

Tese de Doutorado

**PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR DE POTENCIAL
TRANSITÓRIO ANQUIRINA 1 (TRPA1) NO
DESENVOLVIMENTO E MANUTENÇÃO DAS FASES AGUDA
E CRÔNICA DA NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR
ISQUEMIA/REPERFUSÃO EM CAMUNDONGOS**

SAMIRA DAL TOÉ DE PRÁ



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

SAMIRA DAL TOÉ DE PRÁ

**PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR DE POTENCIAL
TRANSITÓRIO ANQUIRINA 1 (TRPA1) NO
DESENVOLVIMENTO E MANUTENÇÃO DAS FASES AGUDA
E CRÔNICA DA NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR
ISQUEMIA/REPERFUSÃO EM CAMUNDONGOS**

Tese de Doutorado apresentado ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde da Universidade do
Extremo Sul Catarinense para obtenção
do título de Doutor em Ciências da
Saúde

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Gabriela
Trevisan

Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo
Andrez Machado de Ávila

Criciúma

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

P895p Prá, Samira Dal Toé de.

Participação do receptor de potencial transitório anquirina 1 (TRPA1) no desenvolvimento e manutenção das fases aguda e crônica da nocicepção induzida por isquemia/reperfusão em camundongos / Samira Dal Toé de Prá. – 2017.

91 p. : il. ; 21 cm.

Tese (Doutorado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, SC, 2017.

Orientação: Gabriela Trevisan.

Coorientação: Ricardo Andrez Machado de Ávila.

1. Síndrome de Dor Complexa Regional. 2. Dor crônica. 3. Nocicepção. 4. Receptor de potencial transitório anquirina 1. 5. Amitriptilina – Uso terapêutico.

CDD. 22ª ed. 616.0472



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão
Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde

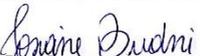
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de 03.06.2005

PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Tese de DOUTORADO apresentada pela candidata **Samira Dal-Toé De Prá** sob o título “**PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR DE PONTENCIAL TRANSITÓRIO ANQUIRINA 1 (TRPA1) NO DESENVOLVIMENTO E MANUTENÇÃO DAS FASES AGUDA E CRÔNICA DA NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR ISQUEMIA/REPERFUSÃO EM CAMUNDONGOS**”, para obtenção do grau de **DOUTORA EM CIÊNCIAS DA SAÚDE** do Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

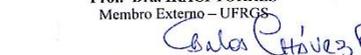
Após haver analisado o referido trabalho e arguido a candidata, os membros são de parecer pela “**APROVAÇÃO**” da Tese.

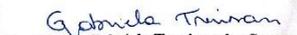
Criciúma, SC, 28 de abril de 2017.

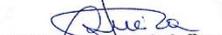

Prof.ª Dra. JOSIANE BUDNI
Membro Relator – UNESC


Prof. Dr. PAULO CESAR LOCK SILVEIRA
Membro Interno – UNESC


Prof.ª Dra. IRACI TORRES
Membro Externo – UFRGS


Prof. Dr. CARLOS DELFIN CHÁVEZ OLÓRTEGUI
Membro Externo – UFMG


Prof.ª Dra. Gabriela Trevisan dos Santos
Orientadora


Prof.ª Dra. Marça Inês da Rosa
Coordenadora do PPGCS

Folha informativa

A tese foi elaborada seguindo o estilo Vancouver e será apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC e do Departamento de Ciências da Saúde, Setor de Farmacologia Clínica e Oncologia da Universidade de Florença, Itália.

*Dedico este trabalho aos
meus pais, com todo meu
amor e gratidão!*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a **Deus** o autor da vida, que torna tudo possível me fortalecendo e iluminando a cada dia. Gostaria muito de agradecer aos meus **pais** pelo amor, pela compreensão, e por estarem sempre ao meu lado me apoiando imensamente. Ao meu **irmão Rafael** por sempre com ele poder contar em todas as circunstâncias. Ao meu namorado **Evandro**, pela compreensão, incentivo, carinho e paciência em todos os momentos. E a toda minha **família**, que torceu e me ajudou para que essa jornada se tornasse mais leve e momentânea. Agradeço muito a minha orientadora **Grabriela**, que conferiu prestígio ao meu trabalho e pelo incentivo na pesquisa. Agradeço também a consideração de ter aceitado a orientação do meu doutorado, por toda oportunidade oferecida, pela amizade, confiança, e por todos os seus conselhos, seu profissionalismo e ensinamentos que levarei para sempre, minha profunda gratidão. Ao meu coorientador **Ricardo**, pela amizade, pela acolhedora recepção no seu grupo de pesquisa, e por todo apoio permitindo meu crescimento profissional. À **Flávia**, amiga querida e colega de laboratório, agradeço carinhosamente, por suas sugestões, paciência e ensinamentos a mim atribuídos no qual foram fundamentais. As colegas de laboratório em especial a **Adri, Tami e Thai**, pelo quarteto leal que formamos nesses anos de convívio, toda amizade, pela descontração, conversas e por todo apoio de sempre, obrigada minhas amigas. A todo grupo do **Labim**, que de alguma forma contribuíram com sua amizade para a realização deste trabalho, gostaria de expressar minha imensa gratidão. E principalmente quero agradecer a parceria de sempre das meninas do **Labim Dor**, pela dedicação em todo trabalho realizado, em especial a aluna de iniciação científica a **Paula**, por todos os momentos de apoio, trabalho, amizade e pela parceria desde do início do doutorado. E não posso deixar de agradecer aos colegas da Universidade de Florença, na Itália, que gentilmente me receberam e auxiliaram na pesquisa, a todos do grupo do professor **Geppetti**: Grazie! Agradeço à Universidade do Extremo Sul Catarinense (**UNESC**) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (**PPGCS**); ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**), e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**) pela concessão da bolsa de estudos. Aos professores componentes da banca, a **Josiane Budni**, o **Paulo Cesar Lock Silveira**, a **Iraci Torres** e o **Carlos Chávez Olórtégui**, obrigada por aceitarem o convite à avaliação do presente estudo. Por fim, agradeço todos os funcionários do **PPGCS**, em especial aos **professores** pelos ensinamentos, que contribuíram para o

meu crescimento pessoal e profissional. E meu respeitoso agradecimento aos funcionários do **Biotério** da UNESC que contribuíram para esse estudo. Também aos **colegas de doutorado** pela companhia e parceria neste período. A todos vocês que de alguma forma contribuíram para que esta tese tivesse existência: **Muito obrigada!**

“Ser feliz não é ter uma vida perfeita. Mas usar as lágrimas para irrigar a tolerância. Usar as perdas para refinar a paciência. Usar as falhas para esculpir a serenidade. Usar a dor para lapidar o prazer. Usar os obstáculos para abrir as janelas da inteligência”.

(Augusto Cury)

RESUMO

A síndrome de dor complexa regional (SDCR) normalmente pode desenvolver-se após o processo de isquemia/reperfusão tecidual desencadeado por várias lesões, como o trauma induzido por fratura óssea. Esta forma de dor é caracterizada por uma dor crônica resistente à terapia padrão, necessitando dessa forma o desenvolvimento de novos tratamentos eficazes e seguros. Portanto o objetivo deste estudo foi avaliar o envolvimento do receptor de potencial transitório anquirina 1 (TRPA1), um canal iônico sensível a substâncias inflamatórias e oxidativas, em um modelo de dor pós-isquemia crônica (DPIC) em camundongos. Para isso, foram utilizados camundongos C57BL/6, ou ainda camundongos com deleção gênica para o receptor TRPA1 (*Trpa1*^{-/-}) e também animais do tipo selvagem (*Trpa1*^{+/+}), machos e fêmeas (20-30 g) que foram submetidos ou não a 2 horas de isquemia/reperfusão na pata traseira direita usando um torniquete de borracha sob anestesia. Diferentes parâmetros de nocicepção, inflamação e isquemia foram avaliados 1 dia (fase aguda) ou 17 dias (fase crônica) após a indução de isquemia/reperfusão para estabelecer o modelo de DPIC em camundongos. Na fase aguda, observou-se o aumento dos níveis de lactato e da temperatura da pata, edema da pata e tornozelo assim como alodinia mecânica e ao frio. Na fase crônica, detectou-se o aparecimento de alodinia mecânica e ao frio e esta fase monstrou-se como aquela neuropática, sendo que não houve alteração nas atividades das enzimas mieloperoxidase e N-acetil-β-D-glucosaminidase (tecido da pata traseira e nervo ciático). Após, diferentes tratamentos foram avaliados na fase crônica da DPIC, ou ainda foi avaliado o efeito na prevenção da nocicepção aguda e crônica. Primeiramente, a administração intragástrica (i.g.) de amitriptilina (controle positivo) foi capaz de reduzir a alodinia mecânica na fase crônica da DPIC. Também, a administração de antagonistas do receptor TRPA1 (HC-030031 ou A-967079, i.g.) ou o uso de um oligonucleotídeo antisentido para o TRPA1 (via intratecal, i.t.) mostrou efeito antinociceptivo na fase crônica da DPIC. Além disso, foi possível observar um aumento da expressão do TRPA1 no nervo ciático, e ainda utilizando um agonista TRPA1 (AITC) aplicado na pata este induziu hiperalgesia química na fase crônica da DPIC. No nervo ciático foi possível observar um aumento na infiltração de macrófagos e também na imunoreatividade ao 4-hidroxinonal (4-HNE, agonista TRPA1) em camundongos na fase crônica da DPIC. Foram também observados aumentos nos níveis de peróxido de hidrogênio e nas atividades das enzimas NADPH oxidase e superóxido dismutase na fase crônica da

DPIC. Além disso, a administração (i.g.) do composto antioxidante ácido α -lipóico mostrou efeito antinociceptivo na fase crônica da DPIC. Também animais *Trpa1*^{-/-} não apresentam alodinia mecânica e ao frio na fase aguda até a fase crônica da DPIC. Finalmente, pode-se perceber que o tratamento (i.g.) preventivo agudo e repetido (após 3 dias da indução da DPIC) com o antagonista TRPA1 (HC-030031) ou com o ácido α -lipóico, ou ainda a administração do oligonucleotídeo antisentido para o TRPA1 (i.t.) mostraram efeito preventivo no modelo de DPIC na fase aguda e crônica. Em conclusão, o antagonismo do receptor TRPA1 mostrou eficácia em prevenir o desenvolvimento de dor neuropática induzida por DPIC em camundongos, ou foi eficaz no tratamento crônico da nocicepção observada na DPIC. Dessa forma, esta estratégia farmacológica poderia ser estudada como uma forma de prevenção da dor crônica e aguda induzida por processos de isquemia e reperfusão tecidual.

Palavras-Chave: Ácido α -lipóico; Alodinia; Amitriptilina; 4-HNE; Peróxido de hidrogênio; Macrófagos.

ABSTRACT

The regional complex pain syndrome (CRPS) can normally develop after the tissue ischemia / reperfusion process triggered by various lesions, such as trauma induced by bone fracture. This form of pain is characterized by chronic pain resistant to standard therapy, necessitating the development of effective and safe new treatments. Therefore, the objective of this study was to evaluate the involvement of the transient potential receptor ankyrin 1 (TRPA1), an ionic channel sensitive to inflammatory and oxidative substances, in a model of chronic ischemic pain (CIP) in mice. For this, C57BL/6 mice, or mice with TRPA1 receptor deletion (*Trpa1*^{-/-}), and wild type (*Trpa1*^{+/+}) mice, male and female (20-30 g) were also used, which were submitted or not at 2 hours ischemia/reperfusion in the right hind paw using a rubber tourniquet under anesthesia. Different parameters of nociception, inflammation, and ischemia were evaluated 1 day (acute phase) or 17 days (chronic phase) after induction of ischemia/reperfusion to establish the CIP model in mice. In the acute phase, there was an increase in lactate and paw temperature, paw and ankle edema, as well as mechanical and cold allodynia. In the chronic phase, the appearance of mechanical and cold allodynia was detected and this phase was shown to be similar to that of neuropathic, and there was no change in the activities of the myeloperoxidase and nagase (hind paw and sciatic nerve) enzymes. Afterwards, different treatments were evaluated in the chronic phase of CIP, or its effects on the prevention of acute and chronic nociception were evaluated. First, oral administration (p.o.) of amitriptyline (positive control) was able to reduce mechanical allodynia in the chronic phase of the DPIC. Also, administration of TRPA1 receptor antagonists (HC-030031 or A-967079, p.o.) or the use of an antisense oligonucleotide for TRPA1 (intrathecal route, i.t.) showed antinociceptive effect in the chronic phase of CIP. In addition, it was possible to observe an increase in the expression of TRPA1 in the sciatic nerve, and still using a TRPA1 agonist (AITC) applied in the paw this induced chemical hyperalgesia in the chronic phase of the CIP. In the sciatic nerve it was possible to observe an increase in macrophages infiltration and also in immunoreactivity to 4-hydroxynonenal (4-HNE, TRPA1 agonist) in mice in the chronic phase of CIP. Furthermore, increased results were also observed for the levels of hydrogen peroxide and the activities of the NADPH oxidase and superoxide dismutase enzymes in the chronic phase of the CIP. In addition, the administration of the α -lipoic acid antioxidant compound showed antinociceptive effect in the chronic phase of the CIP. Also

TRPA1^{-/-} animals do not present mechanical allodynia and cold in the acute phase until the chronic phase of the CIP. Finally, it can be seen that acute and repeated preventive treatment with the TRPA1 (HC-030031) antagonist or α -lipoic acid, or administration of the antisense oligonucleotide to TRPA1 (it) showed a preventive effect in the DPIC model in the acute and chronic phase. In conclusion, TRPA1 receptor antagonism has been shown to be efficacious in preventing the development of CIP -induced neuropathic pain in mice, or has been effective in the chronic treatment of nociception obeyed in CIP. Thus, this pharmacological strategy could be studied as a form of prevention of chronic and acute pain induced by ischemia and tissue reperfusion processes.

