0.005%) was used nociception model caused by subcutaneous administration in the right hind paw of allyl isothiocyanate (AITC 10 nmol/paw, TRPA1 agonist). In this model of nociception, it was observed that concentrations of 0.05 and 0.5% showed analgesic effect, then the concentration of 0.05% of anionic cream containing HC-030 031 was used to develop the thermal injury model (caused by bath, 70 ° C, 5 seconds). The positive control for the study of thermal injury model was silver sulfadiazine 1%. The animals were divided in this model Group 1 (untreated control), Group 2 (thermal injury without treatment), group 3 (burning and topical vehicle, anionic cream), group 4 (burn and topical application of silver sulfadiazine 1%), Group 5 (thermal injury and topical HC-030031 in the concentration of 0.05%). Thus, after application for 6 days of treatment (1 once daily topically to the right hind paw) nociception measures were assessed (static mechanical allodynia, dynamic heat allodynia, spontaneous pain and facial score nociception) and edema paw. And on day 6 were samples taken from the skin of the right hind paw subjected to thermal injury model to determine inflammation parameters (histological analysis and activity of myeloperoxidase and Nagase enzymes), oxidative stress (hydrogen peroxide dosage and measurement of enzyme activities oxidants - superoxide dismutase and NADPH oxidase) and immunoreactivity



TRPA1 receptor. According to the results it can be seen that the cream containing anionic HC-030031 produced antinociceptive effect in relation to different nociceptive parameters, similar effects were detected for the cream containing silver sulfadiazine. Furthermore, the anionic cream containing HC-030031 also reduced the edema and infiltration of inflammatory cells and the activity of myeloperoxidase and NAGase enzymes. Also, this preparation diminished parameters associated with oxidizing enzyme activity and the concentration of hydrogen peroxide, as well as TRPA1 receptor expression in hind paw skin after thermal lesion. The cream containing silver sulfadiazine also showed anti-inflammatory and antioxidant effect as well as reduced the immunoreactivity of the receptor in tissue TRPA1 paw skin. Thus, this study sought to determine new ways to treat pain and inflammation observed after thermal injury, focusing on TRPA1 receptor.

**Keywords:** hydrogen peroxide; HC-030031; silver sulfadiazine; NADPH oxidase; superoxide dismutase; allodynia.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Na dor inflamatória a lesão tecidual após dano térmico ou ainda infecção induz a infiltração de células inflamatórias (macrófagos e neutrófilos) que levam a produção e liberação de mediadores inflamatórios (como prostanoídes, bradicinina, citocinas, neuropeptídeos e espécies reativas de oxigênio), estes por sua vez são capazes de ativar e/ou sensibilizar os aferentes sensoriais (nociceptores) causando sensibilização do local afetado.....	29
Figura 2 - feito antinociceptivo (A) e antiedematogênico (B) do creme aniônico contendo HC-030031 (antagonista TRPA1) no modelo de dor aguda causado pela administração intraplantar de alil isotiocianato de alila (AITC, agonista TRPA1)..	50
Figura 3 A aplicação do creme aniônico contendo HC-030031 reduziu a alodinia mecânica estática e dinâmica, e também a hiperalgesia térmica causada pela lesão térmica na pata traseira de ratos.....	52
Figura 4 - A aplicação do creme aniônico contendo HC-030031 diminuiu comportamentos nociceptivos espontâneos induzidos por lesão térmica na pata traseira de ratos.....	54
Figura 5 - A aplicação do creme aniônico contendo HC-030031 diminuiu parâmetros inflamatórios causados por lesão térmica na pata traseira de ratos.....	56
Figura 6 - Efeito da aplicação do creme aniônico contendo HC-030031 sobre mudanças histológicas no tecido da pata em ratos submetidos a modelo de lesão térmica. ....	58
Figura 7 - Avaliação do conteúdo de peróxido de hidrogênio e atividades das enzimas NADPH oxidase e superóxido dismutase (SOD) após lesão térmica em ratos e efeito da aplicação do creme aniônico contendo HC-030031.....	60
Figura 8 - A expressão do receptor TRPA1 no tecido da pata após 6 dias da indução da lesão térmica ou grupo controle, e efeito do tratamento com HC-030031 e sulfadiazina de prata sobre este parâmetro..	62



## LISTA DE ABREVIATURAS

AITC	Alil isotiocianato
A $\delta$	Fibras A-delta
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
DRG	Gânglio da raiz dorsal
GN	Gânglio nodoso
GT	Gânglio trigêmeo
GV	Gânglio vagal
H&E	Hematoxilina-eosina
HTAB	Brometo de hexadeciltrimetilamônio
i.g.	Via intragástrica
i.pl.	Injeção intraplantar
IASP	Associação internacional para o estudo da dor
LFB	<i>Luxolfast blue</i>
MPO	Mieloperoxidase
NAGase	N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidase
pH	Potencial de hidrogênio
[ <sup>3</sup> H]-RTX	Resiniferatoxina radiotiva
RENAME	Relação nacional de medicamentos essenciais
SB – 366791	N-3-metilfenil/4- clorocinamida
SOD	Superóxido dismutase
SUS	Sistema Único de Saúde
TMB	Tetrametilbenzidina
TRP	Receptor de potencial transitório
UNESC	Universidade do Extremo Sul Catarinense



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>25</b>
1.1 FISIOPATOLOGIA DA DOR .....	25
1.2 DOR APÓS LESÃO TÉRMICA E TRATAMENTO .....	30
1.3 RECEPTOR DE POTENCIAL TRANSITÓRIO ANQUIRINA 1 (TRPA1) .....	36
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>40</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	40
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	40
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>42</b>
3.1 ANIMAIS .....	42
3.2 REAGENTES .....	42
3.3 MODELO DE NOCICEPÇÃO E EDEMA CAUSADO PELA ADMINISTRAÇÃO INTRAPLANTAR DE AITC .....	42
3.4 MODELO DE LESÃO TÉRMICA DA PATA TRASEIRA .....	43
<b>3.4.1 Avaliação dos parâmetros nociceptivos</b> .....	<b>44</b>
3.4.1.1 Alodínia mecânica estática .....	44
3.4.1.2 Alodínia mecânica dinâmica .....	44
3.4.1.3 Alodínia térmica ao calor .....	45
3.4.1.4 Nocicepção espontânea .....	45
3.4.1.5 Medida da alteração da expressão facial dos animais .....	45
<b>3.4.2 Medida do edema</b> .....	<b>46</b>
<b>3.4.3 Medidas de inflamação, estresse oxidativo e expressão do receptor TRPA1</b> .....	<b>46</b>
3.4.3.1 Marcadores de infiltração de leucócitos .....	46
3.4.3.2 Histologia .....	47
3.4.3.3 Dosagem dos níveis de peróxido de hidrogênio .....	47
3.4.3.5 Medida da atividade da NADPH oxidase e superóxido dismutase (SOD) .....	48
3.4.3.6 Extração de proteínas e ensaio de Western blot .....	48
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	49
3.6 A APLICAÇÃO DO CREME ANIÔNICO CONTENDO HC-030031 REDUZIU A NOCICEPÇÃO E EDEMA CAUSADO PELA ADMINISTRAÇÃO INTRAPLANTAR DE AITC .....	49
3.7. O CREME ANIÔNICO CONTENDO HC-030031 APRESENTOU EFEITOS ANTINOCICEPTIVOS NO MODELO DE LESÃO TÉRMICA DA PATA TRASEIRA .....	50
3.8 O CREME ANIÔNICO CONTENDO HC-030031 APRESENTOU EFEITOS ANTI-INFLAMATÓRIOS NO MODELO DE LESÃO TÉRMICA DA PATA TRASEIRA .....	54



3.9 APÓS O MODELO DE LESÃO TÉRMICA OCORREU AUMENTO DA EXPRESSÃO DO RECEPTOR TRPA1 E TAMBÉM DE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO QUE FORAM TRATADOS COM O USO DO CREME ANIÔNICO CONTENDO HC-030031.....	59
<b>4 DISCUSSÃO .....</b>	<b>63</b>
<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>71</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>73</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>89</b>
<b>ANEXO A - CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA.....</b>	<b>90</b>



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 FISIOPATOLOGIA DA DOR

A dor pode ser entendida como uma modalidade somatossensorial que envolve “um complexo grupo de experiências sensoriais, emocionais e cognitivas desagradáveis provocadas por dano tecidual real ou potencial, e manifestadas com diferentes reações autonômicas, psicológicas e comportamentais” (Terman e Bonica, 2003; Dubin e Patapoutian, 2010). Esta definição foi corroborada pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) quando considerou a dor como “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada à lesão tecidual real ou potencial, ou ainda descrita em termos que sugerem tal lesão” (Loeser e Treede, 2008). Assim, sabe-se que a percepção da dor não é apenas sináptica, mas multifatorial incluindo processos emocionais e cognitivos (memória/aprendizado, crenças e humor) (Loeser e Treede, 2008). Então o estudo desta sensação multimodal é muitas vezes complicado na prática clínica e nos estudos pré-clínicos, porém é de extrema importância para a busca de novas alternativas de tratamento para o controle e prevenção da dor aguda e crônica. (Stahl et al., 2009; Muley et al., 2016).

Pode-se perceber que a dor é uma experiência sensorial essencial à manutenção da vida, pois ela permite respostas motoras adequadas para prevenir possíveis danos teciduais, devido à detecção dos estímulos nocivos em potencial (Woolf, 2010). A respectiva importância desse mecanismo protetor é percebida, por exemplo, em casos de indivíduos que apresentam anomalias congênitas ou adquiridas que os fazem incapazes de detectar estímulos dolorosos, não tendo comportamento normal de proteção, podendo levar a infecções não percebidas, automutilação e menor expectativa de vida. (Basbaum et al., 2009; Bennett e Woods, 2014).

Algumas destas alterações descritas como canalopatias foram muito relevantes para especificar a importância dos canais iônicos periféricos na transdução da dor. Como foi o caso da alteração observada na insensibilidade congênita a dor após mutações no gene SCN9A que codifica o canal Nav1.7, uma forma de canal de sódio dependente de voltagem expresso apenas em neurônios sensoriais periféricos (Bennett e Woods, 2014). Além disso, mutações em genes que codificam outros canais iônicos como o receptor de potencial transitório anquirina 1 (TRPA1) causam ganho de função do canal induzindo uma forma familiar de síndrome dolorosa episódica (Kremeyer et al., 2010; Boukalova et al.,

2014). Assim, estas alterações em canais iônicos levam a modificações na percepção da dor são relevantes para o estudo de novas alternativas de tratamento para a dor.

Para estudar os processos fisiológicos que levam ao processamento e detecção da dor se faz necessário estudar como as fibras sensoriais são ativadas por estímulos nocivos de diferentes modalidades, como as térmicas, mecânicas ou químicas. As fibras sensoriais que tem a capacidade de serem ativadas por estímulos de alto limiar (aqueles que podem causar danos teciduais em potencial) são descritas como neurônios nociceptivos. Dessa forma, o processo fisiológico para a detecção e processamento de estímulos nocivos é definido como nocicepção e é este processo neural que pode ser estudado em animais de laboratório, como ratos e camundongos, porque neste caso não pode-se avaliar os processos afetivos, cognitivos e psicológicos da dor como ocorre em seres humanos (Dubin e Patapoutian, 2010; Loeser e Treede, 2008; Barrot, 2012). Dessa forma, atualmente compreende-se que o componente fisiológico da dor, a nocicepção, envolve os processos de transdução, transmissão e modulação dos estímulos nocivos, através dos nociceptores da pele ou demais tecidos. Estes, quando ativados estimulam vias neurais na medula espinhal e em estruturas supra-espinhais. (Loeser e Treede, 2008; Dubin e Patapoutian, 2010).

Portanto, as detecções dos estímulos dependem diretamente da capacidade do sistema somatossensorial de promover a transdução de estímulos nocivos em potenciais de ação e envolve inicialmente mecanismos periféricos como a ativação dos nociceptores. (Yu et al., 2008). Os nociceptores são terminações periféricas livres de axônios provenientes de neurônios sensoriais nociceptivos que possuem o corpo celular nos gânglios da raiz dorsal (DRG, para o corpo) ou trigêmeo (GT, para a face); ou nos gânglios nodoso (GN) e vagal (GV) para as vísceras podem ser ativados por estímulos nocivos mecânicos, térmicos ou químicos. Estes neurônios pseudo-unipolares possuem uma terminação axonal periférica e outra central que inerva o seu órgão-alvo e a medula espinhal, respectivamente. (Basbaum et al., 2009; Dubin e Patapoutian, 2010).

Na transmissão sensorial periférica, existem diferentes tipos de fibras aferentes especialmente relevantes para a detecção de estímulos nocivos, como as fibras A-delta ( $A\delta$ ), apresentando diâmetro médio e pouco mielinizadas, possuindo também condução de velocidade média, que moderam a dor aguda, localizada e rápida, e as fibras C que são não mielinizadas com pequeno diâmetro e apresentam condução do estímulo

com velocidade baixa, regulando um tipo de dor mais lenta, difusa, pulsante e moderada (Basbaum et al., 2009; Dubin e Patapoutian, 2010).

Após a ativação das fibras sensoriais periféricas a informação nociceptiva é conduzida ao corno dorsal da medula espinhal, onde ocorrerá a liberação de neurotransmissores excitatórios (como o glutamato e a substância P, principalmente). Após, estes causarão a ativação de neurônios nociceptivos de segunda ordem que então serão capazes de ativar vias supra-espinhais de sinalização da dor, como o tálamo, córtex somatossensorial e a amígdala. (Basbaum et al., 2009; Dubin e Patapoutian, 2010; Ossipov et al., 2010).

Porém a dor não deve ser entendida como um único sintoma clínico sendo melhor caracterizada quando classificada como dor nociceptiva (fisiológica), patológica ou ainda inflamatória. Mesmo que em todos estes casos os estímulos nocivos causem uma sensação desagradável, os mecanismos que levam a este processamento são diferentes em cada um dos casos e devem ser estudados de forma específica (Woolf, 2010). Muitas vezes a dor pode ser benéfica ao indivíduo quando ocorre de forma aguda, descrita como dor nociceptiva e inflamatória aguda, pois funciona como uma espécie de alerta de alterações de sua integridade e funcionalidade. Porém, no caso da dor patológica, este sintoma torna-se limitante à qualidade de vida do paciente e é muitas vezes intratável. (Woolf, 2011).

A dor nociceptiva é aquela sensação desagradável associada à lesão real ou potencial, quando, por exemplo, o tecido entra em contato com uma superfície quente como uma chama do fogão. Então, é uma forma de dor causada por estímulos de alto limiar e tem função protetora. Muitas vezes, após o desencadear desta sensação não é possível detectar lesão posterior no tecido atingido (Woolf, 2010).

A dor patológica é descrita como dor neuropática que tem origem a partir de lesões ou doença do sistema nervoso central ou periférico (Von Hehn et al., 2012). Neste caso, tem-se a presença de dor espontânea, como também hipersensibilidade à dor observada na forma de hiperalgesia e alodinia, tanto a estímulos químicos, mecânicos ou térmicos. A hiperalgesia é descrita como dor a estímulos já conhecidos como dolorosos, já a alodínia é a sensação de dor a estímulos normalmente inócuos. (Loeser e Treede, 2008; Von Hehn et al., 2012). Neste caso, a dor não tem aspecto protetor definido e muitas vezes levam a redução das atividades diárias e convívio social, depressão e ansiedade, e consequentemente menor capacidade de trabalho. (Von Hehn et al., 2012; Gilron et al., 2015).

No caso da dor inflamatória aguda, a hipersensibilidade é iniciada após lesão ou infecção tecidual e pode estar relacionada

com estruturas somáticas ou viscerais. Neste caso, ocorre ativação do sistema imune, com migração de células inflamatórias ao local da lesão e a produção de mediadores inflamatórios. (Kidd e Urban, 2001; Basbaum et al., 2009; Lipnik-Stangelj, 2013). A dor possui grande importância nesse processo, pois estimula a recuperação do local afetado e promove uma redução de possíveis danos posteriores. (Loeser e Treede, 2008; Woolf, 2010).

As características de hipersensibilidade observadas em um tecido inflamado e lesionado tratam-se possivelmente do resultado da ativação de células residentes, e também da infiltração de neutrófilos e macrófagos, como mostra a Figura 1. Estas células levam a produção e liberação de mediadores inflamatórios como as cininas, prostanoídes, aminas, quimiocinas, proteases, citocinas, neuropeptídeos e fatores de crescimento, gerando a redução no limiar à dor, e amplificando a resposta dos nociceptores que estão presentes no local inflamado. (Woolf, 2007; Loeser e Treede, 2008; Scholz e Woolf, 2010). Ocorre também o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio que podem facilitar a ativação de receptores nos aferentes sensoriais, como o TRPA1. (Andersson et al., 2008; Sawada et al., 2008; Kanta, 2011). Assim, a sensibilidade sensorial posterior à lesão é aumentada, causando o aparecimento de dor espontânea, hiperalgesia e alodínia; como formas de facilitar a recuperação do tecido lesado, como no caso da dor pós-operatória e após lesão térmica da pele (queimaduras). (Loeser e Treede, 2008; Woolf, 2010).

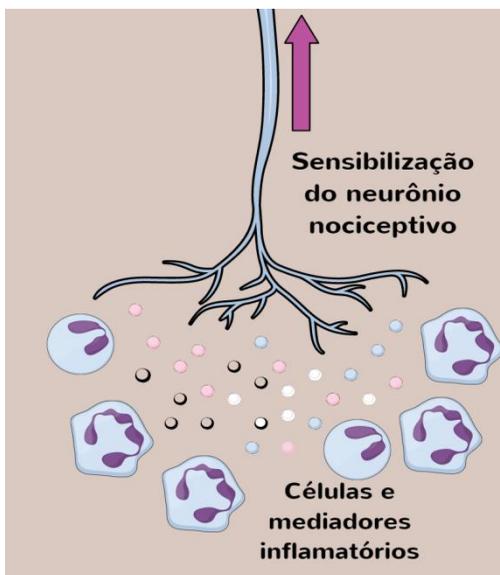


Figura 1 - Na dor inflamatória a lesão tecidual após dano térmico ou ainda infecção induz a infiltração de células inflamatórias (macrófagos e neutrófilos) que levam a produção e liberação de mediadores inflamatórios (como prostanoídes, bradicinina, citocinas, neuropeptídeos e espécies reativas de oxigênio), estes por sua vez são capazes de ativar e/ou sensibilizar os aferentes sensoriais (nociceptores) causando sensibilização do local afetado. Fonte: Do Autor.