Keywords: α -Lipoic acid; Allodynia; Amitriptyline; 4-HNE; Hydrogen peroxide; Macrophages.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1:.....	14
Figura 2:.....	22
Figura 3:.....	26
Figura 4:.....	31
Figura 5:.....	32
Figura 6:.....	33
Figura 7:.....	35
Figura 8:.....	36
Figura 9:.....	37
Figura 10:.....	39
Figura 11:.....	41
Figura 12:.....	42
Figura 13:.....	43
Figura 14:.....	45
Figura 15:.....	46
Figura 16:.....	47
Figura 17:.....	47
Figura 18:.....	48
Figura 19:.....	50
Figura 20:.....	52
Figura 21:.....	54
Figura 22 :.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS

4-HNE - 4-hidroxinonenal
A-967079 - (1E,3E)-1-(4-Fluorophenyl)-2-methyl-1-penten-3-one oxime;
AITC - Isotiocianato de alila
ATP - Adenosina trifosfato
C57BL/6 - C57 black 6
CEUA - Comitê de Ética no Uso de Animais
CGRP - Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DMSO - Dimetilsulfóxido
DPIC - Dor Pós-Isquemica Crônica
DRG - Gânglio da raiz dorsal
DSR - Distrofia simpático reflexa
EU - União Européia
GN - Gânglio nodoso
GT - Gânglio do trigêmeo
GV - Gânglio vagal
HbO₂ - Hemoglobina capilar
HC - 030031 - (2-(1,3-Dimethyl-2,6-dioxo-1,2,3,6-tetrahydro-7H-purin-7-yl)-N-(4-isopropylphenyl) acetamide)
i.g - Intra gástrica
i.pl. - Intraplantar
i.t. - Intratecal
IASP - Associação Internacional do Estudo da Dor
IL-1- Interleucina-1
IL-6 - Interleucina-6
MPO - Mieloperoxidase
NAC - N -acetilcisteína
NAGase - N-acetil-β-D-glucosaminidase
PBS - Salina tampão fosfato
ROS- espécies reativas de oxigênio
SDCR - Síndrome da Dor Complexa Regional
SDCR-I - Síndrome da dor Complexa Regional tipo I
SOD- Superóxido dismutase
SP -Substância P
TNF-α fator de necrose tumoral-alfa

TRP Receptor de potencial transitório

TRPA1 - Receptor de potencial transitório anquirina 1

TRPC - Receptor de potencial transitório canônico

TRPM - Receptor de potencial transitório melastatina

TRPML - Receptor de potencial transitório mucolipina

TRPP - Receptor de potencial transitório policistina

TRPV1- Receptor de potencial transiente vanilóide do tipo 1

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	01
1.1 Dor e ocicepção	01
1.2 Síndrome da Dor Complexa Regional (SDCR)	04
1.3 SDCR-I induzida por Isquemia/Reperfusão	09
1.4.Receptores de potencial transitório aquirina 1 – TRPA1	11
2 OBJETIVOS	17
2.1 Geral	17
2.2 Específicos	17
3 MATERIAS E MÉTODOS	19
3.1 Aspectos éticos	19
3.2 Desenho experimental	19
3.2.1 Animais	19
3.2.2 Fármacos e reagentes	20
3.2.3 Modelo animal de isquemia-reperfusão em camundongos	21
3.2.4 Medida dos níveis de lactato e fluxo sanguíneo	22
3.2.5 Medida da temperatura e da espessura da pata e tornozelo	23
3.2.6 Avaliação da resposta nociceptiva	23
3.2.6.1 Teste do Von Frey (alodinia ao estímulo mecânico)	23
3.2.6.2 Teste da acetona (alodinia ao frio)	24
3.2.7 Avaliação do potencial antinociceptivo de um analgésico (amitriptilina)	24
3.2.8 Investigação do efeito antinociceptivo dos antagonistas do receptor TRPA1	25
3.2.9 Avaliação da administração de oligonucleotídeo anti-sentido para o receptor TRPA1	25
3.2.10 Detecção da imunoreatividade para o receptor TRPA1 por Western blot	26
3.2.11 Nocicepção espontânea induzida por administração intraplantar de isotiocianato de alila (AITC)	27
3.2.12 Determinação dos marcadores de Infiltração Celular	27
3.2.13 Imunofluorescência para o agonista TRPA (4-HNE) e presença de macrófagos	28
3.2.14 Dosagem dos níveis de peróxido de hidrogênio	29
3.2.15 Avaliação da atividade das enzimas NADPH oxidase e da superóxido dismutase (SOD)	29

3.2.16 Avaliação do tratamento com um composto antioxidante (ácido α -lipóico).....	30
3.2.17 Análise da nocicepção em camundongos com deleção genética para o receptor TRPA1 (<i>Trpa1^{-/-}</i>).....	30
3.2.18 Avaliação do efeito preventivo da administração de oligonucleotídeo anti-sentido para o receptor TRPA1.....	31
3.2.19 Avaliação do efeito preventivo da administração do antagonista do TRPA1 (HC-030031) e de um composto antioxidante (ácido α -lipóico).....	31
3.3 Análise Estatística.....	32
4 RESULTADOS.....	33
4.1 O modelo de dor pos-isquemia crônica (DPIC) aumentou o nível de lactato no plasma e nervo tibial de camundongos.....	33
4.2 O modelo de DPIC aumentou a temperatura e causou edema em camundongos.....	34
4.3 O modelo de DPIC causou alodinia mecânica e ao frio em camundongos machos e fêmeas.....	36
4.4 A administração de amitriptilina reduziu a alodinia mecânica e ao frio em camundongos após a indução de isquemia e reperfusão.....	37
4.4.5 A administração de antagonistas do receptor <i>trpa1</i> apresentou efeito antinociceptivo na fase crônica da DPIC em camundongos.....	38
4.4.6 A administração do oligonucleotídeo anti-sentido para o receptor TRPA1 reduziu a alodinia mecânica e ao frio em camundongos após a indução de DPIC.....	40
4.4.7 A indução de isquemia e reperfusão em camundongos aumentou a imunorreatividade ao receptor TRPA1 e causou hiperalgesia química.....	41
4.4.8 A fase crônica de nocicepção da DPIC em camundongos não é acompanhada por infiltração celular de células inflamatórias.....	40
4.4.9 O modelo de DPIC em camundongos causou infiltração de macrófagos e o aumento da imunoreatividade para o agonista TRPA1 (4-HNE) no nervo ciático de camundongos.....	44
4.4.10 A fase crônica do modelo de DPIC em camundongos foi acompanhada por aumento da atividade de enzimas SOD e NADPH oxidase e também dos níveis de peróxido de hidrogênio.....	46

4.4.11 A administração de um composto antioxidante reduziu a alodinia mecânica e ao frio em camundongos após a indução de isquemia e reperusão.....	48
4.4.12 Animais com deleção gênica para o receptor TRPA1 (<i>TRPA1</i> ^{-/-}) não apresentaram o desenvolvimento de nocicepção no modelo de DPIC.....	49
4.4.13 A administração do oligonucleotídeo antisentido para o receptor TRPA1 de forma preventiva inibiu o desenvolvimento de nocicepção no modelo de DPIC em camundongos.....	51
4.4.14 A administração de um antagonista do receptor TRPA1 ou do ácido α -lipóico apresentaram efeito preventivo na nocicepção observada no modelo de DPIC em camundongos.....	53
5 DISCUSSÃO.....	55
6 CONCLUSÕES.....	67
REFERÊNCIAS.....	70
ANEXO 1	82
ANEXO 2.....	83

1 INTRODUÇÃO

1.1. Dor e Nocicepção

A capacidade de detectar estímulos nocivos é essencial para a sobrevivência e bem-estar de um organismo, uma vez que a dor funciona como uma resposta de alerta aos indivíduos. No entanto, a dor pode também se tornar um sintoma debilitante, como ocorre nos casos de dor crônica (Woolf, 2010). Assim, a dor é um dos sintomas clínicos mais comuns para a procura de cuidados médicos, como também para o uso de medicamentos e dos serviços primários de saúde. O tratamento adequado para a dor ainda é um desafio terapêutico, sendo estimado que 80% da população mundial têm acesso limitado a fármacos para o tratamento de dor moderada a grave (Brennan et al., 2007; Lohman et al., 2010; Cousins e Lynch 2011; King e Fraser 2013).

Nestas situações, a dor crônica causa uma redução drástica na qualidade de vida dos pacientes e leva a muitas implicações em níveis: psicológico e emocional, maior incidência de depressão; social, reduzindo a capacidade de trabalho; fisiológico, causando o desenvolvimento de dor aguda; e econômico, reduzindo a força de trabalho e aumentando os gastos com serviços de saúde. Assim, principalmente em doenças associadas a dor crônica, o tratamento efetivo da dor deve ser considerado uma prioridade (Brennan et al. 2007; Lohman et al. 2010; Cousins e Lynch 2011; King e Fraser 2013). Porém, para muitas formas de dor ainda a carência de fármacos potentes e seguros induz ao tratamento ineficaz da dor, mostrando a necessidade da procura por novos alvos terapêuticos (Chaplan et al., 2010).

Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP, 1994), a dor é definida como “uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a uma lesão tecidual real ou potencial, ou ainda descrita em termos que sugerem tal lesão”. Já a nocicepção é caracterizada como os processos neurais de codificação e processamento de estímulos nocivos, assim é um termo fisiológico que tem sido usado para descrever estes processos. Dessa forma, o termo nocicepção é principalmente utilizado para descrever os processos dolorosos em modelos animais, uma vez que a percepção da dor é complexa e envolve também fatores afetivos e cognitivos que não podem ser avaliados em animais, como ratos ou camundongos (Loeser e Treede, 2008; Navratilova et al., 2013).

A dor pode ser classificada em dor nociceptiva, inflamatória ou

patológica. Dessa forma, a dor que é associada à proteção do organismo em circunstâncias que podem causar dano potencial aos tecidos é definida como dor nociceptiva. Esta é gerada pela ativação dos nociceptores, que são terminações sensoriais capazes de serem ativadas por estímulos nocivos e que transmitem estas informações até estruturas supra-espinais envolvidas na percepção da dor, como o tálamo e o córtex sensorial. Portanto, um determinado estímulo nociceptivo (mecânico, térmico ou químico) deve ser capaz de ativar os nociceptores expressos na periferia para que cause uma resposta dolorosa no organismo (Basbaum et al., 2009; Woolf, 2010).

Os nociceptores são definidos como as terminações periféricas livres de axônios, oriundos de neurônios sensoriais nociceptivos, sendo que o corpo celular destes neurônios está localizado nos gânglios da raiz dorsal (GRD) para o corpo, nos gânglios do trigêmeo (GT) para a face, nos gânglios nodosos (GN) e vagais (GV) para as vísceras, tendo ambos um ramo axonal periférico e central que inerva o seu órgão-alvo e a medula espinhal, respectivamente. Desta maneira, os neurônios nociceptivos são pseudo-unipolares, porque possuem terminações centrais (medula espinhal e tronco cerebral) e também periféricas (tecido onde possui inervações), as quais são capazes de detectar a informação na periferia e transmitir para as estruturas centrais (Basbaum et al., 2009). Existem duas classes principais de nociceptores nos neurônios sensoriais envolvidos na transmissão de estímulos nociceptivos, as fibras A δ e C. As fibras A δ são formadas por neurônios mielinizados de médio diâmetro, os quais medeiam a dor aguda, bem localizada ou dor rápida. A segunda classe de nociceptores inclui as fibras C que são representadas por neurônios de pequeno diâmetro e não mielinizados, os quais transmitem uma sensação de dor pulsante e moderada (Loeser e Treede, 2008; Basbaum et al., 2009; Ossipov et al., 2010; Woolf 2010).

A transmissão de um determinado estímulo nocivo depende da sua capacidade de gerar um potencial de ação quando ocorre a ativação de um nociceptor na periferia, sendo este conduzido até o corno dorsal da medula espinhal (sobretudo as lâminas I, II e V), onde ocorre a liberação de neurotransmissores excitatórios, principalmente glutamato e a substância P (SP). Após a ocorrência deste processo é possível que uma resposta reflexa ao estímulo nocivo seja gerada, e desta forma o local afetado será afastado da fonte de estímulo, sendo que esta ação é gerada pela ativação de um neurônio motor reflexo por meio de um interneurônio excitatório (Loeser e Treede, 2008; Basbaum et al., 2009; Ossipov et al., 2010; Woolf, 2010). Por outro lado, para que este sinal seja transmitido

como ordem sensorial, ele deve ascender pelos axônios provenientes de neurônios de projeção pela via espinotalâmica que apresenta terminações no tálamo ventroposterior e ventrobasal, sendo projetado para o córtex somatosensorial. E esta via é importante para o reconhecimento do local e a intensidade do estímulo doloroso (Basbaum et al., 2009; Woolf, 2010).

Além disso, uma via diferente pode conduzir os estímulos provenientes do corno dorsal da medula espinhal até o córtex insular e cingular, através de conexões no núcleo parabraquial (tronco cerebral) e na amígdala. Esta via é denominada espinoparabraquial amidalóide, e é relevante para modulação das dimensões afetivas da experiência dolorosa (Loeser e Treede, 2008; Basbaum et al., 2009; Ossipov et al., 2010; Woolf 2010).

Porém, se o estímulo causar lesão ao organismo e posterior ativação do sistema imune a dor é considerada dor inflamatória, sendo uma forma de dor relevante para a recuperação do tecido lesado (Loeser e Treede, 2008). Também, em processos inflamatórios podemos observar uma maior liberação de neuropeptídeos como o peptídeo relacionado com o gene da calcitonina (CGRP) e a SP que podem levar ao processo de inflamação neurogênica. Este processo é acompanhado regularmente da excitação de nociceptores aferentes primários, ocorrendo o extravasamento de plasma e vasodilatação (Loeser e Treede, 2008).

Na resposta imune após lesão, há presença de citocinas e a tentativa de regeneração do tecido que sensibilizam os nociceptores presentes na periferia e causam hipersensibilidade observada na inflamação. Após esse processo, deve ocorrer a homeostase que é a regulação da resposta pró-inflamatória após a infecção, e é restabelecida por condições nocivas como mecanismo de proteção para a resolução da inflamação. Assim, enquanto não ocorrer a homeostase, a dor inflamatória crônica pode acontecer, resultando por exemplo na produção aumentada de citocinas pró-inflamatórias que eventualmente levam à uma sensibilização periférica e central. Assim os receptores de membrana do nociceptor são ativados e/ou sensibilizados por substâncias pró-inflamatórias que são geradas pela lesão ativando-os e gerando a dor (McDonald et al., 2014).

Também nas formas de dor patológica, como a dor neuropática, ocorre a transmissão do estímulo sensorial, porém neste caso pode ocorrer facilitação da geração de estímulos tanto no sistema nervoso periférico quanto no sistema nervoso central, descrita como sensibilização periférica ou central, respectivamente (Hehn et al., 2012). Assim, os pacientes apresentam sintomas como dor espontânea, e também hipersensibilidade à estímulos previamente descritos como inócuos (chamado de alodinia) e

a estímulos já descritos como dolorosos (chamada de hiperalgesia) (Loeser e Treede, 2008). Uma forma de dor neuropática, que pode ocorrer o desenvolvimento tanto de dor inflamatória como de dor neuropática, e a ocorrência de hipersensibilidade e dor espontânea, é a síndrome da dor complexa regional (SDCR) (Sebastin, 2011).

1.2. Síndrome da Dor Complexa Regional (SDCR)

Uma forma de dor relatada como dor “persistente” que apresenta contraturas após certo procedimento de sangria, foi descrita pela primeira vez como a síndrome da dor complexa regional (SDCR) pelo cirurgião Ambroise Pare, na França no século XVI (Feliu e Edwards 2010). Feliu e Edwards (2010) em seus estudos afirmam que Mitchell (1872) utilizou o termo causalgia do grego *kausis*, que significa fogo, para descrever a mesma dor, e essa descrição continua sendo uma das melhores a respeito do quadro clínico da SDCR. E ainda no mesmo estudo mostraram que na Alemanha (1900), Sudeck descreveu uma síndrome dolorosa pós-traumática que incluía edema e modificações tróficas. Porém, em 1994, a IASP após uma reavaliação, nomeou este quadro como sendo a SDCR (Feliu e Edwards, 2010). Esta forma de dor foi definida como uma desordem caracterizada por uma dor intratável e incapacitante do membro afetado, que é desencadeada por várias lesões e é muitas vezes resistente à terapia padrão (Ahmad e Kumar, 2015).

Portanto é necessário o entendimento da fisiopatologia e dos mecanismos envolvidos neste tipo de dor para definir o que a constitui. O termo SDCR foi estabelecido devido a dor ser considerada essencial para o diagnóstico da síndrome, sendo que a dor pode ser aguda ou ainda perpetuar por meses ou anos, descrita como crônica (Stanton-Hicks et al., 1998). Dessa maneira, a dor crônica é caracterizada como um estado de dor neuropática, pois os pacientes relatam a sensação de dor a estímulos antes descritos como alodinia apresentando disfunção sensorial. Além disso pode ser caracterizada pelo aparecimento de hiperalgesia, além da ocorrência de dor espontânea (Stanton-Hicks et al., 1998; Loeser e Treede, 2008; Woolf, 2010). Os sintomas parecem estar envolvidos com a resposta inflamatória inicial induzida pela lesão. Isso pode ocorrer através da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) gerado por esta resposta inflamatória, e assim causando estresse oxidativo que pode estar relacionado com a indução e manutenção da dor neuropática (Gierthmuhlen et al., 2014). Estes pacientes apresentam alodinia principalmente ao frio e a estímulos mecânicos (Gierthmuhlen et al.,

2014), sendo assim possivelmente receptores envolvidos na transmissão destas formas sensoriais poderiam estar envolvidos na dor neuropática observada na SDCR.

A similaridade entre os sintomas clássicos de inflamação (dor, calor, rubor e edema) e a presença de sinais inflamatórios com alterações tróficas e alodinia mecânica na SDCR, assemelha-se à inflamação neurogênica. Na inflamação neurogênica, ocorre a ativação dos aferentes primários, levando à liberação de neuropeptídeos inflamatórios, como o peptídeo relacionado ao CGRP e a SP das terminações nervosas. Essa liberação de CGRP aumenta o fluxo sanguíneo periférico devido a vasodilatação nas arteríolas; e a liberação de SP induz o extravasamento plasmático das vênulas, causando edema, além de levar a ativação de células residentes inflamatórias (Birklein e Schmelz, 2008). A liberação de neuropeptídeos na fase aguda explica o aumento de temperatura da pele, edema, e alterações tróficas observadas nas unhas, pelo ou pele. Acredita-se que esses neuropeptídeos sejam liberados, em seu grande contingente, por nociceptores sensibilizados pelo trauma inicial. O recrutamento e sensibilização desses nociceptores leva ao aparecimento de alodinia, sinal marcante na fase crônica da SDCR (Gierthmuhlen et al., 2014). Assim, é interessante estudar os receptores expressos em nociceptores que poderiam estar causando o desenvolvimento de inflamação neurogênica e que então estariam participando destes mecanismos de sensibilização.

Esta síndrome foi descrita também como complexa, pois expressa as características clínicas variadas encontradas nessas condições como dor, edema, atividade vasomotora com mudança de coloração do membro, hiperidrose, distonia, hipotrofia muscular e osteopenia. Pode-se dizer que é regional, uma vez que, na maioria dos casos, a síndrome envolve apenas uma região do corpo, geralmente uma extremidade. Entretanto, pode ocorrer em outra parte ou se espalhar para diferentes áreas do corpo (Stanton-Hicks et al., 1998). Clinicamente, a SDCR é uma condição de dor comum incapacitante, pode ter início após um trauma, geralmente em uma extremidade. Este trauma pode ser uma fratura distal, lesão nervosa, lesão pós-cirúrgica, constrição do membro, síndromes de compressão nervosa, infarto do miocárdio, acidente vascular encefálico, infecção, injeções ou tumores (Feliu e Edwards, 2010).

Maihöfner et al., (2010) mostraram uma taxa de incidência de 5,46/100.000/ano e uma taxa de prevalência de 20,57/100.000 para a SDCR, baseados em dados epidemiológicos de uma população de Olmsted County em Minnesota nos Estados Unidos. Mas a epidemiologia

da SDCR no Brasil não está bem definida até o momento, e a distribuição da SDCR entre as faixas etárias mostra um máximo entre a quinta e a sétima década de vida e uma proporção entre o sexo feminino e o masculino de 2-3:1, respectivamente (Maihöfner et al., 2010).

A SDCR é dividida em dois tipos: tipo I e tipo II. Aquela do tipo I é chamada também de distrofia simpático reflexa (DSR), a qual trata-se de uma neuropatia que pode se desenvolver a partir de um trauma numa extremidade corpórea sem que ocorra lesão nervosa inicial. E a do tipo II, também conhecida como causalgia, diferindo do tipo I justamente por apresentar lesão nervosa inicial no nervo periférico, mesmo que parcial, para confirmação diagnóstica (Feliu e Edwards, 2010).

Entre os sintomas da SDCR tipo I, destacam-se dor espontânea, resposta dolorosa exacerbada a diversos estímulos (hiperalgesia), alodinia, disfunção da regulação vasomotora e sudomotora, mudanças tróficas na pele, cabelo, unhas e pele, e anormalidades motoras (Veldman et al., 1993). Também há evidências de que a SDCR tipo I é acompanhada por mudanças em regiões do sistema nervoso central que regulam dor e sensações somáticas como o córtex sensorial primário e secundário, da ínsula, córtex somatossensorial associativo, frontal e partes do córtex cingulado anterior. Essas evidências mostram que a percepção da dor deve ser diferente em indivíduos saudáveis e com SDCR-I tanto para dor evocada por estímulo térmico ao frio quanto para dor evocada por estímulo mecânico (Maihöfner et al., 2010).

Estudos mostram que a SDCR é frequentemente relatada como um transtorno pós-traumático doloroso de difícil tratamento (Klafke et al., 2016). Da mesma forma, outros tipos de dor como: fibromialgia, dor lombar ou dor de cabeça, que também são apenas clinicamente definidas, não possuem ainda mecanismos fisiopatológicos muito conhecidos (Trevisan et al., 2016). Tornando-se assim importante o estudo dessas patologias para o melhor tratamento desses pacientes. Até o momento, alguns estudos vêm investigando a SDCR em vários aspectos fisiopatológicos. No entanto é indicado o tratamento farmacológico para a dor, sendo também relatado a necessidade de tratamento psicológico em caso de superproteção irracional do movimento ou problemas psiquiátricos como depressão (Stanton-hicks et al., 1998; Birklein e Schlereth, 2008). Existem vários métodos de tratamento disponíveis, tais como a fisioterapia, corticosteroides, bloqueio simpático, fármacos anti-inflamatórios, antidepressivos tricíclicos, opioides e cirurgia para colocação de estimulador medular. Porém, muitas das terapias atuais são utilizadas com intuito puramente analgésico, sem que se trate a causa, por

isso é importante entender como ocorre a dor na SDCR (Allen et al., 1999; Hord e Oaklander, 2003).]

É possível que na fase aguda da SDCR ocorra uma inibição central dos neurônios vasoconstritores simpáticos, o que pode levar ao aumento da temperatura do membro afetado. Na transmissão neurovascular as mudanças secundárias aliadas ao dano endotelial induzem pele fria em pacientes e vasoconstrição, com um quadro crônico de SDCR por apresentarem disfunção sensorial, levando a alodinia e hiperalgesia nesses pacientes (Gierthmuhlen et al, 2014). Dessa maneira, a partir do conhecimento dos mecanismos envolvidos na dor na SDCR pode-se modificar o curso da síndrome de forma que a dor não se torna crônica, visando o desenvolvimento de terapias que promovam, não só a redução da dor, mas a prevenção da dor neuropática. Alguns estudos mostram que a terapia com o uso de antioxidantes e de corticosteroides podem reduzir a dor aguda e a resposta inflamatória da SDCR-I, mas a eficácia global foi baixa, e nenhum tratamento parece ser adequado para a dor crônica associada a SDCR-I (Gierthmuhlen et al., 2014). O diagnóstico correto da SDCR e o início do tratamento imediato e correto faz-se necessário para melhorar os sintomas dos pacientes antes de chegar à fase crônica, mas muitas vezes isso é difícil ocorrer pois o uso de analgésicos pelos pacientes pode diminuir a dor no primeiro momento, mas após um tempo esses não funcionam e somente depois de alguns meses é identificado a SDCR (Sebastin, 2011).

Além disso, o uso de fármacos depende do estágio da dor, a utilização de analgésicos (como o celecoxib e ibuprofeno) são úteis na fase aguda. Os fármacos opioides podem ser utilizados em pacientes na fase crônica da SDCR (Sebastin, 2011). Outro estudo traz o uso de antioxidantes, que sequestram radicais livres, como *N*-acetilcisteína (NAC) no tratamento da SDCR (Perez et al., 2003). Foi também demonstrado que a administração de vitamina C pode reduzir os sintomas de dor em pacientes (Zollinger et al., 1999), assim sugerem uma possibilidade de um efeito terapêutico deste composto no estágio inicial de SDCR. Também há provas da eficácia de antidepressivos (amitriptilina), anticonvulsivantes (dilantina) e capsaicina tópica no tratamento crônico na SDCR (Sebastin, 2011).

Os pacientes com dor aguda (inflamatória) respondem à fisioterapia, enquanto que os casos moderados ou crônicos (neuropáticos) podem requerer analgésicos, antidepressivos. Além disso, alguns pacientes necessitam de bloqueio anestésico regional que são úteis na dor moderada à grave que não respondem à terapia farmacológica, ou ainda a

neuromodulação que envolve a modulação das vias centrais da dor por uma corrente elétrica ou aplicação química ao eixo neural central, que incluem a estimulação da medula espinhal e do nervo periférico (Rho et al., 2002). A dor crônica observada na SDCR exige tratamento multidisciplinar a longo prazo, incluindo fisioterapia, apoio psicológico e medidas de alívio da dor (Sebastin, 2011).

Devido a falta da compreensão dos mecanismos envolvidos na SDCR, poucos são os tratamentos eficazes (Bruehl, 2010). Portanto, foram desenvolvidos modelos animais para o estudo da fisiopatologia da dor na SDCR-I, conforme mostra estudo com um modelo animal da SDCR tipo I após o método de isquemia e reperfusão prolongada na pata traseira de ratos (Coderre et al., 2004). Neste modelo, observou-se que o segmento corpóreo afetado apresentava uma diminuição da oxigenação pela hemoglobina capilar (HbO_2) e um aumento do lactato periférico, refletindo um aumento da glicólise anaeróbica (Coderre et al., 2004). O tecido muscular de um membro afetado de um paciente que optou pela amputação para alívio da dor causada pela SDCR-I, revelou degeneração do nervo periférico e anormalidades do músculo consistente com uma inflamação crônica, também apresenta pigmento lipofuscina, fibras hipotróficas e camadas da membrana basal dos capilares muito finas. Tais achados são existentes em condições de isquemia na presença de estresse oxidativo resultando em microangiopatia em tecidos musculares (Coderre e Bennett, 2008).

A indução da nocicepção aguda e crônica acontece devido a hipótese de que a geração de radicais livres pode ser parcialmente responsável pela SDCR-I e no modelo de dor pós-isquemia crônica (DPIC), pois segundo um estudo com antioxidantes mostra que esses foram capazes de reduzir os sinais de alodinia mecânica (Coderre et al., 2004). Marcadores de estresse oxidativo estão elevados na presença de inflamação, e foi observado que alguns pacientes com SDCR-I têm inflamação crônica profunda dos tecidos devido à patologia microvascular causada por uma lesão de isquemia-reperfusão (Coderre e Bennett, 2008). Outro estudo também avaliou a hipersensibilidade dolorosa a norepinefrina, mostrando que ratos com DPIC apresentam respostas nociceptivas anormais a agentes vasoconstritores adrenérgicos e não adrenérgicos. Assim apresentam que a hipersensibilidade persistente à vasoconstrição simpática são mecanismos importantes no modelo de dor na SDCR-I (Xanthos et al., 2008).

A investigação sobre os mecanismos envolvidos na SDCR ocorreu de forma intensiva durante as duas últimas décadas, mas ainda há escassez

sobre o tratamento adequado e os mecanismos envolvidos nos sintomas dolorosos. Portanto, é relevante avaliar os mecanismos que geram e mantêm a dor neuropática, assim o presente estudo tem como finalidade compreender os mecanismos responsáveis para o desenvolvimento e manutenção da fase crônica da SDCR-I, utilizando o um novo modelo de isquemia e reperfusão em camundongos.