Porém, mesmo que a dor inflamatória aguda tenha caráter protetor devem-se procurar maneiras para que haja uma redução da mesma, incluindo o caso de indivíduos acometidos por lesões térmicas (queimaduras). (Woolf, 2010; Gamst-Jensen et al., 2014). Ressaltando que, quando a dor após a lesão térmica não é controlada, pode ocorrer um aumento na incidência da dor crônica, depressão, e outros distúrbios psicológicos. (Richardson e Mustard, 2009; Gamst-Jensen et al., 2014). Já em casos de inflamação crônica a dor pode-se tornar um sintoma desagradável e sem caráter protetor, como na dor observada em artrites. (Loeser e Treede, 2008; Woolf, 2010). Dessa forma, a dor inflamatória, aguda ou crônica, é um dos principais sintomas clínicos para a busca por cuidados médicos nas unidades de saúde e também por fármacos para seu alívio. (Pal et al., 2009; Bautista et al., 2013; Muley et al., 2016; Xie et al., 2012).

## 1.2 DOR APÓS LESÃO TÉRMICA E TRATAMENTO

As queimaduras podem ser entendidas como lesões aos tecidos orgânicos, causadas normalmente devido à exposição a agentes externos, como a radiação solar, ao contato com superfícies quentes e chamas, ou ainda devido ao contato com líquidos em alta temperatura. (Bishop et al., 2007; Evers et al., 2010; Treede et al., 2015).

Esta forma de lesão é um problema de saúde pública no Brasil e em todo mundo, porém é observado um número consideravelmente maior desta forma de lesão em países em desenvolvimento ou pouco desenvolvidos. (Zou et al., 2015; Mcintyre et al., 2016; Who, 2016). Além de ser causa recorrente de morte, as queimaduras podem levar a morbidade considerável mesmo após recuperação do paciente, causando então redução da sua capacidade de trabalho e interação social. (Zou et al., 2015; Who, 2016).

De acordo com dados do Sistema Único de Saúde (SUS) através do DATASUS (Tecnologia da informação a serviço do Sistema Único de Saúde), no Brasil, no ano de 2015, ocorreram cerca de 13,500 mil de internações por exposição a causas externas de lesões acidentais, como contato com fonte de calor e substâncias quentes ou ainda outras fontes (exposição à fumaça, ao fogo e às chamas). Porém, mesmo que estes dados sejam alarmantes, o número exato de pessoas acometidas no Brasil por queimaduras é subdeterminado, devido à subnotificação. Existem estudos que estimam 1 milhão de casos a cada ano, ou seja, muito superior ao indicado pelo SUS (Gomes et al., 2001). Dessa forma, é provável que no Brasil, as lesões inflamatórias causadas por queimaduras possam ser consideradas como as principais responsáveis por ferimentos e mortes dentre as ocasionadas por causa externa.

O diagnóstico da queimadura é feito a partir do seu agente etiológico (diagnóstico etiológico), como, por exemplo, as queimaduras térmicas, por atrito, químicas, por radiação ou ainda por outras fontes como eletricidade (Piccolo et al., 2008). No Brasil, estudos relataram que os agentes etiológicos mais comuns para a indução de queimaduras foram os acidentes com álcool, com líquidos em altas temperaturas como água ou óleo, e pelo contato direto com chamas. A maioria destas queimaduras foram descritas como acidentais (Leão et al., 2011).

As queimaduras causadas por escaldamento são as mais comuns em crianças (principalmente até 3-5 anos), tanto no Brasil como em outros países em desenvolvimento ou desenvolvidos, devido a curiosidade relacionada à idade. Medidas para prevenção devem ser adotadas pelas famílias (Parbhoo et al., 2010; Zou et al., 2015). Queimaduras são a décima primeira causa mais frequente de morte na infância (entre 1 a 9 anos). Dessa forma, tratamentos que possam melhorar sintomas relacionados a esta forma de lesão é relevante.

Além de classificar as queimaduras de acordo com o seu agente etiológico pode-se também indicar o tipo de queimadura de acordo com a profundidade e extensão da lesão, pois provavelmente estes fatores irão influenciar diretamente no prognóstico da lesão térmica e na forma de dor que será observada. (Mcintyre et al., 2016).

Segundo a profundidade da lesão às queimaduras são subdivididas em três grupos: queimaduras de primeiro, segundo ou terceiro grau. (Monstrey et al., 2008; Walter et al., 2012; Serrano et al., 2015). A espessura da lesão é variável e é determinada muitas vezes de acordo com o agente etiológico que a causou. As queimaduras induzidas por líquidos em altas temperaturas são normalmente lesões de primeiro grau. Já aquelas causadas por chamas e contato com superfícies em altas temperaturas podem ser mais profundas (Summer et al., 2007; Richardson e Mustard, 2009).

Os danos causados e as complicações resultantes das queimaduras são amplamente variados, dependem diretamente da exposição, tecido e gravidade. Entre os diferentes órgãos e tecidos atingidos o mais comum é a pele, por estar mais exposta aos agentes, sendo o maior órgão do corpo humano. Ela recobre o corpo protegendo os demais órgãos, bem como, detecta diferentes sensações do organismo incluindo as dolorosas e o tato. Faz isso por meio das terminações nervosas que enviam ao cérebro informações sobre as alterações de pressão, temperatura, dor e traumas. (Dubin e Patapoutian, 2010; Grimm et al., 2011; William et al., 2015).

A pele é formada por três camadas: epiderme, derme e hipoderme; e dependendo da profundidade da lesão estas camadas serão atingidas ou não. (Richardson e Mustard, 2009; William et al., 2015). Como a epiderme é a camada mais externa é normal que seja sempre atingida por lesões térmicas, e assim tem-se a perda desta camada de proteção superficial, formada principalmente por queratinócitos, o que pode acarretar danos posteriores na derme e também infecções por bactérias (William et al., 2015). Na derme temos a presença de fibroblastos produzem colágenos e elastina, dentre outras substâncias, como também vasos sanguíneos e terminações nervosas sensoriais (para a detecção de

temperatura, umidade e estímulos nocivos ou ainda mecânicos não nociceptivos), danos causados por queimaduras neste local podem induzir a inflamação e ativação dos nociceptores. (Rowan et al., 2015; William et al., 2015).

Na queimadura de primeiro grau ocorre apenas lesão na epiderme, então a espessura da lesão não é extensa e não ocorre a formação de bolhas no tecido afetado. Os principais sintomas observados no local são edema e dor, com intensa inflamação e possível descamação da pele (3 a 7 dias após a indução da lesão). Na queimadura de segundo grau tem-se o envolvimento da derme além da epiderme, com recuperação do tecido em cerca de 7 a 21 dias após a queimadura. Neste caso, é provável que ocorra o aparecimento de bolhas sobre a lesão de duas formas: bolhas com base rósea, dolorosas e com aspecto úmido que indicam queimadura de segundo grau com profundidade superficial, bolhas com base branca e que podem ser indolores ou pouco dolorosas, e com aspecto seco que indicam lesão profunda da derme. (Monstrey et al., 2008; Piccolo et al., 2008; Serrano et al., 2015).

Já nas queimaduras de terceiro grau ocorre destruição da epiderme e da derme, e pode também ocorrer o comprometimento de tecidos mais profundos como nervos, cartilagens, músculos e ossos. Por comprometer a pele na sua extensão total, neste caso, após recuperação do tecido, não se tem reepitalização e devido à destruição dos terminais sensoriais na pele a lesão é indolor de forma aguda e apresenta aspecto rígido, podendo apresentar forma esbranquiçada ou escurecida. (Monstrey et al., 2008; Piccolo et al., 2008; Serrano et al., 2015).

Por outro lado, muitos pacientes podem desenvolver dor crônica de origem neuropática após queimaduras, ou ainda apresentam sintomas psicológicos de depressão e ansiedade, com o possível desenvolvimento de estresse pós-traumático. (Schneider et al., 2006; Öster et al., 2011; Xie et al., 2012; Mcintyre et al., 2016; Taverner e Prince, 2016). Dessa forma, tratamentos apropriados para a dor após a lesão é ainda questão de estudo, tanto para a dor inflamatória quanto neuropática. (Mcintyre et al., 2016). Assim, é comum que além do uso de fármacos analgésicos também sejam utilizados fármacos ansiolíticos durante o tratamento das queimaduras para minimizar estes efeitos psicológicos nos pacientes. (Gamst-Jensen et al., 2014).

Além de classificação das queimaduras de acordo com a sua espessura pode-se também observar a extensão das áreas corporais atingidas. Queimaduras com (mais de 20% da área de superfície corporal para adultos nas queimaduras de segundo grau, ou mais de 10% da área de superfície corporal para as queimaduras de terceiro grau são

consideradas de alta gravidade podem levar a respostas sistêmicas agudas que são coletivamente chamadas de choque causado pela lesão térmica. (Rowan et al., 2015). O paciente apresenta reações sistêmicas e locais, como hipovolemia e redução do débito cardíaco, causadas por aumento da permeabilidade e edema no espaço intersticial, além da possibilidade de sepse devido à redução da resposta imunológica e infecção por bactérias. (Rowan et al., 2015).

Lesões de pequena ou média gravidade as respostas metabólicas são menores; tem-se como um dos principais sintomas a dor aguda inflamatória. (Gamst-Jensen et al., 2014). A lesão de menor gravidade é considerada como aquela de primeiro grau, ou aquelas de segundo grau que atinjam até 10% da área corporal. Queimaduras de média gravidade são aquelas que ocorram nas mãos e pés, ou queimaduras de segundo grau com área corporal atingida entre 10% a 20%, ou queimaduras de terceiro grau com área corporal atingida de até 10% (Piccolo et al., 2008).

Também, após a lesão térmica pode-se dividir a ferida em três zonas, onde se observa diferentes formas de alterações no fluxo sanguíneo e alterações inflamatórias e teciduais. Dessa forma, pode-se encontrar uma região central onde se observa desnaturação de proteínas (processo que ocorre em temperaturas acima de 41°C), com sua posterior degradação e coagulação, gerando uma região de coagulação na área afetada, que provavelmente gerará necrose tecidual. Ao redor desta região tem-se uma zona de estase, este tecido encontra-se em hipóxia e isquemia o que pode também acarretar, se não houver tratamento, em necrose tecidual, devido à diminuição da sua perfusão sanguínea. A zona ao redor da área de estase é a aquela com hiperemia, pois apresenta grande vasodilatação devido a ação de substâncias inflamatórias. Esta zona normalmente não sofre necrose e tende a recuperar de forma mais rápida (Hettiaratchy; e Dziewulski, 2004; Kowalske, 2011; Nisanci et al., 2010; Tan et al., 2013). O desenvolvimento de necrose na área de estase já foi relacionado ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio. Estudos em ratos mostraram que o uso de um antioxidante (N-acetilcisteína) foi capaz de prevenir a necrose nesta região afetada (Deniz et al., 2013).

O processo de recuperação do tecido lesado após queimaduras passa por diferentes fases (Gurtner et al., 2008). Sendo assim, tem-se inicialmente uma fase inflamatória que conta com a grande infiltração de células (macrófagos e neutrófilos) devido ao processo de vasodilatação e extravasamento plasmático no local (gerando edema). Estes são capazes de iniciar uma resposta imunológica, causando o recrutamento continuado de macrófagos via mediadores denominados de quimiocinas.

Durante esta fase, o processo inflamatório auxilia a prevenir infecções e também degrada o tecido necrótico iniciando o reparo do tecido. (Reinke e Sorg, 2012).

Durante a fase inflamatória é necessário levar em conta que diferentes mediadores inflamatórios podem ser liberados no local da lesão, como: prostaglandinas, bradicinina, citocinas, óxido nítrico, histamina e também espécies reativas de oxigênio. (Horton, 2003; Parihar et al., 2008). Estas substâncias quando em contato com os terminais nociceptivos podem ocasionar a sensibilização dos nociceptores levando ao processo de sensibilização, tanto periférica, quanto central, e ocasionando a presença de sintomas nos pacientes como hiperalgesia e alodínia. (Xu et al., 2009; Chang e Waxman, 2010).

Um dos mecanismos envolvidos na resposta inflamatória e edema exacerbado observados em lesões térmicas é o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, como o peróxido de hidrogênio, devido à ativação de enzimas como a NADPH oxidase (reduz o oxigênio em íon superóxido) e a superóxido dismutase em células inflamatórias, como neutrófilos. (Hoşnüter et al., 2004; Parihar et al., 2008). Quando a produção de espécies reativas excede a capacidade do sistema antioxidante e ainda é excessiva para induzir apenas a morte bacteriana, leva ao risco de gerar danos teciduais (peroxidação lipídica) e ativação de receptores em nociceptores como o receptor de potencial transitório anquirina 1 (TRPA1) (Horton, 2003; Hoşnüter et al., 2004; Parihar et al., 2008; Raisinghani et al., 2011).

Já foi observado que a vitamina C pode reduzir o edema e a nocicepção em ratos após modelo de queimadura (Tanaka et al., 1999). Dessa forma, o uso de antioxidantes na prática clínica seria de grande interesse, podendo ter influência positiva no tratamento ao atuar no estresse oxidativo posterior à queimadura. (Rock et al., 1997). Foi evidenciado o envolvimento de espécies reativas em modelos animais de queimadura e em pacientes após lesão por queimaduras mostrando a sua participação no processo inflamatório (Bertin-Maghit et al., 2000; Lee et al., 2011; Silva et al., 2014).

Após e durante a fase inflamatória inicia-se a fase proliferativa. Nesta etapa ocorre a ativação e proliferação de queratinócitos e fibroblastos, onde estes auxiliarão no fechamento e restauração do tecido lesado, auxiliando na reestruturação da vascularização. (Werner et al., 2007; Pastar et al., 2014). Ao final deste processo de recuperação da ferida, a fase de remodelação conta com a produção e deposição de fibras de colágeno e elastina por fibroblastos, e também a maturação de miofibroblastos com capacidade de promover a contração da ferida.

(Snowden, 1984; Singer e Clark, 1999; Hinz, 2007). Então, com a recuperação do tecido, ocorre a reepitalização da área lesada, levando ao fechamento da ferida e a finalização do processo inflamatório. (Shih et al., 2010).

Além da preocupação com o processo de recuperação e cura do tecido afetado após a queimadura, as complicações metabólicas e a dor devem ser observadas e tratadas. A dor é um dos sintomas mais incapacitantes e devido à dificuldade de controle com os fármacos atualmente disponíveis na clínica representa um desafio (Cuttle et al., 2009; Richardson e Mustard, 2009; Mcgaraughty et al., 2010). Durante a queimadura o paciente apresenta dor aguda que pode ser causada pelo processo inflamatório instaurado no tecido, também devido a procedimentos realizados no local ou ainda devido a procedimentos cirúrgicos (Cuttle et al., 2009; Richardson e Mustard, 2009).

A dor observada em pacientes com queimaduras pode ser classificada de diferentes formas: (1) dor na própria ferida; (2) aquela devido a procedimentos no local lesado; (3) dor espontânea que normalmente ocorre na forma de dor em queimação; (4) dor que pode ser provocada por movimento do tecido lesado. Quando a dor persiste mesmo após a cura do tecido e induzem sensações semelhantes aquelas encontradas após lesões neuronais como o aparecimento de dor espontânea, sensações de formigamento e choque pode-se entender que o paciente apresenta dor neuropática após a queimadura (Mcintyre et al., 2016).

No caso de queimaduras de primeiro grau a dor aguda é acompanhada de edema e vermelhidão da área afetada, é normalmente tratada com o uso de analgésicos (ibuprofeno, naproxeno ou ainda paracetamol) (Marx et al., 2013). Em queimaduras de média e grande gravidade, além do uso de paracetamol podem ser utilizados fármacos opioides (morfina, oxicodona, fentanil, metadona e outros) ou ainda não-opioides (gabapentina, amitriptilina, clonidina, cetamina e outros). O uso de analgésicos não esteroidais não é indicado em pacientes com queimaduras de gravidade média ou grande devido aos riscos de induzir sangramentos e falência renal (Gamst-Jensen et al., 2014; McIntyre et al., 2016). Ainda, pode-se observar o aparecimento de dor neuropática acompanhada ou não por prurido, esta é normalmente controlada com o uso de fármacos não-opioides como a gabapentina e a amitriptilina, e é uma forma de dor resistente aos opioides. (Mcintyre et al., 2016). Porém, estes tratamentos não são efetivos em todos os pacientes e muitas vezes causam efeitos adversos, o que torna o tratamento tópico uma alternativa interessante principalmente relacionada a dor observada em queimaduras

de pequena e média gravidade (Burgess e Williams, 2010; Evers et al. 2010; Labuz e Machelska, 2013).

Além disso, estas formas de queimadura podem também serem tratadas com o uso de cremes no local para prevenir infecção e reduzir a perda de líquidos, como o uso de cremes contendo sulfadiazina de prata ou *Aloe vera*. (Maenthaisong et al., 2007; Singer e Dagum, 2008; Silverstein et al., 2012; Shahzad e Ahmed, 2013; Wasiak et al., 2013). O uso de cremes e curativos na local da lesão após a queimaduras auxiliam na recuperação do tecido e reduzem a possibilidade de infecção, diminuindo a dor também neste local devido ao contato. Para queimaduras de média e grande gravidade é sempre indicada esta forma de tratamento (Shupp et al., 2010; Cancio et al., 2012).

Diferentes formas de cobertura estão disponíveis como os cremes contendo sulfadiazina de prata, hidrogel, hidrocoloide e ainda outras formas de tratamento. (Shupp et al., 2010; Cancio et al., 2012). Os cremes contendo sulfadiazina de prata são uma forma de preparação que apresentam uso há mais de 30 anos e é aquela mais empregada em queimaduras de pequena e média gravidade, mesmo que seus efeitos sejam menores que aqueles observados para outras formas de cobertura. (Wasiak et al., 2008).

A sulfadiazina de prata tem ação antimicrobiana contra microorganismos gram-positivos e gram-negativos, fungos e anaeróbicos. (Ip et al., 2006; Nadworny et al., 2008; Bowler et al., 2015). Apesar do uso disseminado, a utilização de cremes contendo sulfadiazina de prata está associado a um efeito tóxico a queratinócitos e fibroblastos em ensaios *in vitro* (Fuller, 2009), e ainda pode causar alergia (Lee e Moon, 2003; Poon e Burd, 2004; Hussain e Ferguson, 2006; De Smet et al., 2009; Fuller, 2009). O uso da sulfadiazina de prata 1%, em creme está inclusa na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME). Este medicamento, parece ser o único indicado e disponibilizado pelo SUS, para uso tópico para o tratamento das lesões térmicas causadas pelo calor. Não se apresenta como cicatrizante e sim apenas como anti-infectante (Aparecida Rossi et al., 2010; Ferreira et al., 2003).

### 1.3 RECEPTOR DE POTENCIAL TRANSITÓRIO ANQUIRINA 1 (TRPA1)

Os receptores de potencial transitório são sensores celulares polimodais envolvidos em uma grande variedade de processos celulares

(Montell, 2005; Moran et al., 2011). Em mamíferos a família de canais TRP consiste de 28 diferentes proteínas agrupadas em seis famílias de acordo com a sua sequência de aminoácidos e sendo designadas como: TRPV (vanilóide), TRPC (canônico), TRPM (melastatina), TRPP (policistina), TRPML (mucolipina) e TRPA (anquirina) ( Montell e Birnbaumer, 2002; Clapham, 2003). Mutações nos receptores TRP têm sido relacionadas ao desenvolvimento de diferentes doenças, mostrando a importância destes canais em processos fisiológicos (Levine e Alessandri-Haber, 2007; Nilius, 2007). Recentemente, foi descrito que uma mutação com ganho de função para o receptor TRPA1 poderia levar a uma síndrome familiar de dor episódica, demonstrando a importância deste receptor para a transdução de estímulos dolorosos (Kremeyer et al., 2010). Assim, os receptores TRPA1 e TRPV1 (TRP Vaniloide 1 ) são aqueles principalmente estudados para a procura de novos analgésicos (Sasaki et al., 2011).

O receptor de TRPA1 é o único membro identificado da superfamília de receptores TRPA1, e originalmente conhecido como ANKTM1 (*ankyrin-like with transmembrane domains protein 1*), este foi identificado primeiramente em fibroblastos de pulmões fetais de humanos (Jaquemar et al., 1999). O receptor TRPA1 forma um canal para cátions não seletivo, sendo permeável principalmente ao cálcio (Levine e Alessandri-Haber, 2007). Este canal que inicialmente foi associado à detecção do frio nocivo (Story et al., 2003) hoje é principalmente associado ao desenvolvimento de alodínia mecânica e ao frio em condições inflamatórias (Macpherson et al., 2007; Mcnamara et al., 2007; Wesseldijk et al., 2008; Andrade et al., 2012).

O receptor TRPA1 possui aproximadamente 14 repetições do tipo anquirina em seu longo domínio amino-terminal (Cvetkov et al., 2011). Ele é geralmente expresso em subtipos específicos de neurônios sensoriais peptidérgicos nos GDRs, nos GTs, nos gânglios nodoso e vagal (Story et al., 2003; Nagata et al., 2005). Além disso, esse receptor tem importância na dor inflamatória e foi ressaltada quando Story et al. (2003) demonstraram a co-expressão entre TRPV1 (receptor ativado pelo princípio ativo da pimenta-vermelha, a capsaicina) e TRPA1 em muitos neurônios de pequeno diâmetro que contém substância P e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP).

Diferentes agonistas foram já identificados para o TRPA1 como alguns compostos derivados de plantas, nomeadamente isotiocianato de alila, cinamaldeído e alicina; isolados da mostarda, canela e alho, respectivamente, que são capazes de estimular o TRPA1 e causar dor espontânea em animais (Bandell et al., 2004; Jordt et al., 2004; Bautista

et al., 2005; Calixto et al., 2005; Mcgaraughty et al., 2010). Este canal pode ser também ativado por diversos poluentes industriais e irritantes ambientais (substâncias oxidantes exógenas), como a acroleína (2-propenal, encontrada na fumaça de cigarro). (Mcnamara et al., 2007; Baraldi et al., 2010; Andrade et al., 2012;).

Além disso, este canal é ativado por compostos endógenos reativos produzidos após dano tecidual e associados a condições dolorosas como o 4-hidroxi-nonenal, espécies reativas de oxigênio (como, por exemplo, o peróxido de hidrogênio, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ou de nitrogênio (Andersson et al., 2008; André et al., 2008; Bessac et al., 2008; Sawada et al., 2008; Keeble et al., 2009; Baraldi et al., 2010). Assim a interação entre o receptor TRPA1 e estes compostos altamente reativos é de grande relevância para o reconhecimento do dano celular, principalmente durante eventos inflamatórios e neuropáticos (Hinman et al., 2006; Macpherson et al., 2007; Bang e Hwang, 2009; Mcgaraughty et al., 2010).

A estimulação dos nociceptores contendo TRPA1 gera uma série de respostas pró-inflamatórias em um fenômeno denominado de inflamação neurogênica (Richardson e Vasko, 2002 e Geppetti et al., 2008), que compreendem fatores vasculares e não vasculares (Richardson e Vasko, 2002 e Geppetti et al., 2008). A ativação do canal TRPA1 por agonistas endógenos ou exógenos induz dor espontânea e inflamação neurogênica em modelos de nocicepção em roedores e também em humanos (Nilius, 2007; Andrade et al., 2012; Bautista et al., 2013).

Assim, diversos antagonistas TRPA1 foram testados em modelos de dor inflamatória causada por administração intraplantar ou intra-articular de adjuvante completo de Freund (modelos de dor inflamatória crônica) ou cristais de urato monossódico (modelo de ataque agudo de gota) em ratos e camundongos, e apresentaram efeito antinociceptivo e anti-inflamatório. A ativação deste receptor nestes modelos parece ser mediada via produção de mediadores inflamatórios ou ainda peróxido de hidrogênio (Peter-Szabo et al., 2007; Garrison e Stucky, 2014; Trevisan et al., 2014; Moilanen et al., 2015; Horváth et al., 2016), sendo assim este composto reativo tem sido associado a possível ativação do receptor TRPA1 em patologias dolorosas. Porém, ainda, não foi observado a participação do receptor TRPA1 em um modelo de dor inflamatória causada por queimadura por lesão térmica, já para o receptor TRPV1 existem evidências mostrando o seu envolvimento nesta forma de dor (Green et al., 2013).

Em um estudo recente foi observado um aumento na expressão do receptor TRPA1 em cicatrizes de queimadura que apresentavam também prurido em pacientes. E observado também que neuropeptídeos na

periferia (como o CGRP e a SP), foram aumentados nessas cicatrizes de queimadura. Estes resultados podem ajudar a determinar uma abordagem terapêutica específica para o prurido pós-queimadura (Yang et al., 2015)

Em pacientes com queimaduras, o tratamento ao danos causados durante e após a recuperação da ferida ainda está longe do ideal, principalmente para o controle da dor (Cuttle et al., 2009; Richardson e Mustard, 2009). Dessa forma, além do envolvimento de espécies reativas e do processo inflamatório no desenvolvimento da queimadura, o receptor TRPA1 poderia ser um mediador deste processo inflamatório, sendo que este canal é ativado por espécies reativas e também sensibilizado por mediadores inflamatórios, podendo então participar da manutenção do processo de dor inflamatória observada. Portanto o objetivo desse estudo foi avaliar a participação do receptor TRPA1 na nocicepção e inflamação provocadas por modelo de lesão térmica na pata traseira de ratos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a participação do receptor TRPA1 na nocicepção e inflamação provocadas por modelo de lesão térmica na pata traseira de ratos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Investigar o efeito antinociceptivo e antiedematogênico do creme não aniônico contendo o antagonista TRPA1 (HC-030031) em diferentes concentrações no modelo de nocicepção e edema causado pela administração intraplantar do agonista TRPA1 (AITC);
2. Observar o efeito antinociceptivo do creme não iônico contendo o antagonista TRPA1 (HC-030031) em um modelo de lesão térmica na pata traseira de ratos;
3. Investigar o efeito anti-inflamatório (edema de pata e atividade das enzimas mieloperoxidase e NAGase) do antagonista do creme não iônico contendo o antagonista TRPA1 (HC-030031) em um modelo de lesão térmica na pata traseira de ratos;
4. Avaliar por análise histológica a migração de células inflamatórias após a aplicação do creme não iônico contendo o antagonista TRPA1 (HC-030031) em um modelo de lesão térmica na pata traseira de ratos;
5. Verificar o conteúdo do agonista endógeno do receptor TRPA1 (peróxido de hidrogênio), a atividade de enzimas oxidantes (superóxido dismutase e NADPH oxidase) em um modelo de lesão térmica na pata traseira de ratos após o tratamento com o creme não iônico contendo o antagonista TRPA1 (HC-030031).
6. Avaliar a imunoreatividade para o receptor TRPA1 em um modelo de lesão térmica na pata traseira de ratos após o

tratamento com o creme não iônico contendo o antagonista TRPA1 (HC-030031).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar machos (150-300 g) criados no biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense. Os protocolos experimentais foram submetidos para a avaliação pelo Comitê de ética da Unesc (CEUA) obtendo a aprovação do mesmo através do protocolo número 020/2015-2 (com adendo ao protocolo de número 008/2015-2). Os animais foram mantidos em um ambiente controlado ( $22 \pm 2$  °C), com um ciclo de 12 horas de luz e escuro e alimentados com ração padrão e água *ad libitum*. Antes dos experimentos, os animais foram aclimatizados no laboratório durante pelo menos 1 hora. Todos os experimentos foram realizados entre 08:00 – 17:00 horas. Os protocolos experimentais estão em conformidade com as diretrizes éticas atuais para a investigação de dor experimental em animais da Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) (Zimmermann, 1983). Além disso, o número de animais e a intensidade de estímulo nocivo foram os mínimos necessários para demonstrar os efeitos consistentes dos tratamentos. A avaliação comportamental foi realizada de forma cega no que diz respeito à administração de drogas.

#### 3.2 REAGENTES

Os reagentes foram comprados no Sigma Aldrich Chemical Co. (St. Louis, USA). O creme não iônico contendo os tratamentos (HC-030031 ou sulfadiazina de prata) foram preparados em diferentes concentrações (0,005; 0,05 e 0,5%) por incorporação dos solutos no creme já pronto. O creme não iônico foi comprado a partir de farmácia de manipulação em Criciúma, com composição de Lanette (12 g), vasilina sólida (11 mL), propileno glicol (7 mL), solução conservante de parabenos (3,3 g), solução conservante de imidazolidinilureia a 50%, e água destilada (100 g).

#### 3.3 MODELO DE NOCICEPÇÃO E EDEMA CAUSADO PELA ADMINISTRAÇÃO INTRAPLANTAR DE AITC

Para determinar a concentração indicada do creme aniônico contendo HC-030031 (antagonista TRPA1) foi utilizado um modelo de nocicepção e edema que não provoca inflamação crônica nos animais, que

é a administração intraplantar de AITC (agonista natural do receptor TRPA1). Então, para isso os animais foram administrados por via tópica (pata traseira direita, 10 minutos antes do teste) com o creme aniônico contendo HC-030031 nas concentrações de 0,005; 0.5 ou 0.5%. Em seguida, os animais foram divididos em 4 grupos (creme aniônico, creme aniônico contendo 0005; 0.05 e 0.5% de HC-030031, 200 mg/pata) com 5 animais em cada. Após 10 minutos da administração, foi aplicado o AITC na dose de 1 nmol/pata (100 µL de volume) de forma subcutânea na pata traseira direita. O comportamento nociceptivo (lamber a pata) foi cronometrado por 5 minutos. O edema de pata foi verificado após 15 minutos da administração de AITC (usando um paquímetro digital) (Hoffmeister et al., 2010; Trevisan et al., 2013). A partir destes dados, foi escolhida a melhor concentração do creme contendo HC-030031 (0,05%), e esta foi utilizada para realizar o modelo da lesão térmica de pata traseira.

### 3.4 MODELO DE LESÃO TÉRMICA DA PATA TRASEIRA

Para realizar o modelo de lesão térmica os animais foram expostos ao calor (banho-maria, 70 °C). Para isso todos os animais foram anestesiados com cetamina (90 mg/kg, intraperitoneal) e xilazina (30 mg/kg, intraperitoneal), e após a pata traseira direita foi exposta ao banho-maria na temperatura de 70°C por 5 segundos (para mimetizar uma queimadura de média gravidade) (Silva et. al., 2013). No grupo controle a pata traseira direita foi colocada em banho-maria na temperatura de 37 °C por 5 segundos nos animais também anestesiados. Depois que o procedimento for aplicado, o animal foi colocado novamente na caixa e retornará ao biotério. Os animais foram observados até recuperarem da anestesia e para isso foram mantidos em ambiente aquecido. As medidas de nocicepção e edema foram realizadas de 1 a 6 dias após a indução de lesão térmica ou no grupo controle. A aplicação dos tratamentos iniciou-se logo após a lesão térmica e foi realizada por 6 dias.

Assim, no modelo de lesão térmica de pata foram utilizados cinco grupos contendo 7 animais em cada grupo experimental (total de 35 animais):

- Grupo 1 - controle sem tratamento;
- Grupo 2 - lesão térmica sem tratamento;
- Grupo 3 - lesão térmica e aplicação tópica de creme aniônico;
- Grupo 4 - lesão térmica e aplicação tópica de creme aniônico contendo sulfadiazina de prata a 1% (controle positivo);

- Grupo 5 - lesão térmica e aplicação tópica creme aniônico contendo HC-030031 0,05% (concentração com maior eficácia escolhida no teste do AITC).

### 3.4.1 Avaliação dos parâmetros nociceptivos

A avaliação dos parâmetros nociceptivos foi realizada antes (medidas basais) e após 1 a 6 dias da indução da lesão térmica (dias 1, 2, 3, 4, 5 e 6). Dessa forma estas medidas auxiliaram na determinação da atividade antinociceptiva dos tratamentos em teste (Silva et al., 2013).

#### 3.4.1.1 Alodínia mecânica estática

Para avaliar a alodínia mecânica estática os ratos foram individualmente colocados em caixas de acrílico claros (9 cm × 7 cm × 11 cm) em plataformas elevadas, de malha de arame para acesso a superfície ventral das patas traseiras (Trevisan et al., 2014; Silva et al., 2013). Após um período de habituação (30 minutos) a superfície plantar da pata traseira foi tocada com uma série de sete filamentos de Von Frey (1, 2, 4, 6, 8, 10 e 15 g). Os monofilamentos de Von Frey foram aplicados perpendicularmente na face plantar para provocar uma ligeira deformação e foram detidos por aproximadamente 2 s. O limiar de retirada de 50% foi determinado utilizando o método de *up-and-down* (Dixon et al., 1980; Chaplan et al., 1994). Neste paradigma, o teste foi iniciado com o monofilamento de 6 g. Os estímulos foram sempre apresentados consecutivamente; seja em ordem crescente ou decrescente. Então quando um determinado estímulo causar resposta de retirada o estímulo subsequente foi diminuído de intensidade, e se não causar resposta de retirada o estímulo subsequente foi aumentado de intensidade, até completar 6 aplicações.

#### 3.4.1.2 Alodínia mecânica dinâmica

A resposta dinâmica a um estímulo mecânico não nocivo foi medida de acordo com a resposta ao estímulo utilizando um pincel (Silva et al., 2013). Os ratos foram colocados em caixas de acrílico claros (9 cm × 7 cm × 11 cm) em plataformas elevadas, de malha de arame para acesso a superfície ventral das patas traseiras e um estímulo com pincel suave foi usado para esfregar a área dorsal da pata por 15 segundos. A resposta de retirada da pata no prazo de 15 segundos foi considerada como alodínia

mecânica dinâmica, dessa maneira foi cronometrado o tempo que o animal iriá demorar para retirar a pata do estímulo.

#### 3.4.1.3 Alodínia térmica ao calor

Para avaliar a alodínia térmica ao calor não nocivo foi aplicado o teste de imersão da pata em banho-maria na temperatura de 30°C (Silva et al., 2013). Este estímulo de baixa intensidade produz latências basais de aproximadamente 15 segundos. A latência de retirada da pata foi registrada com um cronômetro. O tempo máximo de exposição ao estímulo foi de 20 segundos.

#### 3.4.1.4 Nocicepção espontânea

A avaliação do comportamento espontâneo dos ratos foi realizado observando uma série de medições relacionadas a alterações de marcha, e movimentos nociceptivos da pata traseira direita. O tempo gasto demonstrando qualquer um destes comportamentos foi medido durante 5 minutos com um cronômetro e definido como o tempo de nocicepção espontânea (Silva et al., 2013).

#### 3.4.1.5 Medida da alteração da expressão facial dos animais

Esta medida é utilizada para avaliar comportamentos semelhantes à dor em animais. Para avaliar a expressão facial dos animais, eles foram colocados em caixas de acrílico transparente (21 cm × 10.5 cm × 9 cm), o animal foi filmado com o uso de uma câmara digital de alta resolução posicionada na parte frontal e traseira da caixa por 30 minutos. Os animais foram então avaliados antes (basal) e após a administração da substância (teste). Após, com o auxílio de um programa (*Rodent Face Finder*®) foram selecionadas diferentes imagens do animal em que a face aparece em uma posição ideal para avaliar a expressão facial. Em seguida, as imagens foram inserida no programa *PowerPoint* e foram organizadas de forma randomizada para avaliação, para isso, utilizou-se o programa *PowerPoint macro* (<http://www.tushar-mehta.com/powerpoint/randomslideshow/index.htm>). Dessa maneira, as imagens foram analisadas através de escores pré-definidos de 0 a 2, dependendo da intensidade da dor (0- sem modificações, 1 – moderada, e 2 – evidente) (Sotocinal et al., 2011). Assim, foram observadas mudanças nos olhos e na região periorbital, nas orelhas, no nariz e nas vibrissas do animal.

### 3.4.2 Medida do edema

A formação do edema induzido por lesão térmica foi considerado como o aumento da espessura da pata medido com paquímetro digital (Silva et al., 2013). A espessura da pata foi verificada em vários momentos após (1-6 dias) da lesão térmica e comparados aos valores basais (antes lesão térmica).

### 3.4.3 Medidas de inflamação, estresse oxidativo e expressão do receptor TRPA1

Após 6 dias da indução da lesão térmica os animais sofrerão eutanásia através de método químico (primeiramente pré-anestesiados com diazepam, 5 mg/kg/mL) posteriormente foi utilizado tiopental 50 mg/kg/mL (10 mg/mL). Após as amostras da pele da pata foram retiradas e utilizadas para a determinação das medidas de inflamação, estresse oxidativo e expressão do receptor TRPA1.