1.2. SDCR-I induzida por Isquemia/Reperfusão

Uma das formas mais comuns de SDCR-I é a lesão por isquemia/reperfusão após trauma ou compressão de membros. Neste caso, ocorre a síntese de mediadores pró-inflamatórios e substâncias reativas que levam a resposta inflamatória e lesão vascular, e estes mecanismos podem estar envolvidos na lesão neuronal crônica periférica (Heumann, 1987; Wesseldijk et al., 2008; Gierthmuhlen et al., 2014). Além disso, vários estudos descrevem que nas lesões isquêmicas em nervos periféricos de animais, pode ocorrer a destruição simultânea das artérias locais e os vasos longitudinais acessíveis no epineuro (Durward, 1948; Ferrari et al., 1991). Dessa maneira tem sido sugerido que a reperfusão pode desempenhar um papel importante no desenvolvimento de lesão tecidual após isquemia do nervo (Schmelzer et al., 1989). As alterações morfológicas são em grande parte, dependentes da situação em que o nervo é avaliado, apresentando diferentes formas dependendo da fase em que se apresenta (aguda ou crônica) do sintoma doloroso (Nukada e McMorran, 1994).

Estudos mostram processos isolados ou combinados, que levam ao dano neuronal após a isquemia: como redução da disponibilidade energética (diminuição os níveis de adenosina trifosfato – ATP), o aumento de cálcio intracelular e formação de radicais livres (Taylor et al., 1996; Frantseva et al., 2001; Schaller e Graf 2004) Também, logo após a isquemia, as mitocôndrias estão debilitadas em função da hipóxia, e quando ocorre a reperfusão, a disponibilidade de oxigênio aumenta, gerando assim radicais livres. A mitocôndria é a principal fonte geradora de radicais livres após a lesão (Frantseva et al., 2001), pois o oxigênio que volta a circular pode não ser totalmente utilizado pela fosforilação oxidativa, gerando radicais livres extremamente lesivos para o tecido (Nagamatsu et al., 1996). O estresse oxidativo e os danos causados pela lesão da isquemia e reperfusão levam a formação de produtos intermediários, como por exemplo os produtos finais formados durante o

processo de lipoperoxidação, destacam-se o 4-hidroxinonenal (4-HNE), também a produção excessiva de substâncias oxidantes como o peróxido de hidrogênio (Klafke et al., 2016). Esses produtos não são complemente reduzidos e, portanto, são bastante reativos, pois a concentração destes compostos reativos é limitada em tecidos não isquêmicos. E isso ocorre pelo balanço realizado pelas defesas antioxidantes (Ferrari et al., 1991).

Após a lesão celular devido à isquemia/reperfusão ocorre também a indução da inflamação tecidual, que inclui a liberação de citocinas por células locais ou que infiltraram no tecido, contribuindo para a severidade da lesão neuronal (Aschner, 1998). Devido aos radicais livres presentes através da lesão que danificou células endoteliais de capilares, pode ocorrer a liberação de mediadores pró-inflamatórios. Dessa forma, aumenta-se a expressão de moléculas quimiotáticas que recrutam monócitos, linfócitos e plaquetas, os quais se acumulam e ocluem os capilares, causando a liberação de citocinas como o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), interleucina-1 (IL-1) e interleucina-6 (IL-6) (Coderre e Bennett, 2008). Pesquisas sobre a inflamação em humanos com SDCR comparam níveis de TNF- α e IL-6, e encontraram aumento nos níveis de citocinas apenas nos casos agudos (Huygen et al. 2002). Também, um estudo utilizando um modelo em ratos da SDCR-I mostrou aumento dos níveis de TNF- α , na fase aguda da nocicepção, mostrando a participação dessas citocinas pró-inflamatórias no desenvolvimento dessa síndrome dolorosa (Klafke et al., 2016).

Outros mecanismos foram associados ao aparecimento de dor na SDCR provocada por isquemia/reperfusão, como o aumento da concentração de cálcio intracelular e a ativação do sistema glutamatérgico e do receptor de potencial transitório anquirina 1 (TRPA1) (Taylor et al., 1996; Frantseva et al., 2001; Schaller e Graf, 2004; Sasaki et al., 2014; Klafke et al., 2016). Dessa maneira, o estudo de novos mecanismos envolvidos no desenvolvimento da lesão neuronal após a indução de isquemia é relevante, porque o tratamento com agentes antioxidantes, anti-inflamatórios ou corticosteroides não apresenta eficácia em muitos casos. Além disso, ainda não existe nenhum tratamento adequado para o tratamento da dor neuropática induzida por isquemia/reperfusão ou para a prevenção deste processo (O'Connell et al., 2016). Por isso outros alvos que medeiam esse tipo de dor como os receptores de potencial transitório (TRP) vem sendo estudados (Klafke et al., 2016).

Portanto como já foi avaliado esse modelo em ratos, no presente estudo para poder validar esse modelo em camundongos foi estudado e avaliado a validade de face, para mostrar a capacidade do modelo animal

de produzir nocicepção avaliado pelos testes de alodinia mecânica e ao frio, assim como observado em pacientes com a SDCR. Além disso foi avaliado a validade preditiva que vai se referir a sensibilidade do modelo em testar fármacos para o controle de dor. E também foi avaliado a validade de constructo que está relacionada a mimetização da fisiopatologia da SDCR no modelo animal de DPIC (Kapczinski et al., 2011).

1.3. Receptor de potencial transitório anquirina 1 (TRPA1)

Os membros da família do receptor TRP são canais catiônicos não seletivos que estão envolvidos em vários processos fisiológicos e estados patológicos (Calixto et al., 2005; Bautista et al., 2006). Os receptores TRP são sensores celulares polimodais envolvidos em uma grande variedade de processos celulares (Montell, 2005; Moran et al., 2011). Atualmente, mais de 50 membros da família TRP já foram caracterizados, sendo uma das maiores famílias de canais iônicos com ampla distribuição filogenética (Vriens et al., 2009; Minke, 2010). Em mamíferos encontram-se 28 diferentes proteínas TRP agrupadas em 6 famílias de acordo com a sua sequência de aminoácidos e designadas como: TRPV (vaniloide), TRPC (canônico), TRPM (melastatina), TRPP (policistina), TRPML (mucolipina) e TRPA (anquirina) (Clapham et al., 2001; Montell, 2011).

Os canais TRP consistem estruturalmente em seis domínios transmembrana (S1-S6), sendo que ambas as regiões amino- (NH₂) e carboxi- (COOH) terminais estão localizadas intracelularmente possuindo comprimentos variáveis. A porção carboxi-terminal é altamente conservada nos diferentes receptores TRP e pode conter uma sequência conservada composta de 23 a 25 resíduos de aminoácidos (domínio TRP), presente nas famílias TRPC e TRPM. Esta região é utilizada para marcação e descoberta de novos receptores desta família (Zhu, 2005; Venkatachalam e Montell, 2007). Próximo a região amino-terminal normalmente a proteína contém diversas repetições de anquirina, que medeiam interações específicas entre proteínas e os receptores TRP, podendo estar envolvidas na formação de complexos macromoleculares entre a membrana plasmática e o citoesqueleto (Sedgwick e Smerdon, 1999; Montell, 2005; Venkatachalam e Montell 2007). Eles também desempenham um papel central na regulação de diversas funções

fisiopatológicas, como dor crônica e inflamação, assim esses canais são estudados como possíveis alvos de fármacos (Julius, 2013).

Estes receptores começaram a ser descritos após a descoberta de uma função sensorial para o canal TRPC em *Drosophila*, onde ele funciona como um fotorreceptor (Montell e Rubin, 1989). Muitos receptores expressos em neurônios sensoriais são importantes para a percepção de estímulos nocivos, como os receptores TRPA1 e TRPV1 (receptor de potencial transiente vanilóide do tipo 1) (Basbaum et al., 2009). Estes canais têm sido indicados como importantes alvos para a descoberta de novos analgésicos, sendo que grande atenção tem sido direcionada a estudos do papel destes receptores em patologias dolorosas (Sasaki et al., 2014). 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 et al., 2011). Estudos demonstraram que uma mutação com ganho de função para o receptor TRPA1 pode levar a uma síndrome familiar de dor episódica, comprovando a importância deste receptor para a transdução de estímulos dolorosos (Kremeyer et al., 2010).

O TRPA1 é o único membro da subfamília TRPA identificado em mamíferos (Andrade et al., 2012). Este canal possui aproximadamente 14 repetições do tipo anquirina em seu longo domínio amino-terminal indicando assim o nome do canal (Cvetkov et al., 2011). Além disso, diversos resíduos de cisteína conferem a capacidade deste receptor de ser ativado por compostos reativos por meio de modificação oxidativa destes resíduos (Baraldi et al., 2010; Andrade et al., 2012). O receptor TRPA1 é geralmente expresso em sub-tipos específicos de neurônios sensoriais peptidérgicos nos gânglios da raiz dorsal, nos gânglios trigeminais, nos gânglios nodoso e vagal, sendo normalmente co-expresso com o receptor TRPV1 (Story et al., 2003; Nagata et al., 2005).

O canal TRPA1 foi primeiramente caracterizado como um termoreceptor ativado por frio nocivo (abaixo de 17°C) (Story et al., 2003). Atualmente tem se dado ênfase ao seu envolvimento na alodinia ao frio em diferentes patologias dolorosas (Sasaki et al., 2014). Porém, o envolvimento do receptor TRPA1 na detecção do frio nocivo ou ainda do calor deve ser estudado, pois acredita-se que os canais TRP respondem ao frio ou ao calor, e o subtipo TRPA1 parece estar bastante relacionado como sensor de temperatura. Também foi observado a propriedade de detecção de calor através do TRPA1 em mamíferos, podendo contribuir para a estudos de calor desconfortável e além de frio nocivo (Moparthy et al., 2016).

Além disso, alguns compostos irritantes derivados de plantas, como o isotiocianato de alila, cinamaldeído e alicina; isolados da mostarda, canela e alho, respectivamente, são capazes de estimular o TRPA1 (Bandell et al., 2004; Jordt et al., 2004; Calixto et al., 2005; Bautista et al., 2006). O canal TRPA1 é também ativado por diversos poluentes industriais e irritantes ambientais, como a acroleína (2-propenal, encontrada na fumaça de cigarro) e o formaldeído (McNamara et al., 2007; Baraldi et al., 2010; Andrade et al., 2012). Também, esse receptor é ativado por compostos endógenos reativos produzidos após dano tecidual e associados a condições dolorosas como o 4-hidroxinonal (4-HNE), espécies reativas de oxigênio como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ou de nitrogênio (NO_2) (Andersson et al., 2008; André et al., 2008; Bessac e Jordt, 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, sendo que este canal pode ser entendido como um sensor para esta modalidade de estímulo (Macpherson et al., 2005; Hinman et al., 2006; Bang et al., 2010).

O canal TRPA1 pode ser encontrado tanto na periferia, como nas terminações centrais da medula espinhal. Dessa maneira a ativação deste receptor induz influxo de cálcio e sódio causando a liberação de neuropeptídeos na periferia, como o CGRP e a SP, e também contribui para a geração de potenciais de ação (Figura 1) (Basbaum et al., 2009). Dessa forma, a estimulação dos nociceptores contendo TRPA1 gera uma série de respostas pró-inflamatórias, um fenômeno denominado de inflamação neurogênica (Richardson e Vasko, 2002; Geppetti et al., 2008). As respostas associadas à inflamação neurogênica compreendem fatores vasculares (vasodilatação arteriolar e edema causado por extravasamento plasmático das vênulas pós-capilares) e não vasculares (broncostricção, secreção glandular de muco, entre outras respostas) (Richardson e Vasko, 2002; Geppetti et al., 2008).

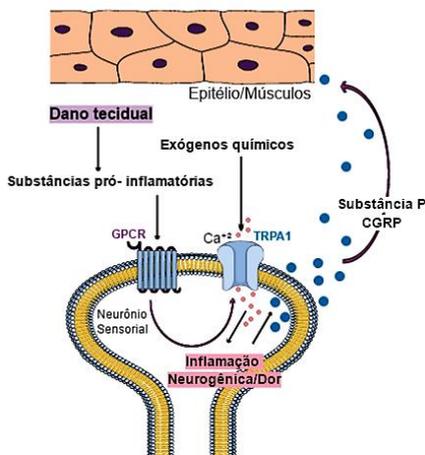


Figura 1: O receptor TRPA1 encontrado em terminações nociceptivas é relevante para a liberação de neuropeptídeos (SP e CGRP) causando inflamação neurogênica, além de auxiliar na geração de potenciais de ação que contribuem para a transmissão de estímulos dolorosos até centros supra-espinhais. Fonte: do autor.

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 et al., 2011; Andrade et al., 2012; Bautista et al., 2013). Quando ocorre a estimulação dos nociceptores contendo TRPA1 há uma série de respostas pró-inflamatórias em uma situação de inflamação neurogênica. Portanto essa estimulação do TRPA1 engloba uma série de respostas inflamatórias vasculares e não vasculares (Richardson e Vasko, 2002; Geppetti et al., 2008).

Ainda pode decorrer o aumento da expressão do TRPA1 em patologias dolorosas, pois outros modelos de dor neuropática crônica relatam alteração significativas na imunorreatividade do canal TRPA1, o que foi associado também ao desenvolvimento de hipersensibilidade ao frio causada por inflamação e danos neuronais (Obata et al., 2005; Yamamoto et al., 2015; Klafke et al., 2016). Assim a ativação do receptor TRPA1 também está envolvida no desenvolvimento de diferentes patologias dolorosas, como dor inflamatória e neuropática (Rosa et al., 2014; Klafke et al., 2016). E cada vez mais estudos sugerem que o TRPA1 pode contribuir para o surgimento da alodinia ou hiperalgesia em

muitos modelos dor neuropática, incluindo os modelos de dor por constrição do nervo ciático e trigeminal (Rosa et al., 2014; Trevisan et al., 2016), onde esses modelos demonstram envolvimento de TRPA1, e ainda sugerem que este canal possa ser normalmente ativado por subprodutos de estresse oxidativo (Trevisan et al., 2016).