#### 3.4.3.1 Marcadores de infiltração de leucócitos

Para estimar a infiltração de células inflamatórias na pata após uma lesão térmica, amostras de pele da pata foram coletadas para estimar a atividades da mieloperoxidase (MPO) e N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAGase), marcadores de infiltração de neutrófilos e macrófagos, respectivamente (Lloret e Moreno, 1995, Suzuki et al., 1983). Em primeiro lugar, as amostras foram homogeneizadas em tampão de acetato de sódio (8 mM, pH 5,5) contendo HTAB 0,5%, centrifugadas, e o sobrenadante recolhido. Após, ao sobrenadante foram adicionados tampão acetato (200 mM, pH 5,4) e 3,3',5,5' tetrametil-benzidina (TMB, 18,4 mM) e incubados a 37 °C durante 3 minutos. Para terminar a reação, as microplacas foram incubadas num banho de gelo, e foi adicionado ácido acético. A cor formada foi determinada a 630 nm com o uso de um espectrofotômetro.

Para a mensuração da atividade NAGase, o sobrenadante foi incubado com 4-nitrofenilo N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminida (2,24 mM). Após a incubação, tampão de glicina (0,2 uM; pH 10,4) foi adicionado para terminar a reação e para permitir o desenvolvimento de cor, que foi medida a 405 nm. Os valores foram expressos como densidades ópticas corrigidas para o teor de proteína. A absorbância de todas as reações foi medida utilizando leitor de placas *Fisher Biotech Microkinetics Reader BT 2000*. Os valores foram expressos como densidade óptica corrigida

pela concentração de proteína. A concentração de proteína foi medida utilizando o método descrito por Bradford (1976).

### 3.4.3.2 Histologia

Para confirmar a infiltração de leucócitos nos tecidos das patas traseiras direitas dos animais que receberam ou não receberam uma lesão térmica, e com diferentes tratamentos, foram realizadas análises histológicas. A pele da pata foi removida e pós-fixada por 24 horas na mesma solução (paraformaldeído 4%), e em seguida embebida em parafina após desidratação e diafanização, após estas foram seccionadas em cortes de 5  $\mu\text{m}$  de espessura. As análises histológicas dos focos inflamatórios foram realizadas com hematoxilina-eosina (H&E) e *luxolfast blue* (LFB). A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico (Eclipse 50i, Nikon, Melville, NY, EUA), com aumento de 200x, sendo que quatro campos oculares por corte (7 animais/grupo) foram capturados. As imagens foram registradas com auxílio da câmera Nikon (Sight DS-5M-L1, Melville, NY, EUA) e analisadas utilizando o software NIH ImageJ 1.36b (NIH, Bethesda, MD, EUA), considerando a coloração nuclear das células inflamatórias (H&E) (Oliveira et al., 2011).

### 3.4.3.3 Dosagem dos níveis de peróxido de hidrogênio

O possível aumento da concentração de peróxido de hidrogênio (agonista TRPA1) foi observado na pele da pata (Trevisan et al., 2014). Para isso, as amostras foram homogeneizadas em 4 °C por 30 segundos cada, com 0,3 mL de tampão fosfato (50 mM – pH 7.4), contendo 5 mM de azida de sódio. O homogenato foi centrifugado à 10.000 x g à 4°C por 20 minutos. O conteúdo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi determinado pelo método de vermelho de fenol utilizando a peroxidase de rabanete. A cada 200  $\mu\text{L}$  do ensaio, 50  $\mu\text{L}$  do homogenato sobrenadante e 50  $\mu\text{L}$  de vermelho de fenol (200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e HRPO (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) foram adicionados e incubados à 25°C por 10 minutos. Ao final da incubação, 10  $\mu\text{L}$  de NaOH 1 M foram adicionados e, em seguida, a absorbância foi determinada espectrofotometricamente a 610 nm. Os resultados finais foram expressos como equivalentes de nanomols de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por mg de proteína, sobre a base de uma curva padrão de oxidação mediada por HRPO, de vermelho de fenol por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A reação foi lida em um leitor microcinético (Fisher Biotech BT, 2000). Os valores foram expressos como densidade óptica,

corrigida pela concentração de proteína, que foi mensurado pelo método de Bradford (1976).

#### 3.4.3.5 Medida da atividade da NADPH oxidase e superóxido dismutase (SOD)

A atividade da NADPH-oxidase foi observada em amostras da pele da pata utilizando um kit de ensaio comercialmente disponíveis (CY0100, citocromo c redutase, NADPH Kit de Ensaio, Sigma-Aldrich, Milão, Itália). Resumidamente, a pele da pata foi homogeneizada em 50 mM de tampão de fosfato (pH 7,4) e centrifugada durante 10 minutos a 3000 x g a 4 °C, e o sobrenadante foi centrifugado durante 40 minutos a 10.000x g a 4 °C. O sobrenadante final foi utilizado para determinação da atividade da NADPH oxidase. Os valores foram expressos como U/ul de amostra. Para mensurar a atividade da SOD a amostra de tecido foi homogeneizada em tampão Tris-HCl (100 mM, pH 7,4; 100 mM de sacarose, 10 mM de EDTA e 46 mM de KCl), e centrifugada a 2.000 x g a 4 °C durante 3 minutos. Depois, a amostra (20 µl) foi misturada com adrenalina (20 µl, 60 mM) e tampão de glicina (1,000 mL, 50 mM, pH 11) incubadas a 33 °C, e as alterações na absorbância foram observadas a 480 nm e monitoradas durante 5 minutos. A reação foi lida em um leitor microcinético (Fisher Biotech BT, 2000). Os valores foram expressos como densidade óptica, corrigida pela concentração de proteína, que foi mensurado pelo método de Bradford (1976).

#### 3.4.3.6 Extração de proteínas e ensaio de Western blot

O possível aumento da expressão dos receptores TRPA1 na pele da pata após a indução de queimadura foi realizado por análise de western blot (Trevisan et al., 2014.) Para isso, as amostras de pele de pata obtidas foram homogeneizadas em tampão de lise contendo (em mM): 50 Tris, 150 NaCl, 2 EGTA, 100 de NaF, 1 Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, Nonidet P40 a 1%, pH 7,5, e um conjunto de inibidores de protease (Roche, Basel, Switzerland). Os lisados foram centrifugados a 14.000 x g, a 4 °C durante 10 minutos. A concentração de proteína no sobrenadante foi determinada usando o kit ensaio da Bio-Rad DC proteína. Cada amostra teve uma alíquotas contendo 30 µg de proteína totais aplicada em um gel de 10% SDS-poliacrilamida e as proteínas foram então separadas e transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Merck Millipore Billerica, MA). Em seguida, as membranas foram incubadas com uma solução contendo 5% de leite em pó em tampão Tris e 0.1% de Tween 20 (TBST, 20 mM Tris,

pH 7.5, NaCl 150 mM) durante 1 hora à temperatura ambiente, e após foram incubadas com anticorpo policlonal primário de coelho para detecção da proteína TRPA1 (Novus Biologicals, Littleton, CO, USA, diluição 1:200) ou anticorpo monoclonal primário de camundongo para  $\beta$ -actina (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA, diluição 1:5000), a 4°C durante a noite. As membranas foram então marcadas com anticorpo IgG anti-coelho ou anti-mouse (Bethyl Laboratories Inc., Cambridge, UK; diluição 1:3000) durante 50 minutos à temperatura ambiente. Então, as membranas foram lavadas três vezes com TBS-Tween e os anticorpos ligados foram detectados utilizando reagentes de quimioluminescência (ECL, Pierce, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). A densidade das bandas específicas foi observada utilizando um programa de processamento de imagem (ImageJ 1.32J, Wayne Rasband, USA) e normalizadas contra um controle ( $\beta$ -actina).

### 3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média e foram analisados estatisticamente por teste “t” de *Student* ou análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias conforme o protocolo experimental, seguido do pós-teste de Bonferroni quando necessário. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando os valores de *P* forem menores que 0,05 ( $P < 0,05$ ) utilizando o programa GraphPad Prism 5.04. RESULTADOS

### 3.6 A APLICAÇÃO DO CREME ANIÔNICO CONTENDO HC-030031 REDUZIU A NOCICEPÇÃO E EDEMA CAUSADO PELA ADMINISTRAÇÃO INTRAPLANTAR DE AITC

Foi observado que a aplicação prévia do creme aniônico contendo HC-030031, nas concentrações de 0,05 e 0,5%, foi capaz de reduzir a nocicepção e edema causados pela administração intraplantar do agonista do canal TRPA1 (AITC, 10 nmol/pata). As concentrações de 0,05 e 0,5% apresentaram percentagem de inibição de  $71 \pm 13$  e  $76 \pm 6\%$  para o efeito antinociceptivo nocicepção, e de  $76 \pm 8$  e  $60 \pm 8\%$  para a ação anti-edematogênica (Figura 2A e 2B). Como não foram identificadas diferenças significativas entre as duas concentrações de 0,05 e 0,5%, a concentração de 0,05% foi escolhida para continuar o estudo do efeito do antagonista TRPA1 sobre o modelo de dor inflamatória causada por lesão térmica em ratos.

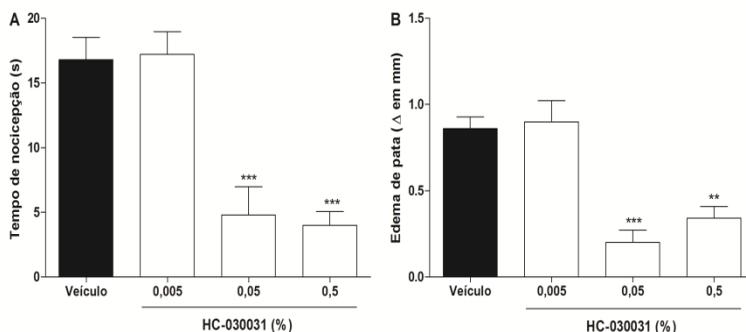


Figura 2 - feito antinociceptivo (A) e anti edematogênico (B) do creme aniônico contendo HC-030031 (antagonista TRPA1) no modelo de dor aguda causado pela administração intraplantar de alil isotiocianato de alila (AITC, agonista TRPA1). O creme aniônico contendo HC-030031 (0,005; 0,05; ou 0,5%) ou veículo (apenas creme aniônico) foram aplicados na pata traseira direita dos animais 10 minutos antes da administração intraplantar de AITC (1 nmol/pata; 100  $\mu$ L). O efeito antinociceptivo foi mensurado por 5 minutos, e o efeito anti edematogênico após 15 minutos após a administração de AITC. O edema de pata representa a diferença entre a espessura de pata após a administração de AITC e o valor basal. Os dados foram representados como média + S.E.M. (n = 5 animais). \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ; quando comparado ao grupo tratado com veículo (ANOVA de uma via seguida de do teste post hoc Bonferroni).

### 3.7. O CREME ANIÔNICO CONTENDO HC-030031 APRESENTOU EFEITOS ANTINOCICEPTIVOS NO MODELO DE LESÃO TÉRMICA DA PATA TRASEIRA

Os comportamentos nociceptivos foram mensurados por 6 dias após a lesão térmica, e os tratamentos foram realizados após a lesão e então por mais 5 dias, não houve tratamento no sexto dia após a lesão térmica. Inicialmente, deve-se considerar que a lesão térmica da pata traseira dos animais induziu comportamentos relacionados a dor como alodínia mecânica estática que foi observada como uma redução drástica do limiar mecânico de resposta aos filamentos de von Frey do dia 1 a 6 após a lesão (com valores médios de 15 g para o grupo controle e 1,32 g para o grupo com lesão térmica, 6 dias após a lesão,  $P < 0,001$  teste “t” de *Student*) (Figura 3A). Considerando os animais que foram tratados com a aplicação tópica de creme aniônico contendo HC-030031 (0,05%), este

grupo apresentou efeito anti-alodínico para a alodínia mecânica estática dos dias 4 a 6 após o tratamento com percentagem de inibição de  $43 \pm 10\%$  (no sexto dia após a lesão térmica) (Figura 3A). Efeito similar foi observado para aplicação tópica de creme aniônico contendo sulfadiazina de prata a 1% (controle positivo), que apresentou efeito do dia 4 ao 6 após a lesão térmica com percentagem de inibição de  $44 \pm 15\%$ , 6 dias após a lesão térmica (Figura 3A).

A indução de lesão térmica também causou alodínia mecânica dinâmica do primeiro ao sexto dia após a lesão térmica, como observado os com valores médios calculados para o grupo controle foram de 15 segundos para o grupo controle e 4,82 para o grupo com lesão térmica (5 dias após a lesão,  $P < 0,001$  teste “t” de *Student*) (Figura 3B). De forma semelhante, a aplicação do creme contendo HC-030031 ou sulfadiazina de prata reduziram a alodínia mecânica dinâmica após 2 a 6 dias da lesão e as percentagens de inibição observadas foram de  $89 \pm 5$  e  $67 \pm 11\%$ , respectivamente (5 dias após a lesão térmica) (Figura 3B).

Também, foi observado o desenvolvimento de alodínia térmica ao calor após 1 a 6 dias da indução de lesão térmica, com valores médios de 12,4 s para o grupo controle e 3,5 g para o grupo com lesão térmica, 6 dias após a lesão,  $P < 0,001$  teste “t” de *Student* (Figura 3C). Quando observado o efeito destas preparações sobre a alodínia térmica ao calor, foi observado um efeito antinociceptivo para o creme aniônico contendo HC-030031 ( $47 \pm 6\%$  de inibição no dia 6 após a lesão) ou sulfadiazina de prata ( $57 \pm 6\%$  de inibição no dia 6 após a lesão) dos dias 3 a 6 após a lesão (Figura 3C). De forma diferente, a aplicação tópica apenas do creme aniônico não causou redução da alodínia mecânica estática, dinâmica, ou térmica ao calor observado neste modelo.

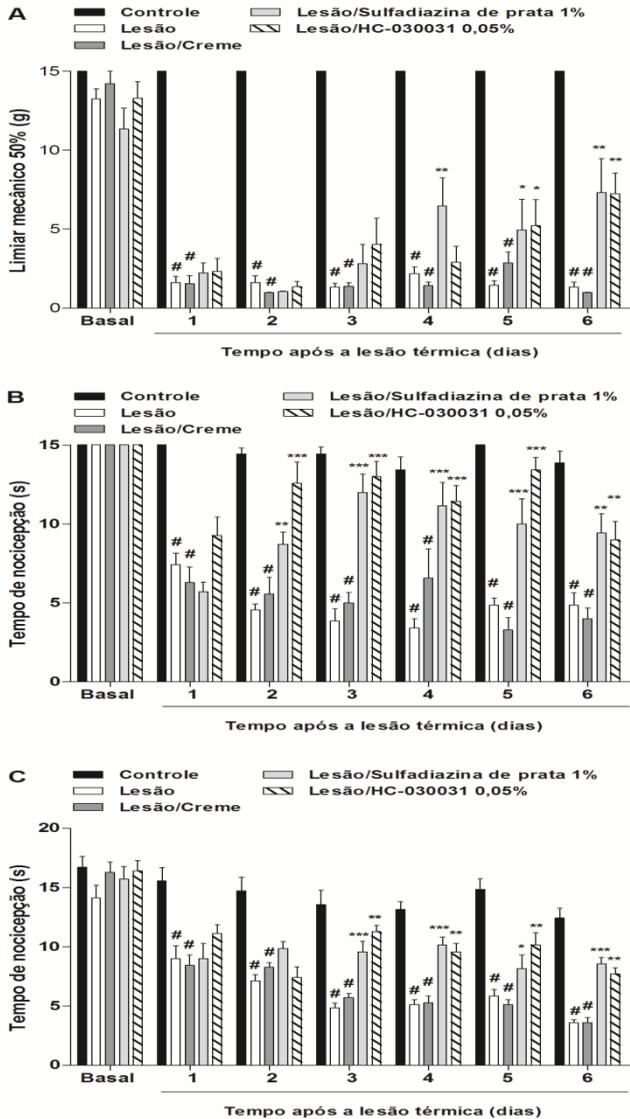


Figura 3 A aplicação do creme aniônico contendo HC-030031 reduziu a alodinia mecânica estática e dinâmica, e também a hiperalgesia térmica causada pela lesão térmica na pata traseira de ratos. Os comportamentos nociceptivos como (A) alodínia mecânica estática ou (B) dinâmica e (C) hiperalgesia térmica ao calor foram avaliados de 1 a 6 dias após a lesão. Os tratamentos como o creme aniônico

contendo HC-030031 (0,05%), sulfadiazina de prata (1%) ou veículo (apenas o creme) foram aplicados após a lesão térmica por 6 dias. O grupo controle (sem lesão) ou lesão não receberam tratamento tópico. As medidas basais foram representadas como B no gráfico, e são os valores medidos antes da indução da lesão. Os dados foram representados como média + S.E.M. ( $n = 7$ ).  $\#P < 0.001$ , quando comparado ao grupo controle;  $*P < 0.05$ ;  $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$ , quando comparado ao grupo lesão (ANOVA de duas vias seguida do teste post hoc Bonferroni).

Além disso, a lesão térmica também provocou nocicepção espontânea do 1 até o dia 6 após a lesão, onde o grupo controle apresentou valor de 3 segundos e o grupo com lesão térmica 17 segundos (4 dias após a lesão,  $P < 0,05$  Student's t-test). A aplicação do creme contendo HC-030031 mostrou efeito antinociceptivo em relação à nocicepção espontânea nos dias 2, 4, 5 e 6 após a lesão; com  $48 \pm 9\%$  de inibição no quarto dia após a lesão (Figura 4A). Também o creme contendo sulfadiazina de prata apresentou efeito antinociceptivo nos dias 4, 5 e 6 após a lesão, com  $67 \pm 8\%$  de inibição no dia 4 após a lesão (Figura 4A). Também, foi observado que houve alteração da expressão facial dos animais quando comparado ao grupo controle (sem lesão), com valor de mediana para os escores de 0 e 2, respectivamente ( $P < 0,05$  teste "t" de Student) (Figura 4B). Quando avaliada a alteração da expressão facial dos animais após a aplicação do creme contendo HC-030031 ( $36 \pm 9\%$  de inibição no dia 6 após a lesão) ou sulfadiazina de prata ( $36 \pm 9\%$  de inibição no dia no dia 6 após a lesão) foi observado um efeito antinociceptivo nos dias 5 e 6 após a lesão para o HC-030031 e apenas no sexto dia após a lesão para a sulfadiazina de prata (Figura 4B). Entretanto, a aplicação tópica apenas do creme aniônico não induziu efeito antinociceptivo para os testes de nocicepção espontânea.

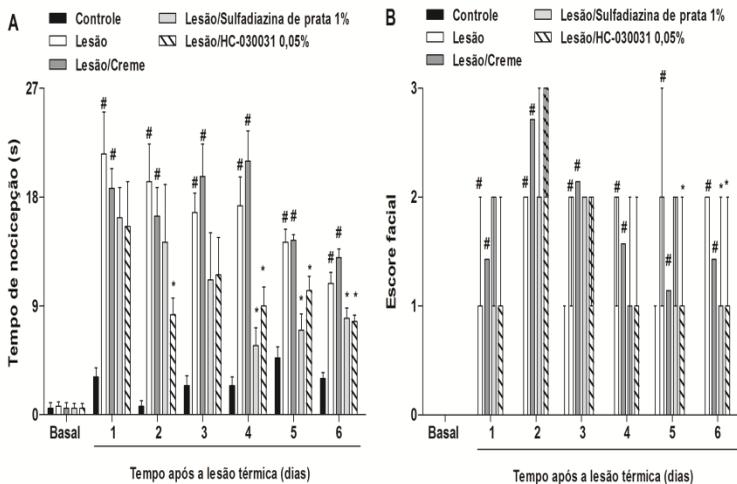


Figura 4 - A aplicação do creme aniônico contendo HC-030031 diminuiu comportamentos nociceptivos espontâneos induzidos por lesão térmica na pata traseira de ratos. Os comportamentos nociceptivos como (A) nocicepção espontânea (pata) ou (B) escore facial foram avaliados de 1 a 6 dias após a lesão. Os tratamentos como o creme aniônico contendo HC-030031 (0,05%), sulfadiazina de prata (1%) ou veículo (apenas o creme) foram aplicados após a lesão térmica por 6 dias. O grupo controle (sem lesão) ou lesão não receberam tratamento tópico. As medidas basais foram representadas como B no gráfico, e são os valores medidos antes da indução da lesão. Os dados foram representados como média + S.E.M. (n = 7). # $P < 0,05$ , quando comparado ao grupo controle; \* $P < 0,05$ , quando comparado ao grupo lesão (gráfico A, ANOVA de uma via seguida do teste post hoc Bonferroni para cada dia após a lesão; gráfico B, teste t de Student não paramétrico para comparar os grupos após cada dia da lesão).

### 3.8 O CREME ANIÔNICO CONTENDO HC-030031 APRESENTOU EFEITOS ANTI-INFLAMATÓRIOS NO MODELO DE LESÃO TÉRMICA DA PATA TRASEIRA

A lesão térmica causou edema de pata traseira nos animais do grupo com lesão sem tratamento quando comparados com aqueles do grupo controle (sem lesão), valor de 5,5 mm e 0,42 mm (6 dias após a lesão,  $P < 0,05$  teste “t” de *Student*), respectivamente (Figura 5A). Este parâmetro inflamatório foi reduzido pelo tratamento com o creme contendo HC-030031 de 3 a 6 dias após a lesão térmica ou sulfadiazina

de prata de 1 a 6 dias após a lesão térmica, as percentagens de inibição foram de  $46 \pm 5$  e  $46 \pm 5$  %, respectivamente 6 dias após a lesão (Figura 5A). Porém, a aplicação tópica apenas do creme aniônico não induziu efeito antiedematogênico (Figura 5A).

Quando avaliada a atividade das enzimas MPO e NAGase no tecido da pata traseira 6 dias após a indução de lesão térmica foi observado aumento destes parâmetros no grupo com lesão térmica e sem tratamento quando comparado àquele controle (Figura 5B e 5C). Além disso, o uso do creme contendo HC-030031, e também a aplicação da sulfadiazina de prata reduziu estes parâmetros inflamatórios de forma semelhante,  $68 \pm 10$  e  $73 \pm 2$ % de redução para a atividade da MPO, e  $79 \pm 5$  e  $80 \pm 2$ % de inibição para a atividade da NAGase, respectivamente. O uso apenas do creme aniônico não induziu efeitos anti-inflamatório em relação a atividade destas enzimas (Figura 5B e 5C).

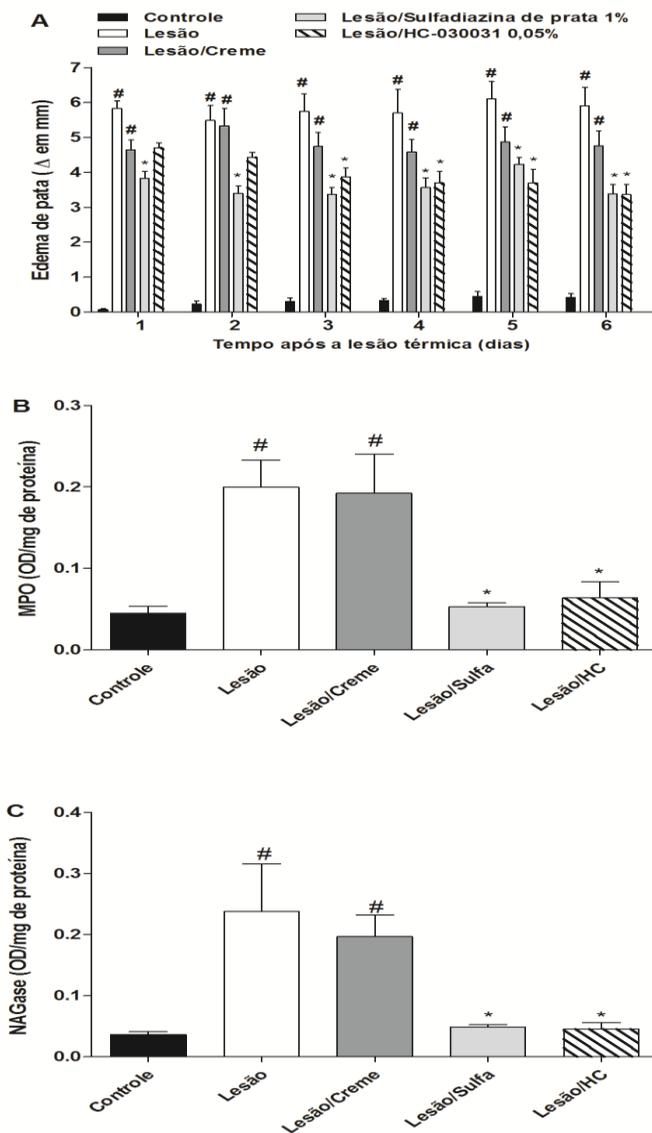


Figura 5 - A aplicação do creme aniônico contendo HC-030031 diminuiu parâmetros inflamatórios causados por lesão térmica na pata traseira de ratos. (A) O edema de pata traseira foi observado de 1 a 6 dias após a lesão. Os tratamentos como o creme aniônico contendo HC-030031 (0,05%), sulfadiazina de prata (1%)

ou veículo (apenas o creme) foram aplicados após a lesão térmica por 6 dias. As medidas basais foram representadas como B no gráfico, e são os valores medidos antes da indução da lesão. A atividade das enzimas (B) mieloperoxidase (MPO) e (C) NAGase foram avaliadas no sexto dia após a lesão térmica ou no grupo controle, e após a aplicação dos tratamentos (HC-030031 0,05%, sulfadiazina de prata 1% ou veículo – creme aniônico) no tecido da pele da pata traseira de ratos. O grupo controle (sem lesão) ou lesão não receberam tratamento tópico. Os dados foram representados como média  $\pm$  S.E.M. ( $n = 7$ ). # $P < 0.05$ , quando comparado ao grupo controle; \* $P < 0.05$ , quando comparado ao grupo lesão (gráfico A, ANOVA de duas vias seguida do teste post hoc Bonferroni; gráfico B e C, ANOVA de uma via seguida do teste post hoc Bonferroni).

A avaliação do tecido da pata retirado 6 dias após a lesão mostrou aumento do número de polimorfonucleares no tecido, quando comparado o grupo com lesão e o grupo controle (sem lesão) (Figura 6). O número de células infiltradas foi menor nos grupos tratados com HC-030031 ou ainda sulfadiazina de prata (Figura 6). Já, o tratamento com o creme aniônico não causou redução do número de células infiltradas (Figura 6B e 6C).

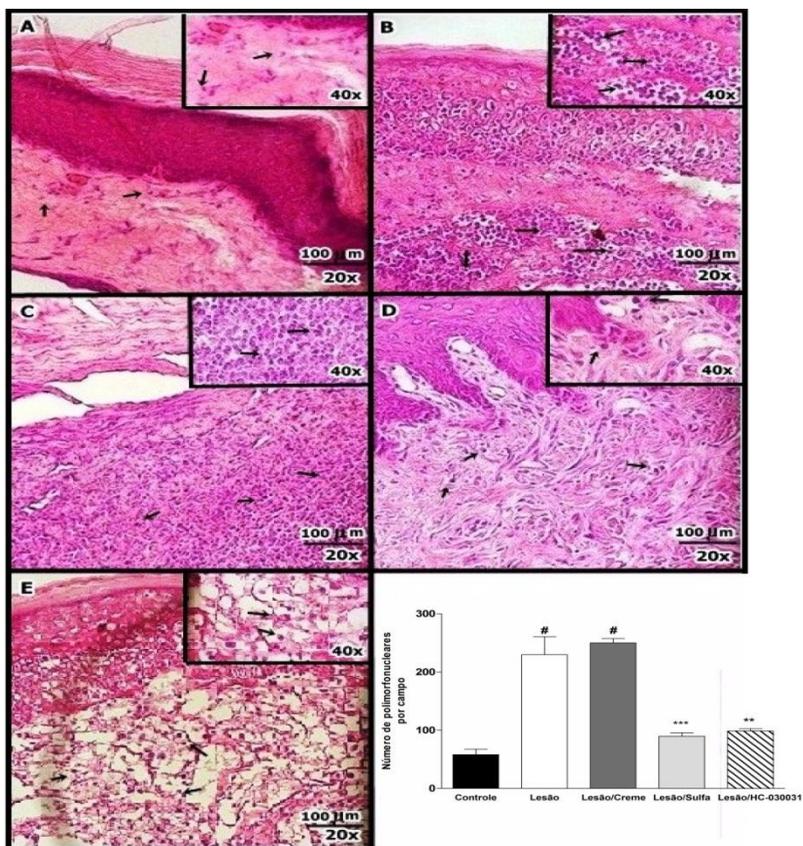


Figura 6 - Efeito da aplicação do creme aniônico contendo HC-030031 sobre mudanças histológicas no tecido da pata em ratos submetidos a modelo de lesão térmica. As figuras são representativas das seções histológicas do tecido da pata marcadas com hematoxilina-eosina (20 e 40x aumento; escala 100 μm) do grupo (A) sem lesão térmica; com lesão térmica e (B) sem tratamento tópico ou (C) tratados com creme aniônico ou (D) aplicação de creme aniônico contendo sulfadiazina de prata (1%), (E) com tratamento com creme aniônico contendo HC-030031 (0,05%). Em (F) contagem das células polimorfonucleares por campo. As setas em A-E indicam infiltração de leucócitos polimorfonucleares sobre a pele da pata. Cada barra (F) representa a média + S.E.M (n=7); # $P < 0.05$  quando comparado com o grupo controle. \*\* $P < 0.01$  e \*\*\* $P < 0.001$  quando comparado com o grupo lesão (ANOVA de uma via seguida do teste post hoc Bonferroni).

### 3.9 APÓS O MODELO DE LESÃO TÉRMICA OCORREU AUMENTO DA EXPRESSÃO DO RECEPTOR TRPA1 E TAMBÉM DE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO QUE FORAM TRATADOS COM O USO DO CREME ANIÔNICO CONTENDO HC-030031

Também a lesão térmica causou aumento do nível do agonista TRPA1 (peróxido de hidrogênio) e da atividade das enzimas NADPH oxidase e SOD em relação ao grupo controle, quando estes parâmetros foram mensurados na pele da pata após a lesão térmica em relação ao grupo controle. Além disso, os grupos tratados com HC-030031 e sulfadiazina de prata reduziram todos estes parâmetros de estresse oxidativo;  $71 \pm 6$  e  $69 \pm 10\%$  de inibição para o nível de peróxido de hidrogênio,  $60 \pm 7$  e  $66 \pm 10\%$  de inibição para a atividade da NADPH oxidase,  $68 \pm 7$  e  $67 \pm 7\%$  de inibição para a atividade da SOD, respectivamente (Figura 7A, 7B e 7C). Porém, o tratamento com o creme aniônico não causou redução dos parâmetros de estresse oxidativo após lesão térmica (Figura 7A, 7B e 7C).

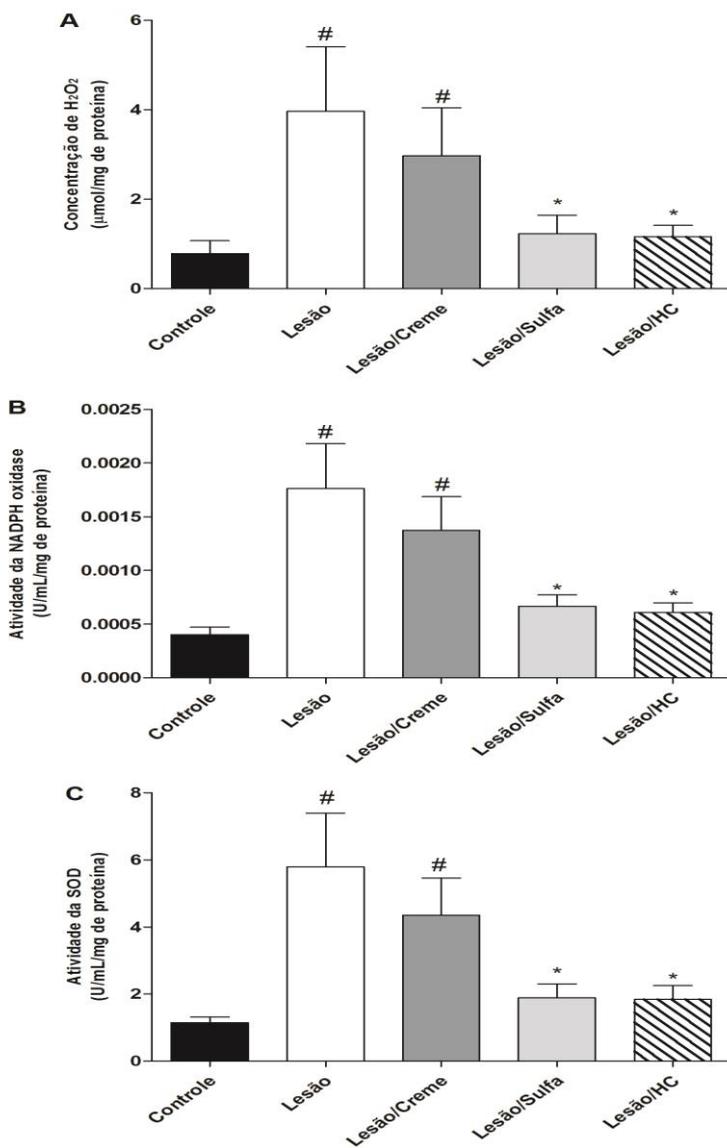


Figura 7 - Avaliação do conteúdo de peróxido de hidrogênio e atividades das enzimas NADPH oxidase e superóxido dismutase (SOD) após lesão térmica em ratos e efeito da aplicação do creme aniônico contendo HC-030031. (A)

Conteúdo de peróxido de hidrogênio, atividade das enzimas (B) NADPH oxidase e (C) superóxido dismutase (C, SOD). Os tratamentos com o creme aniônico contendo HC-030031 (0,05%), sulfadiazina de prata (1%) ou veículo (apenas o creme) foram aplicados após a lesão térmica por 6 dias. Estes parâmetros foram avaliados no sexto dia após a lesão térmica ou no grupo controle, e após a aplicação dos tratamentos (HC-030031 0,05%, sulfadiazina de prata 1% ou veículo – creme aniônico) no tecido da pele da pata traseira de ratos. O grupo controle (sem lesão) ou lesão não receberam tratamento tópico. Os dados foram representados como média  $\pm$  S.E.M. (n = 7). #P <0.05, quando comparado ao grupo controle; \*P <0.05, quando comparado ao grupo lesão (ANOVA de uma via seguida do teste post hoc Bonferroni).

A lesão térmica em ratos causou aumento da expressão do receptor TRPA1 em relação ao grupo controle, e então o tratamento com HC-030031 ou sulfadiazina de prata foi capaz de reduzir estes níveis de forma considerável (54 e 100% de redução, respectivamente) (Figura 8). Já, o tratamento com o creme aniônico não causou redução da expressão do receptor TRPA1 após lesão térmica (Figura 8).

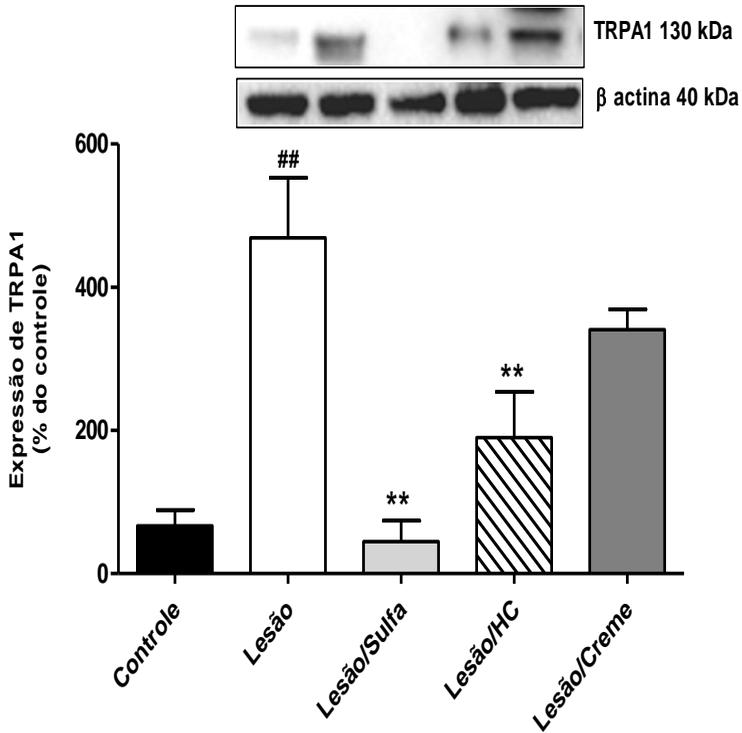


Figura 8 - A expressão do receptor TRPA1 no tecido da pata após 6 dias da indução da lesão térmica ou grupo controle, e efeito do tratamento com HC-030031 e sulfadiazina de prata sobre este parâmetro. Os tratamentos com o creme aniônico contendo HC-030031 (0,05%), sulfadiazina de prata (1%) ou veículo (apenas o creme) foram aplicados após a lesão térmica por 6 dias. O grupo controle (sem lesão) ou lesão não receberam tratamento tópico. Os dados foram representados como média  $\pm$  S.E.M (n=6), e o resultado foi expresso como % do controle (animais sem lesão térmica). ##P <0.01, quando comparado ao grupo controle; \*\*P <0.01, quando comparado ao grupo lesão (ANOVA de uma via seguida do teste post hoc Dunnet's).