Os mecanismos moleculares para a ativação e sensibilização do receptor TRPA1 ainda não são bem conhecidos em patologias dolorosas. Porém a principal hipótese seria que substâncias oxidantes produzidas durante estes estados dolorosos poderiam sensibilizar o receptor de maneira a induzir o desenvolvimento de alodinia mecânica e ao frio (Nassini et al., 2011; Materazzi et al., 2012; Trevisan et al., 2013). Também, até o momento não foi relatado nenhum efeito adverso de antagonistas do receptor TRPA1 em modelos animais, tornando o canal TRPA1 um alvo potencial para a descoberta de protótipos, buscando novas drogas analgésicas (Andrade et al., 2012; Cao et al., 2012; Bautista et al., 2013).

Recentemente, foi publicado que o canal do receptor TRPA1 poderia mediar a dor espontânea em um modelo de dor pós-isquemia aguda em camundongos (Sasaki et al., 2014; So et al., 2016). Além disso, um estudo do nosso grupo de pesquisa observou aumento dos níveis de um agonista do TRPA1, o 4-HNE após a indução de DPIC em ratos, tanto na fase aguda ou na fase crônica, adicionalmente, o antagonismo com TRPA1 reduziu a alodinia mecânica e ao frio nas duas fases (aguda e crônica) após o modelo de DPIC em ratos (Klafke et al., 2016). Porém, ainda não foi muito explorado o envolvimento do receptor TRPA1 na manutenção da dor neuropática observada em um modelo de SDCR-I.

O receptor TRPA1 parece participar de diferentes formas de nocicepção, assim os antagonistas da TRPA1 foram desenvolvidos por diversos grupos de pesquisa para serem utilizados como analgésicos (Preti et al., 2015). Além disso, nenhum efeito adverso grave foi descrito para esses compostos. Porém, alguns estudos têm relacionado a possibilidade do TRPA1 de modular funções centrais, como memória e aprendizagem (Lee et al., 2015). Nessa perspectiva, os efeitos colaterais destes compostos devem ser melhor avaliados em estudos futuros.

Como o desenvolvimento de dor neuropática na SDCR-I não apresenta tratamento eficaz (Ahmad e Kumar, 2015) é relevante a procura por novos tratamentos e também formas de prevenção para o sintoma doloroso apresentado na síndrome. Dessa forma, além do envolvimento de espécies reativas e do processo inflamatório no desenvolvimento da lesão neuronal na SDCR-I, o receptor TRPA1 poderia ser um mediador

deste processo. Então, o objetivo deste estudo foi avaliar a participação do receptor TRPA1 na manutenção da fase aguda e crônica da nocicepção no modelo de dor induzida por isquemia/reperfusão em camundongos. Além disso, foi avaliado se o tratamento com um antagonista do receptor TRPA1 ou um antioxidante poderiam prevenir o desenvolvimento de dor neuropática.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o envolvimento do receptor TRPA1 no desenvolvimento e manutenção da nocicepção aguda e crônica no modelo de dor induzida por isquemia/reperfusão em camundongos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Desenvolver um modelo de dor induzida por isquemia/reperfusão em camundongos observando marcadores de isquemia e inflamação, ou repostas nociceptivas envolvidas nas fases aguda ou crônica;
2. Avaliar o potencial antinociceptivo de um antidepressivo (amitriptilina) em um modelo dor induzida por meio de isquemia/reperfusão em camundongos durante a fase crônica;
3. Investigar o efeito antinociceptivo dos antagonistas do receptor TRPA1 (HC-030031 e A-967079) durante a fase crônica da nocicepção no modelo de dor induzida por isquemia/reperfusão em camundongos;
4. Observar o desenvolvimento da nocicepção relacionada à isquemia/reperfusão após a administração intratecal de oligonucleotídeo anti-sentido para o receptor TRPA1 durante a fase crônica;
5. Estudar a expressão do receptor TRPA1 em nervo ciático na fase crônica da indução da isquemia/reperfusão em camundongos;
6. Observar se a administração intraplantar de um agonista TRPA1 causaria hiperalgesia química na fase crônica do modelo de dor induzida por isquemia/reperfusão em camundongos;
7. Determinar a atividade das enzimas mieloperoxidase e NAGase em pata e nervo ciático em um modelo de dor induzida por isquemia/reperfusão em camundongos;
8. Realizar a imunofluorescência do nervo ciático para observar a migração de macrófagos e a imunoreatividade para o 4-HNE;
9. Avaliar a possível participação do agonista endógeno do receptor TRPA1 (peróxido de hidrogênio), da atividade da NADPH oxidase e da superóxido dismutase na fase crônica da DPIC;
10. Avaliar o potencial antinociceptivo de um composto antioxidante (ácido α -lipóico) em um modelo dor induzida por meio de isquemia/reperfusão em camundongos durante a fase crônica;
11. Analisar o desenvolvimento da dor relacionada à isquemia/reperfusão em camundongos com deleção genética para o receptor TRPA1 (*Trpa1*^{-/-}) ou animais selvagens (*Trpa1*^{+/+});

12. Avaliar o efeito protetor da administração intratecal de oligonucleotídeo anti-sentido para o receptor TRPA1 no desenvolvimento da nocicepção relacionada à isquemia/reperfusão em camundongos;

13. Avaliar o potencial preventivo de um antagonista do receptor TRPA1 (HC-030031) ou de um composto antioxidante (ácido α -lipóico) em um modelo dor induzida por meio de isquemia/reperfusão em camundongos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Aspectos éticos

Os experimentos foram realizados nas instalações do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC ou do Departamento de Ciências da Saúde, Setor de Farmacologia Clínica e Oncologia da Universidade de Florença, Itália. Os experimentos *in vivo* e as coletas de tecidos realizados na Universidade de Florença, e ocorreram de acordo com a União Européia (UE) e a legislação italiana (DLgs 26/2014, aplicação da Diretiva da UE 2010/63/UE) para procedimentos de cuidados com animais, e sob licença de pesquisa da Universidade de Florença (#194/2015-PR).

Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as recomendações internacionais para o cuidado e o uso de animais de laboratório, além das recomendações para o uso de animais do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e com a aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade do Extremo Sul Catarinense (CEUA, número de protocolo 009/2015-1, ANEXO 1 e 2). Também, o número de animais e de estímulos nociceptivos foram os mínimos necessários para demonstrar os efeitos consistentes dos protocolos (Zimmermann, 1983).

3.2. DESENHO EXPERIMENTAL

3.2.1 Animais

Foram utilizados camundongos C57BL/6 machos e fêmeas (20-30 g), adultos (60 dias de idade) obtidos do biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense. Os animais foram acondicionados em 5 animais por caixa, com ciclo claro-escuro de 12 horas (07:00 às 19:00) e comida e água *ad libitum*. O ambiente foi mantido a temperatura de $23 \pm 1^\circ \text{C}$. Os experimentos foram também realizados utilizando camundongos machos e fêmeas adultos (20-30 g) criados no biotério do Departamento de Ciências da Saúde, da Universidade de Florença (Itália), do tipo selvagem

(*Trpa1^{+/+}*) ou com deleção gênica para o receptor TRPA1 (*Trpa1^{-/-}*; B6; 129P-TRPA1tm1KykW/J), que foram produzidos por cruzamento de heterozigotos com animais a partir de camundongos C57BL/6 (Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine, EUA)(Kwan et al., 2009). Os camundongos (*Trpa1^{+/+}* e *Trpa1^{-/-}*) foram alojados em ambiente com temperatura controlada, no número de 5 animais por caixa com maravalha e material de nidificação, mantidos a 22 ± 1 °C. Os animais foram alojados com uma Luz/ciclo escuro de 12 horas (luzes acesas em 07:00 a.m.) e alimentados com comida de roedores (Global Diet 2018, Envigo, Milão, Itália) e água da torneira *ad libitum*.

Em todos os experimentos comportamentais permitiu-se que os animais aclimatassem em seu alojamento durante pelo menos 7 dias antes da experimentação e na sala experimental por 1 hora antes dos experimentos. Os experimentos comportamentais foram realizados em ambiente silencioso com temperatura controlada (20 a 22 °C) entre 9 a.m. e 5 p.m. Os pesquisadores fizeram a análise de modo cego ao tratamento medicamentoso e genótipo na realização dos testes e ao grupo experimental, quando da realização dos protocolos experimentais foi seguido o protocolo ARRIVE guidelines (Kilkenny et al., 2011).

Após a indução da isquemia/reperfusão foram investigados diversos parâmetros moleculares através de análises bioquímicas descritas a seguir. Para isso os animais foram eutanasiados por método químico utilizando tiopental (50 mg/kg/10 mL, intraperitoneal). Após os testes de nocicepção que foram avaliados do 1° ao 17° dia após a indução da isquemia/reperfusão. Quando necessário o animal recebeu uma dose maior de tiopental até não possuir mais reflexos, e após foram coletadas as amostras de sangue, pele da pata, nervo tibial e nervo ciático, que foram rapidamente removidas e armazenadas de forma adequada para cada dosagem.

3.2.2 Fármacos e reagentes

Os fármacos e reagentes utilizadas no presente estudos foram HC-030031 [2(1,3-dimetil-2,6-dioxo- 1,2,3,6-tetra-hidro-7H-purin-7-il) -N-(4-isopropilfenil) acetamida] que foi sintetizado como previamente descrito (Andrè et al., 2008). A amitriptilina utilizada foi da marca TOCRIS. Todos os oligonucleotídeos utilizados foram da marca idt. Procedência (EUA). A acetona foi adquirida da Vetec (Rio de Janeiro,

Brasil). As outras substâncias que não foram indicadas de outro modo, incluindo o ácido α -lipóico e o A-967079 [(1E, 3E) -1- (4-fluorofenil) -2-metil-1-penten-3-ona Oxima] foram obtidos a partir da marca Sigma-Aldrich (Sigma, St Louis, MO, EUA).

3.2.3. Modelo animal de isquemia e reperfusão em camundongos

Segundo o modelo da SDCR tipo I desenvolvido em ratos, chamado de DPIC, esse é realizado após a exposição prolongada a isquemia e reperfusão por um período de 3 horas (Coderre et al., 2004). Porém, o presente estudo é o primeiro modelo em camundongos C57BL/6 de DPIC, assim padronizou-se a exposição pelo tempo de 2 horas à isquemia com os animais anestesiados com uma mistura de cetamina e xilazina (90 mg/kg e 3 mg/kg, respectivamente, i.p.). Após a indução da anestesia, um torniquete elástico (Elástico Ligadura Stick Ortho Technology) foi colocado ao redor da pata traseira esquerda do camundongo ficando próximo a articulação do tornozelo. A cessação da anestesia foi programada para que os camundongos se recuperaram totalmente dentro de 30-60 minutos após a reperfusão, que ocorreu imediatamente após a remoção do torniquete. No grupo controle os camundongos tiveram exatamente o mesmo tratamento anestésico, porém o torniquete de elástico foi cortado de modo que apenas vagamente ficou rodeado ao tornozelo, e não teve a função de obstruir o fluxo sanguíneo na pata traseira do grupo controle, de acordo com Coderre et al. (2004).

Os primeiros testes para observar o desenvolvimento de DPIC foram realizados do 1º até o 17º dia após a indução de isquemia/reperfusão. Após esse período pode-se avaliar o desenvolvimento de alodinia mecânica, alodinia ao frio e edema na fase aguda (1º dia) e o desenvolvimento de alodinia mecânica e ao frio até a fase crônica (17º dia). Portanto foi essa fase crônica a escolhida para os testes na avaliação do efeito dos tratamentos. A fase crônica foi aquela considerada como neuropática pelos experimentadores, e como é aquela de maior dificuldade de tratamento clínico (Klafke et al. 2016), foi a fase principalmente explorada neste estudo. Também, o papel do receptor TRPA1 já foi estudado em modelos agudos de isquemia e reperfusão (Sasaki et al., 2014; Klafke et al., 2016; So et al., 2016), por este motivo o foco principal do estudo em questão é o tratamento e prevenção da fase crônica da DPIC.



Figura 2: Demonstração do torniquete de borracha localizado na pata traseira direita do animal. Fonte: do autor.

3.2.4 Medida dos níveis de lactato e fluxo sanguíneo

O lactato se acumula durante a privação de oxigênio (Rogatzki et al., 2015; Klafke et al., 2016) portanto para confirmar o desenvolvimento de isquemia foi realizada medições de lactato no sangue dos camundongos de um grupo com DPIC e outro grupo controle. Para isso, amostras do nervo tibial e o sangue dos camundongos foram rapidamente removidos, o sangue foi centrifugado e obtido o plasma, o tecido foi homogeneizado e foram armazenados de forma adequada para cada dosagem do lactato. A dosagem de lactato foi realizada por meio de um analisador automatizado Cobas MIRA, e os resultados foram expressos como mg/dL.

Também foram realizadas imagens de ultrassom (por meio do aparelho Voluson 730 PRO) da pata traseira dos camundongos para avaliar o fluxo sanguíneo, tendo que se apresentar normal sem o torniquete de borracha (grupo controle), e logo após a presença do torniquete na pata com o animal anestesiado deverá mostrar uma queda no fluxo sanguíneo no primeiro momento avaliado, desse modo pode-se confirmar o modelo de isquemia e reperfusão.

3.2.5 Medida da temperatura e da espessura da pata e tornozelo

Para observar o desenvolvimento de edema da pata posterior, a espessura da pata traseira esquerda e tornozelo esquerdo foram medidos utilizando um paquímetro digital obtendo um valor basal antes da isquemia e reperfusão (Trevisan et al., 2013). Medidas do teste foram obtidas 2, 3 e 24 horas após a isquemia/reperfusão e estas medidas foram comparadas com os valores basais.

Também, foi realizado o procedimento para a avaliação da temperatura através da diferença da medida de temperatura da pata do valor basal e do valor depois do procedimento de isquemia e reperfusão, nos mesmos tempos utilizados na avaliação do edema. Para isso, mediu-se uma vez a temperatura da superfície dorsal de cada pata traseira com a utilização de um termômetro digital (Termômetro Digital Infravermelho Sem Contato, Techline). Medidas do teste foram obtidas em 2, 3 e 24 horas após a isquemia/reperfusão e estas medidas foram comparadas com os valores basais.

3.2.6 Avaliação da resposta nociceptiva

Todos os testes foram avaliados antes (basal) e após a indução da isquemia e reperfusão (Klafke et al., 2016). As mesmas medidas de nocicepção foram avaliadas quando houve a administração dos fármacos em diferentes intervalos de tempo (1, 2 e 3 horas) para a avaliação da curva de tempo do efeito do fármaco administrado, e quando avaliado a resposta preventiva dos fármacos administrados desde a fase aguda (1º dia) até a fase crônica (17º dias) após a indução da DPIC ou grupo controle.

3.2.6.1 Teste do von Frey (alodinia ao estímulo mecânico)

Para estudar a sensibilidade a estímulos mecânicos foi realizado o teste utilizando filamentos de von Frey de intensidade crescente, como descrito anteriormente (Dixon, 1980; Rossato et al., 2011; Trevisan et al., 2012). Brevemente, os animais foram ambientados no local de experimentação, que consiste em câmaras elevadas com chão de tela metálica por 1 hora. Após esse período, foi realizada a estimulação da pata traseira direita de cada animal com filamentos de von Frey pelo

método de “up-and-down”. O primeiro filamento utilizado promoveu uma pressão de 0,6 g e caso ocorresse retirada da pata foi aplicado um filamento com pressão menor. Porém, caso não ocorresse retirada da pata foi utilizado um filamento com pressão maior. No total, foram realizadas seis estimulações, utilizando os filamentos de 0,07; 0,16; 0,40; 0,60; 1; 1,4; 2,0; e 4,0 g. Com os resultados obtidos, foi calculado o valor correspondente a 50% do limiar (em g), que cada animal suporta (limiar 50%). Uma diminuição deste valor foi considerada como alodinia mecânica e uma reversão nesta queda como sendo um efeito antinociceptivo (anti-alodínico) (Dixon, 1980).

3.2.6.2 Teste da acetona (alodinia ao frio)

Para estudar o tempo de nocicepção foi realizado o teste da gota de acetona. Após os animais serem ambientados, uma gota de acetona (20 µL) foi colocada na superfície dorsal da pele da pata dos animais. As respostas comportamentais para a gota de acetona foram cronometradas utilizando um cronômetro digital e medido o tempo em segundos, como descrito anteriormente (Trevisan et al., 2013).

3.2.7 Avaliação do potencial antinociceptivo de um antidepressivo (amitriptilina)

O composto analgésico amitriptilina foi utilizado como controle positivo do modelo de dor induzida por isquemia e reperfusão em camundongos. Para isso foi realizada a administração intragástrica (i.g.) de amitriptilina (20 mg/kg) (Jeanson et al., 2016) ou veículo (1% de DMSO em salina, NaCl 0.9%). Os tratamentos foram realizados 17 dias após a indução da DPIC e as medidas de nocicepção de alodinia mecânica e alodinia ao frio foram observadas no tempo de 1, 2 e 3 horas após o tratamento, também uma medida basal foi realizada antes e após 17 dias da isquemia/reperfusão.

3.2.8 Investigação do efeito antinociceptivo dos antagonistas do receptor TRPA1

Para avaliar o papel do TRPA1 na nocicepção crônica do modelo de DPIC, foram utilizados os antagonistas TRPA1 seletivos HC-030031 e A-967079. Assim, estes compostos foram administrados por via i.g., HC-030031 (300 mg/kg) e A-967079 (60 mg/kg). Doses de administração de fármacos foram baseados em dados anteriores (McNamara et al., 2007; Eid et al., 2008; Trevisan et al., 2012, 2013), para o veículo foi utilizado DMSO a 1% em NaCl a 0,9% em todos os testes. Os tratamentos foram realizados 17 dias após a indução da isquemia/reperfusão, e as medidas de nocicepção através da alodinia mecânica e alodinia ao frio foram observadas no tempo de 1, 2 e 3 horas após o tratamento, também uma medida basal foi realizada antes e após 17 dias da isquemia/reperfusão.

3.2.9 Avaliação da administração de oligonucleotídeo anti-sentido para o receptor TRPA1

Os animais receberam a administração por via intratecal (volume de 5 µL) do oligonucleotídeo anti-sentido para o TRPA1 (30 µg/kg/10 mL) ou do controle do oligonucleotídeo anti-sentido para o TRPA1 (30 µg/kg/10 mL) (Katsura et al., 2006), por 3 dias antes da fase crônica (dias 14, 15 e 16), ou o tratamento foi realizado em animais controle (Figura 3). A administração está de acordo com o método anteriormente descrito (Hylden e Wilcox, 1980), e foram realizadas em animais conscientes, a fim de eliminar a possível interferência de anestésicos. Uma agulha conectada a uma microseringa (25 µl), por intermédio de uma cânula de polietileno, foi inserida através da pele, fixando-se entre as vértebras no espaço subdural entre os segmentos espinhais L5-L6. No tempo de 24 horas (dia 17) após a última administração intratecal do oligonucleotídeo anti-sentido para TRPA1 ou do controle do oligonucleotídeo anti-sentido para TRPA1, foram realizadas medidas de limiar mecânico e térmico ao frio nos camundongos, também uma medida basal foi realizada antes da isquemia/reperfusão.



Figura 3: Esquema da administração intratecal do oligonucleotídeo anti-sentido para o TRPA1 ou controle. Fonte: do autor.

3.2.10 Detecção da imunoreatividade para o receptor TRPA1 por Western blot

O possível aumento da imunoreatividade do receptor TRPA1 após 17 dias da indução de isquemia/reperusão foi analisado por técnica de Western blot (Trevisan et al., 2013). Para isso, os animais foram submetidos a isquemia/reperusão e 17 dias após, as amostras do nervo ciático foram removidas. Estas amostras foram então homogeneizadas em tampão de lise contendo (em mM): 50 Tris, 150 NaCl, 2 EGTA, 100 de NaF, 1 Na_3VO_4 , Nonidet P40 a 1%, pH 7.5, e um conjunto de inibidores de protease (Roche, Basel, Switzerland). Os lisados foram centrifugados a $8000 \times g$, a 4°C durante 45 minutos e a concentração de proteína no sobrenadante foi determinada usando o ensaio de Bio-Rad DC proteína. As amostras com quantidades iguais de proteínas ($30 \mu\text{g}$) foram em seguida separadas por eletroforese em gel de 10% SDS-poliacrilamida e transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Merck Millipore Billerica, MA). Após, as membranas foram incubadas com uma solução de bloqueio contendo molico 5% em tampão Tris (20 mM Tris, pH 7.5, NaCl 150 mM) e 0.1% de Tween 20 durante 1 hora à temperatura ambiente, seguida de uma incubação com anticorpo monoclonal primário anti-TRPA1 (Novus Biologicals, Littleton, CO, USA) a 4°C durante a noite. As membranas foram então incubadas com anticorpo secundário IgG anti-coelho conjugado com peroxidase (Bethyl Laboratories Inc., Cambridge, UK) durante 1 hora à temperatura ambiente e então reveladas

com kit 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 com β -actina.

3.2.11 Nociceção espontânea induzida por administração intraplantar de isotiocianato de alila (AITC)

A hiperalgesia química para um agonista TRPA1 foi determinada no modelo de DPIC na fase crônica utilizando o agonista TRPA1 (AITC). Para isso, os animais após o procedimento de isquemia e reperfusão e tanto os animais controles foram colocados em caixas transparentes de 20 x 20 x 20 cm e adaptados por 20 minutos no local (Trevisan et al., 2013b). Após este tempo, 20 μ l de AITC (dose de 1 nmol/pata) foram injetados de forma intraplantar sob a superfície da pata traseira direita dos camundongos. Durante 5 minutos foi cronometrado o tempo que o animal permaneceu lambendo a pata, o que foi considerado como indicativo de nociceção.

3.2.12 Determinação dos marcadores de infiltração celular

Para avaliar a infiltração celular gerada pela indução da isquemia/reperfusão (17 dias após a DPIC), foi determinada a atividade das enzimas N-acetil- β -D-glucosaminidase (NAGase) e mieloperoxidase (MPO) como marcadores de presença de macrófagos ou neutrófilos (infiltração celular), respectivamente (Suzuki et al., 1983; Lloret e Moreno 1995). Para isso, amostras da pele da pata e do nervo ciático foram homogeneizadas em tampão acetato de sódio (8 mM, pH 5.5, 0,5% HTAB), centrifugadas a 16.000 x g, 4°C por 20 minutos e o sobrenadante foi dividido em duas alíquotas. Para a determinação da NAGase, 25 μ L de amostra foi incubada com 25 μ L de p-nitrofenil-2-acetamida- β -D-glicopiranoside (2.24 nM) e 100 μ L de tampão citrato de sódio (50 mM, pH 4.5) a 37°C por uma hora. Após, 100 μ L de tampão glicina (0.2 μ M, pH 10.4) foi adicionado para finalizar a reação e a coloração desenvolvida foi lida a 405 nm. Para determinar a atividade da MPO, 10 μ l de amostra foi incubada com 200 μ l de tampão acetato e 20 μ l de tetrametilbenzidina (18.4 mM) a 37°C por 3 minutos. A reação foi finalizada pela adição de 30 μ l de ácido acético, em banho de gelo, e a coloração desenvolvida será

lida a 630 nm. Ambas as reações serão lidas em um leitor de placas FisherBiotech Microkinetics Reader BT 2000. Valores foram expressos como densidade ótica por mg de proteína na amostra, determinada pelo método de Bradford (1976).

3.2.13 Imunofluorescência para o agonista TRPA (4-HNE) e presença de macrófagos

Para observar se a indução da isquemia/reperfusão era acompanhada por adaptações neurais em fibras aferentes foi observada a marcação para o 4-HNE (um agonista TRPA1) e também um marcador de macrófagos no nervo ciático dos camundongos (Trevisan et al. 2016). E estas avaliações foram realizadas 17 dias após a indução da isquemia/reperfusão ou no grupo controle. Para isso, amostras de nervo ciático, foram preparadas para a detecção da imunofluorescência para F4/80 (marcador de macrófagos) ou 4-HNE (agonista TRPA1). Assim, os nervos ciáticos foram removidos, pós-fixados durante 24 horas e embebidos em formaldeído 4% e ácido pícrico 12.5% em PBS (0.1 M), e após foram crioprotetidos durante a noite a 4°C em 30% de sacarose até a criosecção. As criosecções com cortes congelados (10-20 μm) foram realizados em um microtomo manual rotativo, logo essas foram incubadas com o anticorpo primário F4/80 (1:50, termo Fisher) ou 4-HNE (1:40, HNEJ-2, Abcam) (1 hora à temperatura ambiente) diluído em solução de bloqueio fresca (PBS, pH 7,4, 10% de soro de cabra normal, NGS). As seções foram então incubadas com anticorpos secundários fluorescentes: Goat anti-Mouse Alexa Fluor® 488 (1: 600, Invitrogen, Milão, Itália) diluído 1:600 (2 h, protegido da luz). E logo foram cobertas utilizando um meio de montagem à base de água com 4'6'-diamidino-2-fenilindole (DAPI) (Abcam, Cambridge, UK). A análise de controles negativos (não imunes Soro) foi realizada simultaneamente para excluir a presença de coloração imunofluorescente não específica, imunocoloração cruzada. O número de células F4/80 foi contada em caixas de $10^4 \mu\text{m}^2$ dentro das linhas tracejadas dos ramos lesados do nervo ciático. A coloração com F4/80 ou 4-HNE foram avaliadas como a intensidade de fluorescência medida por um programa de processamento de imagem (ImageJ 1.32J, National Institutes of Health, Bethesda, EUA) (Trevisan et al., 2016).

3.2.14 Dosagem dos níveis de peróxido de hidrogênio

O possível aumento da concentração de peróxido de hidrogênio (agonista TRPA1) foi observado na pele da pata e no nervo ciático 17 dias após a indução de isquemia/reperfusão ou no grupo controle. 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 H₂O₂ foi determinado pelo método de vermelho de fenol utilizando a peroxidase do rabanete (HRPO). A cada 0,075 mL do ensaio, 0.075 mL do homogenato sobrenadante e 0.5 mL de vermelho de fenol (200 µg/mL) e HRPO (100 µg/mL) foram adicionados e incubados à 25°C por 10 minutos. Ao final da incubação, 100 µL 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 nanomoles de H₂O₂ por mg de proteína (mmol/mg), sobre a base de uma curva padrão de oxidação mediada por HRPO, de vermelho de fenol por H₂O₂ (Trevisan et al., 2013). Os valores foram expressos como densidade óptica, corrigida pelo conteúdo de proteína, que foi mensurado pelo método de Bradford (1987).

3.2.15 Avaliação da atividade das enzimas NADPH oxidase e da superóxido dismutase (SOD)

A atividade da NADPH oxidase foi observada em amostras da pele da pata e no nervo ciático 17 dias após a indução de isquemia/reperfusão ou no grupo controle, utilizando um kit de ensaio comercialmente disponíveis (CY0100, citocromo c redutase, NADPH Kit de Ensaio, Sigma-Aldrich, Milão, Itália). Resumidamente, a pele da pata e no nervo ciático foram homogeneizados em 50 mM de tampão de fosfato (pH 7,4) e centrifugados durante 10 minutos a 3.000x 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 de NADPH. Os valores da atividade da NADPH oxidase foram descritos como U/mL/mg de amostra. A atividade da SOD foi realizada como descrito anteriormente (Bannister e Calabrese, 1987). Resumidamente, 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 2000x g a 4 °C durante 3 minutos. Depois, a amostra (20 ul) foi misturada com adrenalina (20 ul, 60 mM) e tampão de glicina (1,000 mL, 50 mM, pH

11) incubada a 33°C, e as alterações na absorvância foram observadas a 480 nm e monitoradas durante 5 minutos. Os valores da atividade da SOD foram descritos como U/mL/mg de amostra.

3.2.16 Avaliação do tratamento com um composto antioxidante (ácido α -lipóico)

Para avaliar o efeito antinociceptivo de um composto antioxidante no modelo de DPIC, foi utilizado o composto ácido α -lipóico (100 mg/kg) (Benemei et al., 2014a) ou veículo (1% de DMSO em salina, NaCl 0.9%). Os tratamentos foram realizados 17 dias após a indução da isquemia/reperfusão, e as medidas de nocicepção de alodinia mecânica e alodinia ao frio foram observadas no tempo de 1, 2 e 3 horas após o tratamento, também uma medida basal foi realizada antes e após 17 dias da isquemia/reperfusão.