## 4 DISCUSSÃO

A dor observada em pacientes com queimadura é muitas vezes incapacitante, pois pode levar, mesmo após a recuperação, a diferentes condições psicológicas. O tratamento adequado desta situação clínica deve ser realizado de forma eficaz e com a menor indução de efeitos adversos (Xie et al., 2012). Porém, muitas vezes, o tratamento é complicado, pois a dor pode apresentar-se de diferentes etiologias, como dor inflamatória ou neuropática, e dessa maneira requer tratamentos diferenciados para seu alívio, incluindo opioides, gabapentina ou outros fármacos não-opioides (Gamst-Jensen et al., 2014; McIntyre et al., 2016).

O tratamento tópico de queimaduras com coberturas que garantam efeito antimicrobiano ou ainda que permitam proteção e também alívio da dor é uma alternativa de tratamento em diferentes formas de queimadura (Singer e Dagum 2008; Wasiak et al. 2008). Contudo, até o momento ainda não existem medicamentos que sejam eficazes em todas as formas de dor, e ainda que tenham poucos efeitos adversos relacionados ao tratamento (McIntyre et al., 2016). Assim, faz-se necessário a procura por mecanismos diversos que possam estar associados à dor causada por lesões térmica, para que estas pesquisas possam então auxiliar no desenvolvimento de novos medicamentos (Chang e Waxman 2010; Fowler et al. 2014; Silva et al. 2014; Ueda et al. 2014).

Dessa forma, diversos modelos animais de lesão térmica têm sido desenvolvidos para avaliar o efeito analgésico e/ou anti-inflamatório de compostos em camundongos e ratos, estes modelos podem ser provocados por lesão térmica com placa quente ou ainda por imersão da pata do animal em banho-maria, normalmente são modelos que tentam mimetizar queimaduras de primeiro ou segundo grau (Gao et al., 2010), ou ainda de terceiro grau porém a lesão é limitada a um local específico como a pata traseira do animal (Fowler et al., 2014). Modelos que envolvem lesões extensas e reações metabólicas não são normalmente utilizados para avaliar o efeito analgésico de substâncias (Abdullahi, Amini-Nik, e Jeschke 2014; McIntyre et al. 2016), devido ao dinâmico e multifatorial quadro hipermetabólico envolvido que muitas vezes interfere na possibilidade de medidas corretas de nocicepção, pois provocam também alterações de locomoção.

O modelo de dor causado por queimadura por água em alta temperatura já havia sido utilizado em outros estudos e se mostra interessante por ser um modelo que não causa lesão extensa no animal e também tem ação inflamatória limitada ao local atingido (Jeschke et al.,

2009), levando a nocicepção na pata traseira que é um local de fácil acesso para avaliar medidas de nocicepção (Barrot, 2012). Desta forma, neste primeiro estudo não foi avaliado o efeito sobre modelos de dor de grande gravidade, pois o objetivo foi verificar se o receptor TRPA1 poderia ter participação em processos inflamatórios causados por queimadura.

A partir do momento em que foi observado um resultado antinociceptivo positivo neste projeto, é possível ampliar estudos para avaliar o envolvimento deste canal em modelos de dor causado por queimaduras de maior gravidade, ou ainda com administração por via oral ou parenteral destes antagonistas do receptor TRPA1. Estas são vias que também induzem efeito antinociceptivo em outros modelos de dor inflamatória para estes compostos (Andrade et al. 2012; Preti, Saponaro, Szallasi 2015).

Nenhum estudo foi realizado com a aplicação de creme aniônico contendo antagonistas específicos do TRPA1 como o HC-030031, apenas aplicação local por via intraplantar ou ainda intra-articular (Pinheiro et al., 2015; Trevisan et al., 2014). Para que não fossem utilizados grupos excessivos de animais no estudo, um modelo de dor aguda foi empregado para fazer a escolha da concentração ideal para administração. O modelo de dor aguda causado pela administração de AITC, um agonista TRPA1, foi escolhido para determinar assim, o possível efeito antinociceptivo desta preparação contendo HC-030031 (Trevisan et al., 2014).

O AITC é um agonista do canal TRPA1 derivado do óleo de mostarda e que quando administrado em ratos e camundongos induz nocicepção por um curto período (cerca de 5 a 10 minutos) e também induz o aparecimento de edema no local (Eid et al., 2008). O edema é possivelmente causado pela liberação de substância P e CGRP que são neuropeptídios liberados a partir de terminais sinápticos nociceptivos e que causam vasodilatação e edema (Andrade et al., 2012). Assim, três concentrações do creme contendo HC-030031 foram testadas neste modelo, e apenas as concentrações de 0,5 e 0,05% mostraram efeito antinociceptivo e antiedematogênico. A concentração de 0,05% foi então escolhida para ser testada no modelo de dor inflamatória aguda causada por queimaduras.

O HC-030031 é um antagonista específico do receptor TRPA1 e quando testado por via intraplantar é normalmente administrado na concentração de 300 nmol/pata (= 0,1 mg/pata/100 µL) (Trevisan et al., 2014), então a concentração de 0,05% (0,1 mg/pata/200 mg de creme aniônico) corresponde a um valor similar àquele administrado por via intraplantar.

Em um segundo momento a concentração de 0,05% do creme aniônico contendo HC-030031 foi utilizado para avaliar o seu efeito antinociceptivo em um modelo de dor inflamatória aguda em ratos. No modelo de lesão térmica induzida por imersão da pata traseira de ratos a alta temperatura, já foi observado o desenvolvimento de hipersensibilidade térmica e mecânica (Gao et al., 2010; Silva et al., 2013), utilizando os testes de nocicepção com filamentos de Von Frey (alodínia mecânica), pincel (alodínia estática) ou ainda imersão da pata traseira em água morna (alodínia térmica ao calor) (Barrot, 2012; Silva et al., 2013).

Assim, este modelo se enquadra em sintomas já observados na clínica para pacientes com queimaduras causadas por líquidos como água quente, onde os mesmos relatam alodínia mecânica e hiperalgesia térmica ao calor (Summer et al., 2007; Laycock et al., 2013). Diferentes mecanismos já foram associados em humanos ao desenvolvimento de alodínia mecânica, como o aumento da liberação de mediadores inflamatórios e sensibilização de nociceptores periféricos (Raja e Campbell, 1984; Pedersen et al., 1998; Summer et al., 2007). Entretanto, mesmo que outros receptores TRP tenham já sido estudados em modelos de lesão térmica como o TRPV1 (Pedersen et al., 1998), nenhum estudo até o momento havia avaliado o efeito antinociceptivo de antagonistas do receptor TRPA1.

O creme contendo HC-030031 foi capaz de reduzir a alodínia mecânica, assim como aquele creme que continha sulfadiazina de prata também apresentou efeito antinociceptivo. Como o veículo destes tratamentos aplicado ao grupo com lesão térmica não apresentou efeito significativo quando comparado ao grupo controle, pode-se definir que estes tratamentos apresentaram efeito antinociceptivo, e que não era apenas observado um efeito do creme. Os animais tratados com HC-030031 e sulfadiazina de prata retornaram aos seus valores basais ainda no sexto dia da aplicação dos cremes na pata. Estes tratamentos promoveram uma recuperação do tecido lesado de forma mais efetiva. Porém em relação a potência provavelmente o creme contendo HC-030031 tem um maior valor, pois em uma concentração de apenas 0,05% já mostrou valores de inibição similares àqueles encontrados para a sulfadiazina de prata a 1%.

A administração de antagonistas TRPA1 por via oral ou ainda local (intraplantar, intra-articular ou intratecal), foi capaz de reduzir a alodínia mecânica e também hiperalgesia térmica em diferentes modelos de dor inflamatória (Geppetti et al., 2008; Andrade et al. 2012). Dessa forma, estes estudos confirmam o potencial destes compostos para reduzir a

nociceção em modelos de inflamação. Um resultado antinociceptivo semelhante já havia sido descrito para o creme contendo sulfadiazina de prata 1% no mesmo modelo em ratos (Silva et al., 2013).

Também, os pacientes com queimaduras, como aquelas causadas por líquidos em altas temperaturas, relatam dor espontânea que normalmente tem características de dor em queimação ou em pontadas e pulsante. É relevante observar estes comportamentos em modelos de dor causada por queimaduras. Muitas vezes este é o principal sintoma que induz redução da qualidade de vida dos pacientes (Cuttle et al., 2009; Richardson e Mustard, 2009). Neste estudo foi possível observar que a aplicação do creme contendo HC-030031 foi capaz de reduzir a nociceção espontânea observada na pata do animal. Este parâmetro foi mais pronunciado nos primeiros dias após a lesão. Além disso, também foi utilizada uma escala de dor facial para prever o efeito dos tratamentos em parâmetros de nociceção afetivos de dor (Sotocinal et al., 2011; De Rantere et al., 2016;). Esta técnica é um diferencial de outras, já que muitas vezes pode-se apenas medir medidas reflexivas de dor que não permitem realizar a correta translação dos efeitos observados em animais para aqueles que serão observados em pacientes (Sotocinal et al., 2011; Barrot, 2012).

Ainda, a aplicação do creme contendo HC-030031 foi capaz de diminuir os escores relacionados a dor espontânea nos animais. Estes dados corroboram com aqueles observados nos testes de medidas reflexivas (como o teste de Von Frey). Previamente, já havia sido relatado a capacidade de antagonistas TRPA1 de reduzir a nociceção espontânea em um modelo de dor muscular craniofacial (Asgar et al., 2015). A sulfadiazina de prata também mostrou resultados positivos nestes testes, o que está de acordo com o seu efeito analgésico já descrito na clínica (Shahzad e Ahmed, 2013; Nasiri et al., 2016).

Como o modelo de dor induzido por lesão térmica também provoca inflamação de forma contínua no tecido afetado, foi relevante avaliar, neste estudo, marcadores da resposta inflamatória, como o edema de pata (Silva et al., 2013). O aparecimento de edema em pacientes com queimadura pode ser causa de dor e, dessa forma deve ser reduzido na prática clínica quando possível, porém o uso de analgésicos não esteroidais ou ainda de corticoides não mostram perfil de efeitos adversos e eficácia favorável o que impede o seu uso. Outros analgésicos utilizados para o tratamento de queimaduras também não induzem efeitos anti-inflamatórios, como a morfina ou a gabapentina (Singer e Dagum, 2008; Richardson e Mustard, 2009; Gamst-Jensen et al., 2014; McIntyre et al., 2016). Dessa maneira, foi interessante observar que o creme contendo

HC-030031 foi capaz de reduzir o desenvolvimento de edema, bem como o controle positivo do teste a sulfadiazina de prata. Previamente, já havia sido relatado o efeito antiedematogênico do HC-030031 por via oral ou local em modelos animais de inflamação (Silva et al., 2013), assim como o efeito antiedematogênico da sulfadiazina de prata 1% no mesmo modelo de lesão térmica em ratos (Silva et al., 2013).

O processo inflamatório após lesões térmicas induz a migração de células inflamatórias no local da lesão como neutrófilos e macrófagos que servem como células para combate de bactérias e também participação do processo de remoção do tecido coagulado (Horton, 2003; Evers et al., 2010; Laycock et al., 2013; Gamst-Jensen et al., 2014; McIntyre et al., 2016). Porém, a infiltração celular excessiva pode contribuir para a sensibilização dos nociceptores devido a contínua produção de mediadores inflamatórios, como as prostaglandinas, histamina, citocinas e quimiocinas (Summer et al., 2007; Laycock et al., 2013; McIntyre et al., 2016).

No modelo de lesão térmica utilizado neste projeto observou-se a migração de células inflamatórias ao local da lesão e também o aumento da atividade de enzimas relacionadas a ativação de macrófagos (Nagase) e neutrófilos (mieloperoxidase), resultados que já haviam sido descritos previamente (Silva et al., 2013). E a aplicação do creme contendo HC-030031 foi capaz de diminuir estes marcadores, mostrando o efeito anti-inflamatório deste tratamento. Além disso, a aplicação tópica do creme contendo HC-030031 também reduziu o número de células que infiltraram no tecido 6 dias após a lesão. Resultados similares foram observados para a sulfadiazina de prata 1%, resultados estes, que corroboram os de um estudo anterior (Silva et al., 2013). Previamente, em modelos de inflamação aguda, foi relatado que antagonista TRPA1 poderia reduzir o processo inflamatório, e ainda a nocicepção (Silva et al., 2013; Horváth et al., 2016).

O receptor TRPA1 é expresso em terminações sensoriais da derme e epiderme e tem como objetivo promover o influxo de cálcio após a ativação por sinais de danos, como a produção excessiva de substâncias oxidantes como o peróxido de hidrogênio e o 4-HNE (Andersson et al., 2008; Andrade et al., 2012; Trevisani et al., 2007). Esta ativação induz a liberação de neuropeptídeos e também a geração de potenciais de ação na periferia que poderiam auxiliar na condução do estímulo nocivo (Andrade et al., 2012).

O peróxido de hidrogênio tem sido relacionado com o desenvolvimento de diferentes patologias dolorosas em modelos animais de dor aguda na gota (Moilanen et al., 2015; Trevisan et al., 2013, 2014),

de dor observada em artrites inflamatórias (Keeble et al., 2009; Moilanen et al., 2015), ou ainda em modelos de dor neuropática (Trevisan et al., 2016). Assim, muitos estudos têm demonstrado que a produção de peróxido de hidrogênio por células residentes no tecido (como sinoviócitos), ou ainda células como macrófagos e neutrófilos poderiam favorecer a sensibilização dos nociceptores via ativação do TRPA1 (Trevisan et al., 2014). Previamente, havia sido relatado que a lesão térmica por queimadura pode aumentar a produção de espécies reativas que poderiam auxiliar no processo de controle das bactérias no tecido. Porém, poderiam também contribuir com danos teciduais causando a peroxidação lipídica (Tanaka et al., 1999; Hoşnuter et al., 2004; Parihar et al., 2008; Bhatia et al., 2016; Silveira et al., 2016;).

Ademais, sabe-se que antioxidantes foram eficazes tanto para a redução da dor na queimadura, como também quando utilizados em pacientes com respostas sistêmicas permitindo um maior tempo de sobrevida, além de auxiliar em outros casos na redução do tecido necrótico na ferida (Rock et al., 1997; Lee et al., 2011). Assim, algumas coberturas preparadas para ferimentos têm como função reduzir a produção e também captar espécies reativas que possam contribuir com o dano excessivo ao tecido (Wasiak et al., 2008). Deste modo, o receptor TRPA1 poderia estar sendo ativado por estes compostos oxidantes o que causaria a indução de inflamação neurogênica e também nocicepção.

Então, para isso, os níveis de peróxido de hidrogênio e das enzimas NADPH oxidase e superóxido dismutase foram avaliados, e se mostraram alterados nos animais após lesão térmica quando comparado com os dos controles. Além disso, o tratamento com HC-030031 ou ainda com a sulfadiazina de prata foi capaz de reduzir estes níveis, o que estaria de acordo com os resultados observados para os testes de nocicepção. Estes resultados poderiam estar associados ao efeito anti-inflamatório destas preparações que foram observados neste estudo, o que poderia então favorecer a redução da produção de espécies reativas por células inflamatórias.

Quando observado em modelos de dor inflamatória além da sensibilização dos nociceptores, um mecanismo que também pode favorecer o desenvolvimento de nocicepção é o aumento da expressão dos receptores envolvidos na detecção dos mediadores inflamatórios e oxidantes (Mcintyre et al., 2016). Já foi relatado anteriormente que em modelos de queimadura a hipersensibilidade observada pode ser devido ao aumento da expressão de receptores na periferia ou ainda na medula espinhal, desencadeando mecanismos de sensibilização periférica ou central, respectivamente (Summer et al., 2008; McIntyre et al., 2016). Foi

observado um aumento da expressão do receptor TRPA1 em feridas de pacientes após queimadura, especialmente aquelas que também produziram coceira. Então, possivelmente o aumento da expressão deste receptor poderia também estar envolvido com o desenvolvimento inicial da dor inflamatória em modelos de queimadura em ratos (Yang et al., 2015).

Quando avaliados os níveis da proteína do TRPA1 em amostra da pele de pata de ratos, foi possível observar um aumento da expressão desta. Estes resultados estão de acordo com a literatura, pois outros modelos de dor inflamatória crônica relatam aumento da expressão do canal TRPA1, o que foi associado também ao desenvolvimento de hipersensibilidade (Obata et al., 2005; Yamamoto et al., 2015). Ainda, o tratamento com o antagonista HC-030031 por via tópica foi capaz de prevenir o aumento da expressão do canal TRPA1. O mesmo resultado foi observado para a sulfadiazina de prata 1%, o que poderia ser esperado devido ao seu efeito anti-inflamatório observado neste estudo.

Já a sulfadiazina de prata mostrou efeito tóxico sobre células da pele como queratinócitos e fibroblastos (Rowan et al., 2015; William et al., 2015), que são células que expressam o receptor TRPA1 (Mukhopadhyay et al., 2011; Sticozzi et al., 2014). Então esta toxicidade poderia também favorecer a redução da expressão deste canal nas amostras de pele. Como não foi observada a expressão do receptor TRPA1 em relação ao tipo tecidual, não se pode afirmar que este aumento de expressão seja devido a presença deste canal em neurônios sensoriais. Porém também o aumento em células não neurais da pele pode favorecer o aumento da produção de citocinas inflamatórias que então poderiam sensibilizar os nociceptores (Hatano et al., 2012; Bautista et al., 2013; Viana, 2016).

Dessa forma, pode-se inferir que a aplicação do creme contendo o antagonista TRPA1 apresentou efeitos antinociceptivos em um modelo de dor inflamatória causada por altas temperaturas, e estes efeitos foram comparáveis aqueles observados para o controle positivo do estudo a sulfadiazina de prata a 1%. Porém, mesmo que a sulfadiazina de prata seja ainda utilizada para o tratamento em queimaduras (Lee e Moon, 2003; Atiyeh et al., 2007; Murphy e Evans, 2012), muitos estudos trazem efeitos adversos relacionados a este tratamento e ainda indicam que o uso poderia reduzir a cicatrização das feridas. Também são indicados efeitos adversos sistêmicos como toxicidade renal e leucopenia, indicando que o uso da sulfadiazina de prata não seria indicado em tratamento de longo período (Klasen, 2000; Atiyeh et al., 2007).