3.2.17 Análise da nocicepção associada à isquemia-reperfusão em camundongos com deleção genética para o receptor TRPA1 (*Trpa1*^{-/-})

Os experimentos foram realizados utilizando camundongos da Universidade de Florença (Itália) do tipo selvagem (*Trpa1*^{+/+}) ou com deleção gênica para o receptor TRPA1 (*Trpa1*^{-/-}), para isso foi realizado o mesmo procedimento de DPIC pelo tempo de 2 horas com os animais anestesiados com uma mistura de cetamina e xilazina (90 mg/kg e 3 mg/kg, respectivamente, i.p.). Após a indução da anestesia, um torniquete elástico foi colocado ao redor da pata traseira esquerda do camundongo ficando próximo a articulação do tornozelo. A cessação da anestesia foi programada para que os camundongos se recuperaram totalmente dentro de 30-60 minutos após a reperfusão, que ocorreu imediatamente após a remoção do torniquete. Os primeiros testes para observar o desenvolvimento de dor isquêmica foram realizados do dia 1°, 5°, 9°, 12° e até o 17° dia após a indução de isquemia/reperfusão. Após esse período pode-se avaliar o desenvolvimento de alodinia mecânica através do limiar mecânico utilizando filamentos de von Frey, e ainda alodinia ao frio que foi avaliada pela exposição da pata traseira do animal a gota de acetona (20 μ l) e contado o tempo em segundos que o animal apresentou nocicepção.

3.2.18 Avaliação do efeito preventivo da administração de oligonucleotídeo anti-sentido para o receptor TRPA1

Os animais receberam a administração por via intratecal (volume de 5 μ L) do oligonucleotídeo anti-sentido para o TRPA1 (30 μ g/kg/10 mL) (Katsura et al., 2006), ou do controle do oligonucleotídeo anti-sentido para o TRPA1 (30 μ g/kg/10 mL) por 3 dias consecutivos. Esses animais receberam a administração antes (dias -2, -1) e no dia da isquemia/reperfusão (dia 0 que foi realizado o modelo da DPIC). No tempo de 24h após a última administração intratecal do oligonucleotídeo anti-sentido para TRPA1 ou do controle do oligonucleotídeo anti-sentido para TRPA1 foram realizadas medidas de limiar mecânico e térmico ao frio, e também 5, 9, 12 e 17 dias após ao procedimento de isquemia/reperfusão (Figura 4).

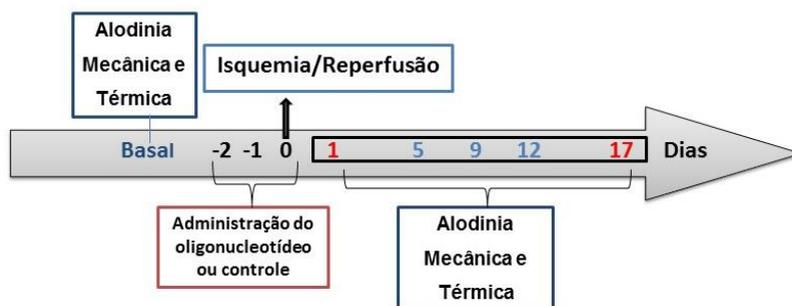


Figura 4: Esquema da administração do oligonucleotídeo anti-sentido para TRPA1 ou controle para o efeito preventivo das fases aguda e crônica induzidas pela DPIC. Fonte: do autor.

3.2.19 Avaliação do efeito preventivo da administração do antagonista do TRPA1 (HC-030031) e de um composto antioxidante (ácido α -lipóico)

Para a avaliação do efeito preventivo foi realizada a administração do antagonista do TRPA1 (HC-030031, 300 mg/kg, i.p.) (McNamara et al., 2007; Eid et al., 2008; Trevisan et al., 2012, 2013) em um grupo de animais e o outro grupo de animais recebeu a administração de ácido α -lipóico (100mg/kg, i.p.) (Benemei et al., 2014) ou veículo (DMSO a 1%

em NaCl a 0,9%) administrados por via i.g. As administrações foram realizadas no dia da isquemia/reperfusão, após cortar o torniquete de borracha (neste dia os animais foram administrados 3 vezes com intervalo de 2 horas) e por 3 dias consecutivos foi realizada a administração dos tratamentos 1 vez ao dia (24 horas após a administração do primeiro dia). Então, os primeiros testes nociceptivos de medida de limiar mecânico e térmico para observar o tratamento da dor isquêmica foram realizados do dia 1º, 5º, 9º, 12º e até o 17º dia após a indução de isquemia/reperfusão nos dois grupos de animais (Figura 5).

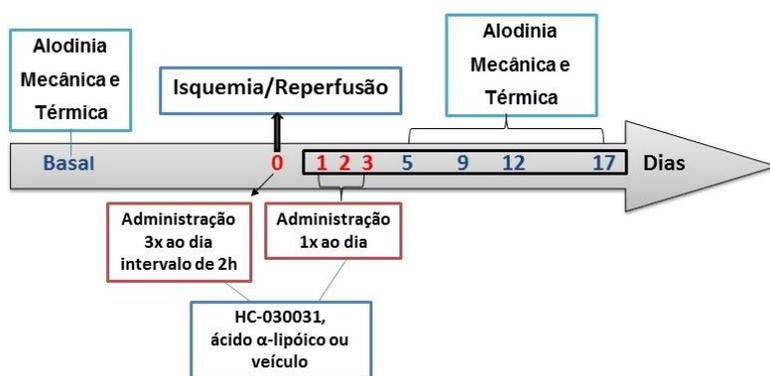


Figura 5: Esquema da administração do antagonista TRPA1 (HC-030031), ácido α -lipóico ou veículo para prevenção das fases aguda e crônica induzidas pela DPIC. Fonte: o autor

3.3 Análise estatística

Os dados foram expressos como a média \pm erro padrão da média e foram analisados estatisticamente por teste T-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 foram menores que 0.05 ($P < 0.05$), utilizando o programa GraphPad Prism 5.0.

4 RESULTADOS

4.1 O MODELO DE DOR POS-ISQUEMIA CRÔNICA (DPIC) AUMENTOU O NÍVEL DE LACTATO NO PLASMA E NERVO TIBIAL DE CAMUNDONGOS

Observou-se aumento dos níveis de lactato periférico (Figura 6A) e no nervo tibial (Figura 6B) 1 dia após a indução de DPIC. Porém, após 17 dias da indução de isquemia e reperfusão os níveis de lactato periférico e de lactato do nervo tibial retornaram aos níveis basais (Figura 6A e 6B). Os níveis de lactato no nervo tibial têm a importância de mostrar o processo isquêmico local induzido pelo torniquete de borracha, enquanto que a medida de lactato no sangue periférico demonstra o efeito global do modelo de DPIC. Os níveis de lactato foram observados em camundongos machos e fêmeas.

A indução da isquemia foi confirmada também através de imagens de ultrassom na pata traseira dos camundongos, onde foi avaliado o fluxo sanguíneo antes da aplicação do torniquete, durante a isquemia e também no final da aplicação do torniquete (2 horas após). Os camundongos apresentaram um grau moderado de acúmulo de líquido no tecido subcutâneo na superfície dorsal da pata traseira, embora a mesma permaneceu com cianose durante o tempo de isquemia e sem fluxo sanguíneo (dados não mostrados).

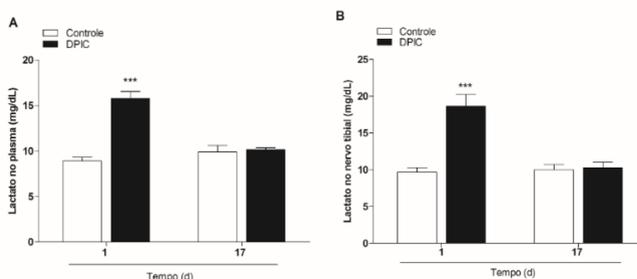


Figura 6. O modelo de dor pós-isquemia crônica (DPIC) causou aumento agudo nos níveis de lactato no plasma e no nervo tibial de camundongos. Avaliação dos níveis de lactato mensurado no (A) plasma ou no (B) nervo tibial. Os níveis de lactato foram medidos nos dias 1 e 17 após a indução de isquemia e reperfusão nos grupos DPIC ou no grupo controle. Os valores de lactato foram representados como média + S.E.M. (n = 4-6 animais). *** $P < 0.001$, quando comparado ao grupo DPIC com controle.

4.2 O MODELO DE DPIC AUMENTOU A TEMPERATURA E CAUSOU EDEMA EM CAMUNDONGOS

Ainda para caracterizar e confirmar o modelo de DPIC foram realizadas as medidas de temperatura da pata e do edema de pata e tornozelo do animal que recebeu o torniquete de borracha para que fosse realizada a isquemia/reperfusão, ou em animais controle. Pode-se observar que em comparação com o grupo controle, os animais após a exposição da isquemia e reperfusão apresentaram aumento da temperatura da pata traseira 2 e 3 horas após a DPIC, e que a temperatura retornou ao valor basal após 24 horas. Não houve diferença estatística observada entre camundongos machos e fêmeas (Figura 7A).

De forma semelhante, a indução de isquemia e reperfusão causou edema de pata traseira (Figura 7B) e do tornozelo (Figura 7C) nos tempos de 2 e 3 horas, e não houve alteração da espessura da pata traseira ou do tornozelo após 24 horas. Também não foi detectada diferença significativa entre os animais machos ou fêmeas.

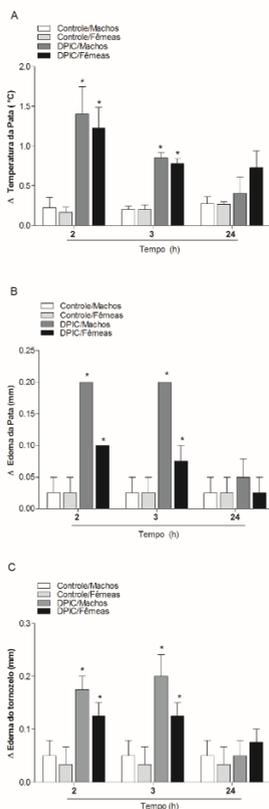


Figura 7. O modelo de dor pos-isquemia crônica (DPIC) causou aumento de temperatura e formação de edema em camundongos. Avaliação da (A) temperatura da pata traseira, (B) edema da pata traseira e (C) edema do tornozelo em diferentes tempos (2, 3 e 24 horas após a indução de DPIC ou em animais controle). A temperatura foi avaliada através de um termômetro digital, enquanto que o edema foi avaliado através de um paquímetro digital nos diferentes tempos. A temperatura representa a diferença entre a temperatura de pata após a indução de DPIC e o valor basal (representado como Δ). O edema de pata e do tornozelo representa a diferença entre a espessura de pata e do tornozelo após a indução de DPIC e o valor basal (representado como Δ). Os dados foram representados como média + S.E.M. (n = 4-6 animais). * $P < 0.05$, quando comparado ao grupo controle.

4.3 O MODELO DE DPIC CAUSOU ALODINIA MECÂNICA E AO FRIO EM CAMUNDONGOS MACHOS E FÊMEAS

Para observar o decurso temporal da nocicepção no modelo de DPIC em camundongos, foram realizadas medidas do limiar mecânico e também do limiar térmico ao frio nos dias 1, 5, 9, 12 e 17 após a indução de DPIC, avaliações semelhantes foram realizadas nos animais controle. Pode-se observar o aparecimento de alodinia mecânica nos dias 1, 5, 9, 12 e 17 após a indução de DPIC, quando comparado aos animais controle (Figura 8A). Além disso, houve a detecção de alodinia ao frio nos tempos de 1, 5, 9, 12 e 17 dias após a indução de isquemia e reperfusão em camundongos (Figura 8B). Não houve diferença significativa para os animais machos ou fêmeas. Assim, o estudo foi realizado em animais machos e fêmeas sendo que os grupos sempre foram separados de forma igual para ambos os sexos. Também, escolheu-se o dia 1 como aquele que foi observado os efeitos agudos da DPIC, e o dia 17 como aquele que foi observado os efeitos crônicos (neuropáticos) da DPIC. Não foram realizadas medidas após 17 dias para reduzir o tempo de exposição dos animais ao processo nociceptivo, porém pretendeu-se escolher um tempo avançado para que se pudesse observar uma grande discrepância temporal entre a fase aguda e crônica do processo nociceptivo.

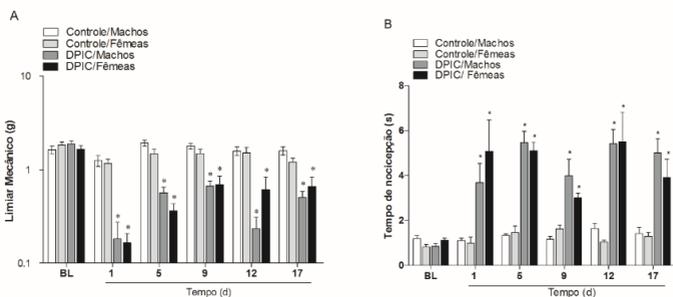


Figura 8. O modelo de dor pós-isquemia crônica (DPIC) induziu (A) alodinia mecânica e (B) alodinia ao frio em camundongos de forma aguda e crônica. O limiar mecânico foi avaliado utilizando filamentos de von Frey (expresso com limiar de 50% em g) de diferentes intensidades (0,07-4 g), e o tempo de nocicepção foi avaliado pela exposição da pata traseira do animal a gota de acetona (20 μ l). As medidas basais foram representadas como BL no gráfico, e

os tempos 1 a 17 dias representam as medidas realizadas após a indução do modelo DPIC ou no grupo controle. Os dados foram representados como média + S.E.M. (n = 8). * $P < 0.05$, quando comparado aos valores basais.