Assim, este estudo possui resultados iniciais que indicam o provável efeito de antagonistas TRPA1 para o controle da dor e inflamação na queimadura. Porém ainda são necessários estudos para demonstrar o efeito destas preparações em outros modelos em animais de lesões térmicas de maior gravidade. Desta forma, mais estudos de toxicidade sobre a pele de antagonistas TRPA1 devem ser realizados, ou ainda observar se a aplicação tópica destes cremes não poderia desfavorecer a cicatrização posterior do tecido lesado.

## CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos neste estudo podemos retirar as seguintes conclusões:

- A aplicação do creme aniônico contendo o antagonista TRPA1 (HC-030031) apresentou efeito antinociceptivo e antiedematogênico no modelo de nocicepção e edema causado pela administração intraplantar do agonista TRPA1 (AITC), demonstrando a capacidade do antagonista TRPA1 de agir de forma tópica neste modelo.
- O creme aniônico contendo o antagonista TRPA1 (HC-030031) reduziu a alodínia mecânica estática e dinâmica, a hiperalgesia ao calor, a nocicepção espontânea e também os escores de nocicepção observados em um modelo de lesão térmica na pata traseira de ratos, mostrando que o receptor TRPA1 tem participação fundamental no desenvolvimento da dor causada pela lesão térmica em ratos.
- A administração do antagonista do creme aniônico contendo o antagonista TRPA1 (HC-030031) apresentou efeito antiedematogênico e efeito anti-inflamatório (diminuiu a atividade das enzimas mieloperoxidase e NAGase) em um modelo de lesão térmica na pata traseira de ratos. Assim, a aplicação de um antagonista TRPA1 por via tópica também apresenta efeito anti-inflamatório no modelo de lesão térmica em ratos.
- A aplicação do creme aniônico contendo o antagonista TRPA1 (HC-030031) reduziu a migração de polimorfonucleares em tecido da pata em um modelo de lesão térmica em ratos.
- O creme contendo HC-030031 foi capaz de reduzir o conteúdo do agonista TRPA1 o peróxido de hidrogênio e também a atividade de enzimas oxidantes, como a superóxido dismutase e NADPH oxidase em um modelo de lesão térmica na pata traseira de ratos, indicando que a formação do agonista TRPA1 endógeno poderia estar reduzida pela aplicação contínua do creme contendo HC-030031 e que então isso poderia contribuir para o efeito antinociceptivo e anti-inflamatório.
- Após a aplicação continuada do creme aniônico contendo HC-030031 também a imunoreatividade para o receptor TRPA1 em um modelo de lesão térmica na pata traseira de ratos foi diminuída, dessa maneira o antagonista TRPA1 estaria reduzindo

a possibilidade de hipersensibilidade mediada pelo aumento da expressão do receptor TRPA1.

Por tudo isso, a partir dos resultados obtidos neste estudo pode-se perceber que o receptor TRPA1 poderia ser estudado como uma fonte relevante para o desenvolvimento de novos analgésicos para o tratamento da dor observada após lesão térmica.

## REFERÊNCIAS

- Abdullahi A, Amini-Nik S, Jeschke MG. Animal models in burn research. *Cell Mol LifeSci.*2014;71(17):3241–55.
- Andersson DA, Gentry C, Moss S, Bevan S. Transient receptor potential A1 is a sensory receptor for multiple products of oxidative stress. *J Neurosci.* 2008;28(10):2485–94.
- Andrade EL, Meotti FC, Calixto JB. TRPA1 antagonists as potential analgesic drugs. *PharmacolThe.*2012;133(2):189–204.
- Andrè E, Campi B, Materazzi S, Trevisani M, Amadesi S, Massi D, et al. Cigarette smoke-induced neurogenic inflammation is mediated by alpha,beta-unsaturated aldehydes and the TRPA1 receptor in rodents. *J Clin Invest.* 2008;118(7):2574–82.
- Aparecida Rossi L, Camargo C, N M Santos CM, de Cássia de Paula Barruffin R, Campos de Carvalho e. A dor da queimadura: terrível para quem sente, estressante para quem cuida.
- Asgar J, Zhang Y, Saloman JL, Wang S, Chung M-K, Ro JY. The role of TRPA1 in muscle. *Pain.* 22;53(14):5085–107.
- Atiyeh BS, Costagliola M, Hayek SN, Dibo SA. Effect of silver on burn wound infection control and healing: Review of the literature. *Burns.* 2007;33(2):139–48.
- Bandell M, Story GM, Hwang SW, Viswanath V, Eid SR, Petrus MJ, et al. Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron.* 2004;41(6):849–57.
- Bang S, Hwang SW. Polymodal ligand sensitivity of TRPA1 and its modes of interactions. *J Gen Physiol [Internet]. The Rockefeller University Press;* 2009;133(3):257–62.
- Geppetti P, Nassini R, Materazzi S, Benemei S. The concept of neurogenic inflammation. *BJUInt.*2008;101(s3):2–6.
- Baraldi PG, Preti D, Materazzi S, Geppetti P. Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) channel as emerging target for novel

analgesics and anti-inflammatory agents. *JMed Chem.* 2010 Jul 22;53(14):5085–107.

Barrot M. Tests and models of nociception and pain in rodents. *Neuroscience.* 2012;1 (211):39–50.

Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell.*2009;139(2):267–84.

Bautista DM, Movahed P, Hinman A, Axelsson HE, Sterner O, Högestätt ED, et al. Pungent products from garlic activate the sensory ion channel TRPA1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(34):12248–52.

Bautista DM, Pellegrino M, Tsunozaki M. TRPA1: A gatekeeper for inflammation. *Annu Rev Physiol.* 2013;75:181–200.

Bennett DLH, Woods CG. Painful and painless channelopathies. *Lancet Neurol.* 2014;13(6):587–99.

Bertin-Maghit M, Goudable J, Dalmas E, Steghens JP, Bouchard C, Gueugniaud PY, et al. Time course of oxidative stress after major burns. *Intensive Care Med.* 2000 ;26(6):800–3.

Bessac BF, Sivula M, von Hehn CA, Escalera J, Cohn L, Jordt S-E. TRPA1 is a major oxidant sensor in murine airway sensory neurons. *J Clin Invest.* 2008;118(5):1899–910.

Bhatia N, Kaur G, Soni V, Kataria J, Dhawan RK, Monafu W, et al. Evaluation of the wound healing potential of isoquercetin-based cream on scald burn injury in rats. *Burn Trauma. BioMed Central;* 2016;4(1):7.

Bishop T, Hewson DW, Yip PK, Fahey MS, Dawbarn D, Young AR, et al. Characterisation of ultraviolet-B-induced inflammation as a model of hyperalgesia in the rat. *Pain.* 2007;131(1-2):70–82.

Boukalova S, Touska F, Marsakova L, Hynkova A, Sura L, Chvojka S, et al. Gain-of-function mutations in the transient receptor potential channels TRPV1 and TRPA1: how painful? *Physiol Res.* 2014;63(1):205–13.

Bowler PG, Jones SA, Walker M, Parsons D. Microbicidal properties of a silver-containing hydrofiber dressing against a variety of burn wound pathogens. *J Burn Care Rehabil.* 2016;25(2):192–6.

Burgess G, Williams D. The discovery and development of analgesics: new mechanisms, new modalities. *J Clin Invest.* 2010;120(11):3753–9.

Calixto JB, Kassuya CAL, André E, Ferreira J. Contribution of natural products to the discovery of the transient receptor potential (TRP) channels family and their functions. *Pharmacol Ther.* 2005 May;106(2):179–208.

Cancio LC, Lundy JB, Sheridan RL. Evolving changes in the management of burns and environmental injuries. *Surg Clin North Am.* 2012;92(4):959–86.

Chang Y-W, Waxman SG. Minocycline attenuates mechanical allodynia and central sensitization following peripheral second-degree burn injury. *J Pain.* 2010;11(11):1146–54.

Clapham DE. TRP channels as cellular sensors. *Nature.* 2003;426(6966):517–24.

Cuttle L, Pearn J, McMillan JR, Kimble RM. A review of first aid treatments for burn injuries. *Burns.* 2009;35(6):768–75.

Cvetkov TL, Huynh KW, Cohen MR, Moiseenkova-Bell VY. Molecular architecture and subunit organization of TRPA1 ion channel revealed by electron microscopy. *J Biol Chem.* 2011;286(44):38168–76.

De Rantere D, Schuster CJ, Reimer JN, Pang DSJ. The relationship between the Rat Grimace Scale and mechanical hypersensitivity testing in three experimental pain models. *Eur J Pain.* 2016;20(3):417–26.

De Smet K, van den Plas D, Lens D, Sollie P. Pre-clinical Evaluation of a New Antimicrobial Enzyme for the Control of Wound Bioburden. *Wounds a Compend Clin Res Pract.* 2009;21(3):65–73.

Deniz M, Borman H, Seyhan T, Haberal M. An effective antioxidant drug on prevention of the necrosis of zone of stasis: N-acetylcysteine. *Burns.* 2013 Mar;39(2):320–5.

Dubin AE, Patapoutian A. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *J Clin Invest.* 2010;120(11):3760–72.

Eid SR, Crown ED, Moore EL, Liang HA, Choong K-C, Dima S, et al. HC-030031, a TRPA1 selective antagonist, attenuates inflammatory- and neuropathy-induced mechanical hypersensitivity. *Mol Pain.* 2008;4:48.

Evers LH, Bhavsar D, Mailänder P. The biology of burn injury. *Exp Dermatol.* Blackwell Publishing Ltd; 2010;19(9):777–83.

Ferreira E, Lucas R, Rossi LA, Andrade D. Curativo do paciente queimado: uma revisão de literatura. *Revista da Escola de Enfermagem da U S P.* 2003.

Fowler M, Clifford JL, Garza TH, Slater TM, Arizpe HM, Novak J, et al. A rat model of full thickness thermal injury characterized by thermal hyperalgesia, mechanical allodynia, pronociceptive peptide release and tramadol analgesia. *Burns.* Elsevier; 2014;40(4):759–71. A

Fuller FW. The side effects of silver sulfadiazine. *J Burn Care Res.* 2009;30(3):464–70.

Gamst-Jensen H, Vedel PN, Lindberg-Larsen VO, Egerod I. Acute pain management in burn patients: appraisal and thematic analysis of four clinical guidelines. *Burns.* 2014;40(8):1463–9.

Gao Y, Xu C, Yu K, Li G, Wan F, Liu S, et al. Effect of tetramethylpyrazine on DRG neuron P2X3 receptor involved in transmitting pain after burn. *Burns.* 2010;36(1):127–34.

Garrison SR, Stucky CL. Contribution of transient receptor potential ankyrin 1 to chronic pain in aged mice with complete Freund's adjuvant-induced arthritis. *Arthritis Rheumatol (Hoboken, NJ).* 2014;66(9):2380–90.

Gilron I, Baron R, Jensen T. Neuropathic pain: principles of diagnosis and treatment. *Mayo Clin Proc.* 2015;90(4):532–45.

Gomes D, Serra M, Guimarães JL. Condutas atuais em queimaduras. In: Revinter. Rio de Janeiro; 2001.

Green DP, Ruparel S, Roman L, Henry MA, Hargreaves KM. Role of endogenous TRPV1 agonists in a postburn pain model of partial-thickness injury. *Pain*. 2013;154(11):2512–20.

Grimm KA, Tranquilli WJ, Lamont LA. *Essentials of Small Animal Anesthesia and Analgesia*. Wiley; 2011. 1299 p.

Dubin AE, Patapoutian A. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *J Clin Invest*. 2010;120(11):3760–72.

Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature*. 2008;453(7193):314–21.

Reinke JM, Sorg H. Wound repair and regeneration. *Eur Surg Res Eur Chir Forschung Rech Chir Eur*. 2012;49(1):35–43.

Hatano N, Itoh Y, Suzuki H, Muraki Y, Hayashi H, Onozaki K, et al. Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF1 $\alpha$ ) switches on transient receptor potential ankyrin repeat 1 (TRPA1) gene expression via a hypoxia response element-like motif to modulate cytokine release. *J Biol Chem*. 2012;287(38):31962–72.

Hettiaratchy S, Dziewulski P. ABC of burns: pathophysiology and types of burns. *BMJ*. BMJ Group; 2004;328(7453):1427–9.

Hinman A, Chuang H-H, Bautista DM, Julius D. TRP channel activation by reversible covalent modification. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(51):19564–8.

Hinz B. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *J Invest Dermatol*. 2007;127(3):526–37.

Horton JW. Free radicals and lipid peroxidation mediated injury in burn trauma: the role of antioxidant therapy. *Toxicology*. 2003;189(1-2):75–88.

Horváth Á, Tékus V, Boros M, Pozsgai G, Botz B, Borbély É, et al. Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) receptor is involved in

chronic arthritis: in vivo study using TRPA1-deficient mice. *Arthritis Res Ther.* 2016;18:6.

Hoşnuter M, Gürel A, Babuççu O, Armutcu F, Kargi E, Işıkdemir A. The effect of CAPE on lipid peroxidation and nitric oxide levels in the plasma of rats following thermal injury. *Burns.* 2004;30(2):121–5.

Hussain S, Ferguson C. Best evidence topic report. Silver sulphadiazine cream in burns. *Emerg Ip M, Lui SL, Poon VKM, Lung I, Burd A. Antimicrobial activities of silver dressings: an in vitro comparison. J Med Microbiol.* 2006;55(Pt 1):59–63.

Jaquemar D, Schenker T, Trueb B. An ankyrin-like protein with transmembrane domains is specifically lost after oncogenic transformation of human fibroblasts. *J Biol Chem.*1999;274(11):7325–33.

Jeschke MG, Gauglitz GG, Song J, Kulp GA, Finnerty CC, Cox RA, et al. Calcium and ER stress mediate hepatic apoptosis after burn injury. *J Cell Mol Med.* 2009;13(8B):1857–65.

Jordt S-E, Bautista DM, Chuang H-H, McKemy DD, Zygmunt PM, Högestätt ED, et al. Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature.*2004;427(6971):260–5.

Kanta J. The role of hydrogen peroxide and other reactive oxygen species in wound healing. *Acta medica (Hradec Králové) / Univ Carolina, Fac Medica Hradec Králové.* 2011;54(3):97–101.

Keeble JE, Bodkin JV, Liang L, Wodarski R, Davies M, Fernandes ES, et al. Hydrogen peroxide is a novel mediator of inflammatory hyperalgesia, acting via transient receptor potential vanilloid 1-dependent and independent mechanisms. *Pain.* 2009;141(1-2):135–42.

Kidd BL, Urban LA. Mechanisms of inflammatory pain. *Br J Anaesth.* 2001; 87(1):3–11.

Klasen H. A historical review of the use of silver in the treatment of burns. II. Renewed interest for silver. *Burns.* 2000;26(2):131–8.

Kremeyer B, Lopera F, Cox JJ, Momin A, Rugiero F, Marsh S, et al. A gain-of-function mutation in TRPA1 causes familial episodic pain syndrome. *Neuron*. 2010;66(5):671–80.

Labuz D, Machelska H. Stronger antinociceptive efficacy of opioids at the injured nerve trunk than at its peripheral terminals in neuropathic pain. *J Pharmacol Exp Ther*. 2013;346(3):535–44.

Laycock H, Valente J, Bantel C, Nagy I. Peripheral mechanisms of burn injury-associated pain. *Eur J Pharmacol*. 2013;716:169–78.

Leão CEG, Andrade ES de, Fabrini DS, Oliveira RA de, Machado GLB, Gontijo LC. Epidemiology of burns in Minas Gerais. *Rev Bras Cir Plástica. Sociedade Brasileira de Cirurgia Plástica*; 2011;26(4):573–7.

Lee A-RC, Moon HK. Effect of topically applied silver sulfadiazine on fibroblast cell proliferation and biomechanical properties of the wound. *Arch Pharm Res*. 2003;26(10):855–60.

Lee H, Kaneki M, Andreas J, Tompkins RG, Martyn JAJ. Novel mitochondria-targeted antioxidant peptide ameliorates burn-induced apoptosis and endoplasmic reticulum stress in the skeletal muscle of mice. *Shock*. 2011 ;36(6):580–5.

Levine JD, Alessandri-Haber N. TRP channels: targets for the relief of pain. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1772(8):989–1003.

Lipnik-Stangelj M. Mediators of inflammation as targets for chronic pain treatment. *Mediators Inflamm*. 2013;2013:783235.

Loeser JD, Treede R-D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. *Pain*. 2008;137(3):473–7.

Macpherson LJ, Xiao B, Kwan KY, Petrus MJ, Dubin AE, Hwang S, et al. An ion channel essential for sensing chemical damage. *J Neurosci*. 2007;27(42):11412–5.

Maenthaisong R, Chaiyakunapruk N, Niruntraporn S, Kongkaew C. The efficacy of aloe vera used for burn wound healing: a systematic review. *Burns. Centre for Reviews and Dissemination (UK)*; 2007;33(6):713–8.

Marx JA, Hockberger RS, Walls RM, Biros MH, Danzl DF, Gausche-Hill M, et al. Rosen's emergency medicine : concepts and clinical practice.

McGaraughty S, Chu KL, Perner RJ, DiDomenico S, Kort ME, Kym PR, et al. TRPA1 modulation of spontaneous and mechanically evoked firing of spinal neurons in uninjured, osteoarthritic, and inflamed rats. *Mol Pain. BioMed Central*; 2010;6(1):14.

McIntyre MK, Clifford JL, Maani C V, Burmeister DM. Progress of clinical practice on the management of burn-associated pain: Lessons from animal models. *Burns*. 2016 Feb 19

McNamara CR, Mandel-Brehm J, Bautista DM, Siemens J, Deranian KL, Zhao M, et al. TRPA1 mediates formalin-induced pain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(33):13525–30.

Moilanen LJ, Hämäläinen M, Lehtimäki L, Nieminen RM, Moilanen E. Urate crystal induced inflammation and joint pain are reduced in transient receptor potential ankyrin 1 deficient mice--potential role for transient receptor potential ankyrin 1 in gout. *PLoS One*. 2015;10(2):e0117770.

Moilanen LJ, Hämäläinen M, Nummenmaa E, Ilmarinen P, Vuolteenaho K, Nieminen RM, et al. Monosodium iodoacetate-induced inflammation and joint pain are reduced in TRPA1 deficient mice – potential role of TRPA1 in osteoarthritis. *Osteoarthr Cartil*. 2015 Nov;23(11):2017–26.

Monstrey S, Hoeksema H, Verbelen J, Pirayesh A, Blondeel P. Assessment of burn depth and burn wound healing potential. *Burns*. 2008;34(6):761–9.

Montell C, Birnbaumer L. Letter to the Editor A Unified Nomenclature for the Superfamily of TRP Cation Channels. *Mol Cell*. 2002;9:229–31.

Montell C. The TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE*. 2005;2005(272):re3.

Moran MM, McAlexander MA, Bíró T, Szallasi A. Transient receptor potential channels as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov*. 2011;10(8):601–20.

Mukhopadhyay I, Gomes P, Aranake S, Shetty M, Karnik P, Damle M, et al. Expression of functional TRPA1 receptor on human lung fibroblast and epithelial cells. *J Recept Signal Transduct Res*. 2011;31(5):350–8.

Muley MM, Krustev E, McDougall JJ. Preclinical Assessment of Inflammatory Pain. *CNS Neurosci Ther*. 2016;22(2):88–101.

Murphy PS, Evans GRD. Advances in Wound Healing: A Review of Current Wound Healing Products. *Plast Surg Int [Internet]*. Hindawi Publishing Corporation; 2012;2012:1–8.

Nadworny PL, Wang J, Tredget EE, Burrell RE. Anti-inflammatory activity of nanocrystalline silver in a porcine contact dermatitis model. *Nanomedicine*. 2008;4(3):241–51.

Nagata K, Duggan A, Kumar G, García-Añoveros J. Nociceptor and hair cell transducer properties of TRPA1, a channel for pain and hearing. *J Neurosci*. 2005;25(16):4052–61.

Nasiri E, Hosseinimehr SJ, Zoghi Hosseinzadeh A, Azadbakht M, Akbari J, Azadbakht M. The effects of *Arnebia euchroma* ointment on second-degree burn wounds: a randomized clinical trial. *J Ethnopharmacol*. 2016;189:107–16.

Nilius B. TRP channels in disease. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1772(8):805–12.

Nisanci M, Eski M, Sahin I, Ilgan S, Isik S. Saving the zone of stasis in burns with activated protein C: an experimental study in rats. *Burns*. 2010;36(3):397–402.

Obata K, Katsura H, Mizushima T, Yamanaka H, Kobayashi K, Dai Y, et al. TRPA1 induced in sensory neurons contributes to cold hyperalgesia after inflammation and nerve injury. *J Clin Invest*. 2005;115(9):2393–401.

Ossipov MH, Dussor GO, Porreca F. Central modulation of pain. *J Clin Invest*. 2010 Nov;120(11):3779–87.

Öster C, Willebrand M, Ekselius L. Health-related quality of life 2 years to 7 years after burn injury. *J Trauma*. 2011;71(5):1435–41.

Pal M, Angaru S, Kodimuthali A, Dhingra N. Vanilloid receptor antagonists: emerging class of novel anti-inflammatory agents for pain management. *Curr Pharm Des*. 2009;15(9):1008–26.

Parbhoo A, Louw QA, Grimmer-Somers K. Burn prevention programs for children in developing countries require urgent attention: a targeted literature review. *Burns*. 2010;36(2):164–75.

Parihar A, Parihar MS, Milner S, Bhat S. Oxidative stress and anti-oxidative mobilization in burn injury. *Burns*. 2008;34(1):6–17. A

Pastar I, Stojadinovic O, Yin NC, Ramirez H, Nusbaum AG, Sawaya A, et al. Epithelialization in Wound Healing: A Comprehensive Review. *Adv wound care*. 2014;3(7):445–64.

Pedersen JL, Andersen OK, Arendt-Nielsen L, Kehlet H. Hyperalgesia and temporal summation of pain after heat injury in man. *Pain*. 1998;74(2-3):189–97.

Peter-Szabo M, Kekesi G, Nagy E, Sziver E, Benedek G, Horvath G. Quantitative characterization of a repeated acute joint inflammation model in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2012;34(5-6):520–6.

Piccolo NS, Serra MCVF, Leonardi DF, Al. E. Projeto diretrizes – Queimaduras: Diagnóstico e Tratamento Inicial. Sociedade Brasileira de Cirurgia Plástica. 2008. p. 1–14.

Pinheiro F de V, Villarinho JG, Silva CR, Oliveira SM, Pinheiro K de V, Petri D, et al. The involvement of the TRPA1 receptor in a mouse model of sympathetically maintained neuropathic pain. *Eur J Pharmacol*. 2015;747:105–13.

Poon VKM, Burd A. In vitro cytotoxicity of silver: implication for clinical wound care. *Burns*. 2004;30(2):140–7.

Preti D, Saponaro G, Szallasi A. Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) antagonists. *Pharm Pat Anal*. 2015;4(2):75–94.

Raisinghani M, Zhong L, Jeffry JA, Bishnoi M, Pabbidi RM, Pimentel F, et al. Activation characteristics of transient receptor potential ankyrin 1 and its role in nociception. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2011;301(3):C587–600.

Raja SN, Campbell JN. Evidence for different mechanisms of primary and secondary hyperalgesia following heat injury to the glabrous skin. *Brain*. 1984;107 ( Pt 4):1179–88.

Richardson P, Mustard L. The management of pain in the burns unit. *Burns*. 2009;35(7):921–36.

Rock CL, Dechert RE, Khilnani R, Parker RS, Rodriguez JL. Carotenoids and antioxidant vitamins in patients after burn injury. *J Burn Care Rehabil*. 1997;18(3):269–78; discussion 268.

Rowan MP, Cancio LC, Elster EA, Burmeister DM, Rose LF, Natesan S, et al. Burn wound healing and treatment: review and advancements. *Crit Care*. *BioMed Central*; 2015;19:243.

Sasaki JR, Zhang Q, Schwacha MG. Burn induces a Th-17 inflammatory response at the injury site. *Burns*. 2011;37(4):646–51.

Sawada Y, Hosokawa H, Matsumura K, Kobayashi S. Activation of transient receptor potential ankyrin 1 by hydrogen peroxide. *Eur J Neurosci*. 2008;27(5):1131–42.

Schneider JC, Harris NL, El Shami A, Sheridan RL, Schulz JT, Bilodeau M-L, et al. A descriptive review of neuropathic-like pain after burn injury. *J Burn Care Res*. 2016;27(4):524–8.

Scholz J, Woolf CJ. The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. *Nat Neurosci*. 2007;10(11):1361–8.

Serrano C, Boloix-Tortosa R, Gómez-Cía T, Acha B. Features identification for automatic burn classification. *Burns*. 2015;41(8):1883–90.

Shahzad MN, Ahmed N. Effectiveness of Aloe Vera gel compared with 1% silver sulphadiazine cream as burn wound dressing in second degree burns. *J Pak Med Assoc*. 2013;63(2):225–30.

Shih B, Garside E, McGrouther DA, Bayat A. Molecular dissection of abnormal wound healing processes resulting in keloid disease. *Wound Repair Regen.* 2015;18(2):139–53.

Shupp JW, Nasabzadeh TJ, Rosenthal DS, Jordan MH, Fidler P, Jeng JC. A review of the local pathophysiologic bases of burn wound progression. *J Burn Care Res* 2014;31(6):849–73.

Silva MA, Trevisan G, Hoffmeister C, Rossato MF, Boligon AA, Walker CIB, et al. Anti-inflammatory and antioxidant effects of Aloe saponaria Haw in a model of UVB-induced paw sunburn in rats. *J Photochem Photobiol B Biol.* 2014;133:47–54.

Silva MA, Trevisan G, Klafke JZ, Rossato MF, Walker CIB, Oliveira SM, et al. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of Aloe saponaria Haw on thermal injury in rats. *J Ethnopharmacol.* 2013;146(1):393–401.

Silveira PCL, Ferreira KB, da Rocha FR, Pieri BLS, Pedroso GS, De Souza CT, et al. Effect of Low-Power Laser (LPL) and Light-Emitting Diode (LED) on Inflammatory Response in Burn Wound Healing. *Inflammation.* 2016.

Silverstein P, Heimbach D, Meites H, Latenser B, Mozingo D, Mullins F, et al. An open, parallel, randomized, comparative, multicenter study to evaluate the cost-effectiveness, performance, tolerance, and safety of a silver-containing soft silicone foam dressing (intervention) vs silver sulfadiazine cream. *J Burn Care Res.* 2016;32(6):617–26.

Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med.* 1999;341(10):738–46.

Singer AJ, Dagum AB. Current management of acute cutaneous wounds. *N Engl J Med.* 2008;359(10):1037–46.

Snowden JM. Wound closure: an analysis of the relative contributions of contraction and epithelialization. *J Surg Res.* 1984;37(6):453–63.

Sotocinal SG, Sorge RE, Zaloum A, Tuttle AH, Martin LJ, Wieskopf JS, et al. The Rat Grimace Scale: a partially automated method for

quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions. *Mol Pain*. 2011;7:55.

Staahl C, Olesen AE, Andresen T, Arendt-Nielsen L, Drewes AM. Assessing analgesic actions of opioids by experimental pain models in healthy volunteers - an updated review. *Br J Clin Pharmacol*. 2009;68(2):149–68.

Sticozzi C, Cervellati F, Muresan XM, Cervellati C, Valacchi G. Resveratrol prevents cigarette smoke-induced keratinocytes damage. *Food Funct*. 2014;5(9):2348–56.

Story GM, Peier AM, Reeve AJ, Eid SR, Mosbacher J, Hricik TR, et al. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell*. 2003;112(6):819–29.

Summer GJ, Puntillo KA, Miaskowski C, Green PG, Levine JD. Burn injury pain: the continuing challenge. *J Pain*. 2007;8(7):533–48.

Summer GJ, Romero-Sandoval EA, Bogen O, Dina OA, Khasar SG, Levine JD. Proinflammatory cytokines mediating burn-injury pain. *Pain*. 2008;135(1):98–107.

Tan J-Q, Zhang H-H, Lei Z-J, Ren P, Deng C, Li X-Y, et al. The roles of autophagy and apoptosis in burn wound progression in rats. *Burns*. 2013;39(8):1551–6.

Kowalske KJ. Burn wound care. *Phys Med Rehabil Clin N Am*. 2011;22(2):213–27, v.

Tanaka H, Lund T, Wiig H, Reed RK, Yukioka T, Matsuda H, et al. High dose vitamin C counteracts the negative interstitial fluid hydrostatic pressure and early edema generation in thermally injured rats. *Burns*. 1999;25(7):569–74.

Taverner T, Prince J. Acute Neuropathic Pain Assessment in Burn Injured Patients: A Retrospective Review. *J Wound Ostomy Continence Nurs*. 2014;43(1):51–5.

Terman G, Bonica J. Bonica's management of pain. In: Loeser J, Butler S, Chapman C, Turk D, editors. *Bonica's Management of Pain*.

Philadelphia, Pennsylvania, USA: Lippincott, Williams & Wilkins; 2003. p. 73.

Treede R-D, Rief W, Barke A, Aziz Q, Bennett MI, Benoliel R, et al. A classification of chronic pain for ICD-11. *Pain*. 2015;156(6):1003–7.

Trevisan G, Benemei S, Materazzi S, De Logu F, De Siena G, Fusi C, et al. TRPA1 mediates trigeminal neuropathic pain in mice downstream of monocytes/macrophages and oxidative stress. *Brain*. 2016;139(Pt 5):1361–77.

Trevisan G, Hoffmeister C, Rossato MF, Oliveira SM, Silva MA, Ineu RP, et al. Transient receptor potential ankyrin 1 receptor stimulation by hydrogen peroxide is critical to trigger pain during monosodium urate-induced inflammation in rodents. *Arthritis Rheum*. 2013;65(11):2984–95.

Trevisan G, Hoffmeister C, Rossato MF, Oliveira SM, Silva MA, Silva CR, et al. TRPA1 receptor stimulation by hydrogen peroxide is critical to trigger hyperalgesia and inflammation in a model of acute gout. *Free Radic Biol Med*. 2014;72:200–9.

Trevisani M, Siemens J, Materazzi S, Bautista DM, Nassini R, Campi B, et al. 4-Hydroxynonenal, an endogenous aldehyde, causes pain and neurogenic inflammation through activation of the irritant receptor TRPA1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(33):13519–24.

Ueda M, Iwasaki H, Wang S, Murata E, Poon KYT, Mao J, et al. Cannabinoid receptor type 1 antagonist, AM251, attenuates mechanical allodynia and thermal hyperalgesia after burn injury. *Anesthesiology*. 2014;121(6):1311–9.

Viana F. TRPA1 channels: molecular sentinels of cellular stress and tissue damage. *J Physiol*. 2016;15.

Von Hehn CA, Baron R, Woolf CJ. Deconstructing the neuropathic pain phenotype to reveal neural mechanisms. *Neuron*. 2012;73(4):638–52.

Walter J. Meyer, Shelley Wiechman, Lee Woodson MJ e CRT. Management of pain and other discomforts in burned patients. In:

Herndon DN., editor. Total Burn Care. 6th ed. Philadelphia : Saunders Elsevier; 2012. p. 715–31.

Wasiak J, Cleland H, Campbell F, Spinks A. Dressings for superficial and partial thickness burns. *Cochrane database Syst Rev*. 2013;(3):CD002106.

Wasiak J, Cleland H, Campbell F. Dressings for superficial and partial thickness burns. *Cochrane database Syst Rev*. 2008;(4):CD002106.

Werner S, Krieg T, Smola H. Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. *J Invest Dermatol*. 2007;127(5):998–1008.

Wesseldijk F, Fekkes D, Huygen FJPM, van de Heide-Mulder M, Zijlstra FJ. Increased plasma glutamate, glycine, and arginine levels in complex regional pain syndrome type 1. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2008;52(5):688–94.

WHO Burns. WHO. World Health Organization; 2016.

William D, James M, Timothy Berger M, Dirk Elston M. Andrews' diseases of the skin : clinical dermatology. 12th ed. Elsevier Health Sciences, editor. 2015. 968 p.

Woolf CJ. What is this thing called pain? *J Clin Invest*. 2010;120(11):3742–4.

Woolf CJ. What is this thing called pain? *J Clin Invest*. 2010;120(11):3742–4.

Woolf CJ. Central sensitization: implications for the diagnosis and treatment of pain. *Pain*. 2011;152(3):2–15.

Xie B, Xiao S, Zhu S, Xia Z. Evaluation of long term health-related quality of life in extensive burns: a 12-year experience in a burn center. *Burns*. 2012;38(3):348–55.

Xu C, Li G, Gao Y, Liu S, Lin J, Zhang J, et al. Effect of puerarin on P2X<sub>3</sub> receptor involved in hyperalgesia after burn injury in the rat. *Brain Res Bull*. 2009;80:341–6.

Yamamoto K, Chiba N, Chiba T, Kambe T, Abe K, Kawakami K, et al. Transient receptor potential ankyrin 1 that is induced in dorsal root ganglion neurons contributes to acute cold hypersensitivity after oxaliplatin administration. *Mol Pain*. 2015;11(1):69.

Yang B, Wang X, Li Z, Qu Q, Qiu Y. Beneficial effects of silver foam dressing on healing of wounds with ulcers and infection control of burn patients. *Pakistan J Med Sci*. 2016;31(6):1334–9.

Yang YS, Cho SI, Choi MG, Choi YH, Kwak IS, Park CW, et al. Increased expression of three types of transient receptor potential channels (TRPA1, TRPV4 and TRPV3) in burn scars with post-burn pruritus. *Acta Derm Venereol*. 2015;95(1):20–4.

Yu L, Yang F, Luo H, Liu F-Y, Han J-S, Xing G-G, et al. The role of TRPV1 in different subtypes of dorsal root ganglion neurons in rat chronic inflammatory nociception induced by complete Freund's adjuvant. *Mol Pain*. 2008;4:61.

Zou K, Wynn PM, Miller P, Hindmarch P, Majsak-Newman G, Young B, et al. Preventing childhood scalds within the home: Overview of systematic reviews and a systematic review of primary studies. *Burns*. 2015;41(5):907–24.

**ANEXO**

## ANEXO A - CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA



Universidade do Extremo Sul Catarinense  
Comissão de Ética no Uso de Animais

### CERTIFICADO

*Certificamos que o projeto intitulado “Avaliação da participação do receptor de potencial transitório anquirina 1 (TRPA1) na dor e inflamação provocadas por modelo de queimadura de pata em ratos”, Protocolo nº 020/2015-2 sob a responsabilidade Gabriela Trevisan dos Santos e equipe: Ronaldo Perfoli, Samira Dal-Toé De Prá, Paula Ronsani Ferro e Flávia Karine Rigo que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei no. 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto no. 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da UNESCO – Universidade do Extremo Sul Catarinense.*

Vigência do Projeto	30/08/2015 a 30/08/2016
Espécie/linhagem	Rattus norvegicus – rato, - linhagem Wistar
Nº. De animais	70
Peso/Idade	150-200 g/50 dias
Sexo	M
Origem	Biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC

*The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 02/2011/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the following Project:*

**Protocol number: 020/2015-2**

**Principal Investigator:** Gabriela Trevisan dos Santos

**Researchers:** Ronaldo Perfoli, Samira Dal-Toé De Prá, Paula Ronsani Ferro e Flávia Karine Rigo

**Project title:** Evaluation of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) participation on pain and inflammation caused by a model of burn in paw of rats.

*The project was **Approved** in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us on [www.unesc.net/propex/ceua](http://www.unesc.net/propex/ceua) or by e-mail: [ceua@unesc.net](mailto:ceua@unesc.net).*

Criciúma, 08 de setembro de 2015.

  
JAIRO JOSÉ ZOCHE  
Coordenador da CEUA



Universidade do Extremo Sul Catarinense UNESC

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA



### Resolução

A Comissão de Ética no Uso de Animais, reconhecido pela Resolução n. 02/2011/Câmara Propex de acordo com a Lei Federal 11.794, analisou o adendo abaixo.

Protocolo: 008/2015-2 CEUA – Adendo – Projeto 020/2015-2

Professora: Gabriela Trevisan

*Título: "Avaliação da participação do receptor de potencial transitório anquirina 1 (TRPA1) na dor e inflamação provocadas por modelo de queimadura de pata em ratos".*

A solicitação de adendo referente ao projeto acima foi **aprovado**.

Para demais dúvidas contatar a CEUA.

[www.unesc.net/ceua](http://www.unesc.net/ceua)

Criciúma, 17 de novembro de 2015.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Jairo'.

**JAIRO JOSÉ ZOCHE**

Coordenador do CEUA