4.4 A ADMINISTRAÇÃO DE AMITRIPTILINA REDUZIU A ALODINIA MECÂNICA E AO FRIO EM CAMUNDONGOS APÓS A INDUÇÃO DE ISQUEMIA E REPERFUSÃO

A amitriptilina é um fármaco antidepressivo utilizado no tratamento de diferentes formas de dor crônica, e então é também usada no tratamento da neuropatia observada na SDRC (Navani et al., 2003; Jeanson et al., 2016). Assim este fármaco foi utilizado como controle positivo do estudo. Em relação a análise do decurso temporal do efeito antinociceptivo do tratamento com amitriptilina (20 mg/kg; i.g.) administrado no modelo animal de DPIC após 17 dias, este fármaco mostrou efeito anti-alodínico mecânico no tempo 1 hora após o tratamento com um valor de inibição máxima de $71 \pm 8\%$, em comparação com o grupo tratado com veículo (Figura 9A). Porém, o tratamento com amitriptilina (20 mg/kg; i.g.) não inibiu significativamente a alodinia ao frio nos animais que apresentavam esta nocicepção induzida pelo modelo de DPIC.

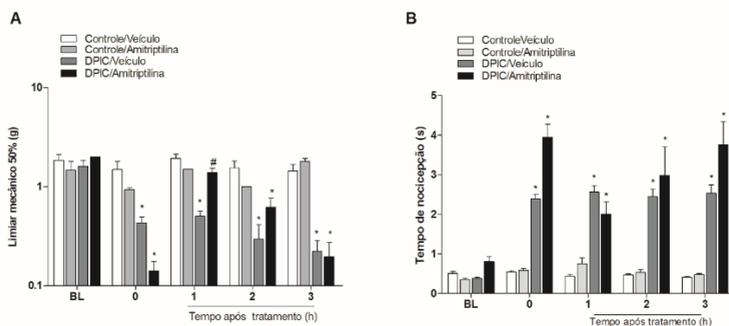


Figura 9. A amitriptilina apresentou efeito antinociceptivo no modelo de dor pós-isquemia crônica (DPIC) em camundongos. Avaliação do efeito (A) anti-alodínico para o estímulo mecânico ou (B) ao frio após a administração de amitriptilina (20 mg/kg), os comportamentos foram avaliados nos tempos de 1, 2 e 3 horas após a administração intragástrica (i.g.). O limiar mecânico foi avaliado utilizando filamentos de von Frey (expresso com limiar de 50% em g) de

diferentes intensidades (0,07-4 g), e o tempo de nocicepção foi avaliado pela exposição da pata traseira do animal a gota de acetona (20 µl). As medidas basais foram representadas como BL no gráfico, e o tempo 0 representa as medidas realizadas 17 dias após a indução do modelo DPIC em camundongos. Os dados foram representados como média + S.E.M. (n = 8). * $P < 0.05$, quando comparado aos valores basais; # $P < 0.05$, quando comparado ao grupo DPIC/veículo.

4.5 A ADMINISTRAÇÃO DE ANTAGONISTAS DO RECEPTOR TRPA1 APRESENTOU EFEITO ANTINOCICEPTIVO NA FASE CRÔNICA DA DPIC EM CAMUNDONGOS

O tratamento com o antagonista seletivo do receptor TRPA1, HC-030031 (300 mg/kg, i.g.), inibiu significativamente a alodinia mecânica induzida pelo modelo de DPIC quando comparado ao grupo que recebeu veículo (controle). A análise do decurso temporal do efeito antinociceptivo do tratamento com HC-030031 revela que este efeito perdurou por até 2 horas após a administração, e retornou aos valores basais com 3 horas após sua administração, sendo que a inibição máxima atingida após o tratamento com HC-030031 em 1 hora foi de $63 \pm 10\%$ (Figura 10A). A Figura 5B demonstra que o tratamento com HC-030031 inibiu significativamente a alodinia ao frio (em 1 e 2 horas após a administração) observada no modelo de DPIC. A inibição máxima atingida em 2 horas após o tratamento com o antagonista foi de $74 \pm 8\%$ (Figura 10B).

Também, o tratamento com A-967079 (60 mg/kg, i.g.), um antagonista seletivo do receptor TRPA1, reduziu de forma significativa a alodinia mecânica induzida pelo modelo de DPIC (Figura 10C) de 1 a 2 horas após o tratamento, com valor de inibição de $69 \pm 15\%$ (calculado em 2 horas após o tratamento). Além disso, o composto A-967079 reduziu de forma significativa a alodinia ao frio induzida por DPIC, de 1 a 2 horas após o tratamento (Figura 10D), e o valor de inibição atingido após 1 hora do tratamento com o antagonista foi de $88 \pm 5\%$. Também, pode-se observar que o tratamento de animais controle com os antagonistas do receptor TRPA1 não causou alteração da percepção dos estímulos mecânicos ou térmicos ao frio (Figura 10).

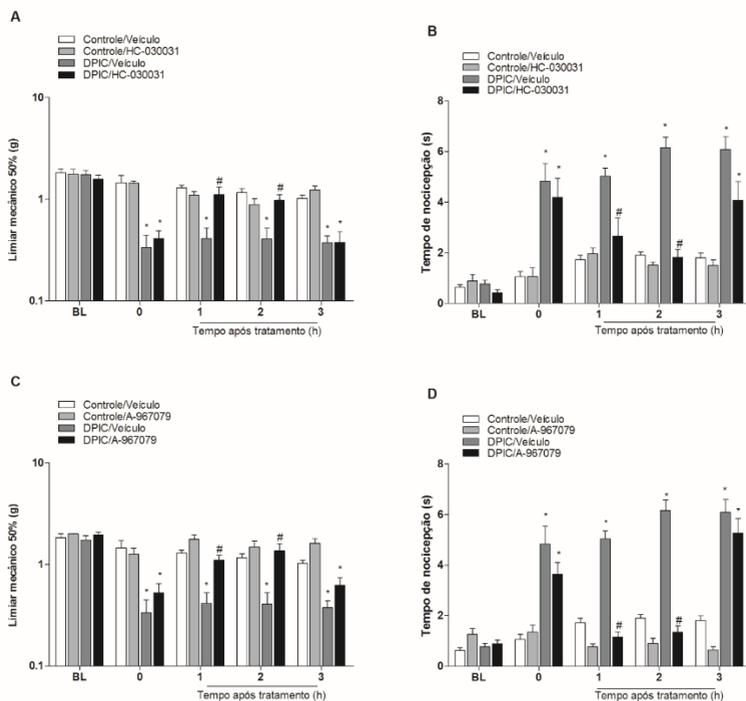


Figura 10. A administração de antagonistas do receptor TRPA1 (HC-030031 e A-967079) mostraram efeito antinociceptivo no modelo de dor pós-isquemia crônica (DPIC) em camundongos. Avaliação do efeito (A e C) anti-alodínico frente ao estímulo mecânico ou (B e D) estímulo térmico o frio com administração do antagonista (A e B) HC-030031 (300 mg/kg) e (C e D) A-967079 (60 mg/kg) avaliados nos tempos de 1, 2 e 3 horas após a administração intragástrica (i.g.). O limiar mecânico foi avaliado utilizando filamentos de von Frey (expresso com limiar de 50% em g) de diferentes intensidades (0,07-4 g), e o tempo de nocicepção foi avaliado pela exposição da pata traseira do animal a gota de acetona (20 μ l). As medidas basais foram representadas como BL no gráfico, e o tempo 0 representa as medidas realizadas 17 dias após a indução do modelo DPIC em camundongos. Os dados foram representados como média + S.E.M. (n = 8). * $P < 0.05$, quando comparado aos valores basais; # $P < 0.05$, quando comparado ao grupo DPIC/veículo (ANOVA de duas vias seguida do teste post hoc Bonferroni).

4.6 A ADMINISTRAÇÃO DO OLIGONUCLEOTÍDEO ANTI-SENTIDO PARA O RECEPTOR TRPA1 REDUZIU A ALODINIA MECÂNICA E AO FRIO EM CAMUNDONGOS APÓS A INDUÇÃO DE DPIC

Achados farmacológicos apresentados em conjunto até aqui demonstram claramente que os receptores TRPA1 expressos tanto a nível periférico quanto central desempenham um papel crucial na nocicepção (Fernandes et al., 2012). A fim de ampliar e confirmar os resultados farmacológicos fez-se uso de uma estratégia molecular para a supressão da expressão funcional do receptor TRPA1 através do tratamento i.t. repetido com um oligonucleotídeo anti-sentido (antisense) para o receptor TRPA1 por 3 dias consecutivos. As administrações i.t. do oligonucleotídeo foram realizadas nos dias 14, 15 e 16 após a indução de DPIC para que o papel do receptor TRPA1 fosse avaliado no dia 17, considerada a fase crônica da DPIC neste estudo. Pode-se observar que o tratamento com oligonucleotídeo anti-sentido para o receptor TRPA1 preveniu o desenvolvimento de alodinia mecânica e ao frio de forma significativa quando comparado aos animais que receberam o controle do oligonucleotídeo anti-sentido (NoSense) para o TRPA1 pela mesma via de administração. A porcentagem de inibição atingida foi de 100% para o desenvolvimento de alodinia mecânica (Figura 11A) e também de 100% para o desenvolvimento de alodinia ao frio (Figura 11B). Também, os animais controle que receberam a administração dos oligonucleotídeos não apresentaram alterações em relação a detecção do limiar mecânico ou do limiar térmico ao frio (Figura 11).

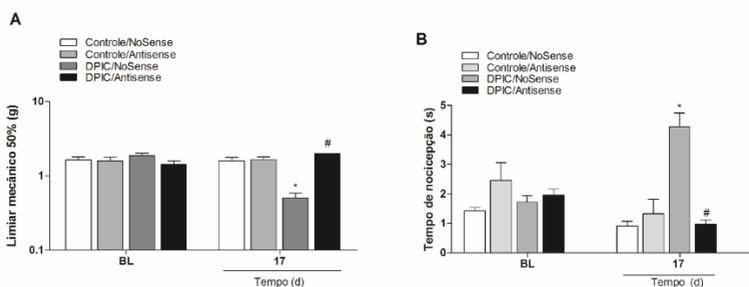


Figura 11. A administração do oligonucleotídeo anti-sentido para o receptor TRPA1 preveniu o desenvolvimento de (A) alodinia mecânica e (B) alodinia ao frio após a indução do modelo de dor pós-isquemia crônica (DPIC) em camundongos. A administração do oligonucleotídeo anti-sentido (Antisense, 30 $\mu\text{g}/\text{kg}/10\text{ mL}$) ou do oligonucleotídeo controle (NoSense, 30 $\mu\text{g}/\text{kg}/10\text{ mL}$) foi realizada por via intratecal (volume de 5 μL) por 3 dias (dias 14, 15 e 16 após a indução de DPIC). A avaliação do efeito (A) anti-alodímico frente ao estímulo mecânico ou (B) frente térmico ao frio. O limiar mecânico foi avaliado utilizando filamentos de von Frey (expresso com limiar de 50% em g) de diferentes intensidades (0,07-4 g), e o tempo de nocicepção foi avaliado pela exposição da pata traseira do animal a gota de acetona (20 μl). As medidas basais foram representadas como BL no gráfico, também foram realizadas medidas após 17 dias da indução de DPIC. Os dados foram representados como média + S.E.M. (n = 8). * $P < 0.05$, quando comparado aos valores basais; # $P < 0.05$, quando comparado ao grupo DPIC/NoSense.

4.7 A INDUÇÃO DE ISQUEMIA E REPERFUSÃO EM CAMUNDONGOS AUMENTOU A IMUNORREATIVIDADE AO RECEPTOR TRPA1 E CAUSOU HIPERALGESIA QUÍMICA

A indução de isquemia e reperfusão em camundongos causou aumento da imunorreatividade ao receptor TRPA1 no nervo ciático após 17 dias do processo isquêmico quando comparado aos animais controle (Figura 12A). Também para observar a hiperalgesia química a um agonista TRPA1 no modelo de DPIC na fase crônica, foi realizada a administração de uma dose não-nociceptiva de AITC (1 nmol/pata, 20 μL). A administração do AITC causou a indução de nocicepção apenas nos animais que foram submetidos a DPIC (Figura 12B).

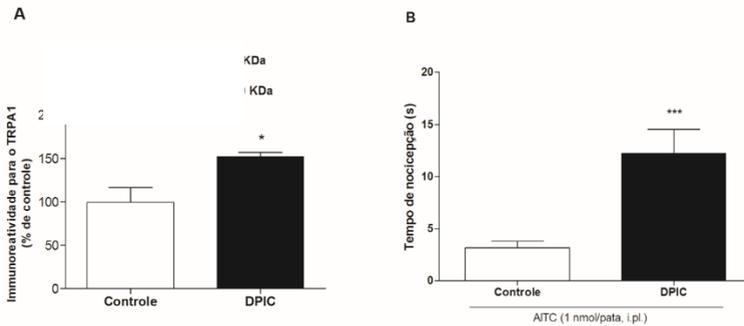


Figura 12. O modelo de dor pós-isquemia crônica (DPIC) em camundongos causou (A) aumento da imunorreatividade ao receptor TRPA1 e (B) hiperalgesia química para um agonista TRPA1. (A) Imunorreatividade para o receptor TRPA1 no nervo ciático após 17 dias da indução da isquemia/reperfusão ou grupo controle. Os dados foram representados como média + S.E.M (n=6), e o resultado foi expresso como % do controle. * $P < 0.05$, quando comparado ao grupo controle (B) a administração do agonista TRPA1 (AITC, isotiocianato de alila, via intraplantar, i.pl) foi realizada 17 dias após a indução de DPIC em camundongos. Este modelo consiste na injeção de 20 μ l de AITC (dose de 1 nmol/pata) de forma intraplantar (i.pl., subcutânea) sob a superfície da pata traseira direita. A nociceção foi avaliada por 5 minutos (tempo que o animal permaneceu lambendo a pata). Os dados foram representados como média \pm S.E.M. (n = 7 animais). *** $P < 0.001$, quando comparado ao grupo tratado controle.

4.8 A FASE CRÔNICA DE NOCICEÇÃO DA DPIC EM CAMUNDONGOS NÃO É ACOMPANHADA POR INFILTRAÇÃO CELULAR DE CÉLULAS INFLAMATÓRIAS

Quando avaliada a atividade das enzimas MPO e NAGase no tecido da pata traseira e no nervo ciático no 17º dia após a indução de isquemia e reperfusão em camundongos não foi observado alteração significativa destes parâmetros em relação ao grupo controle (Figura 13).

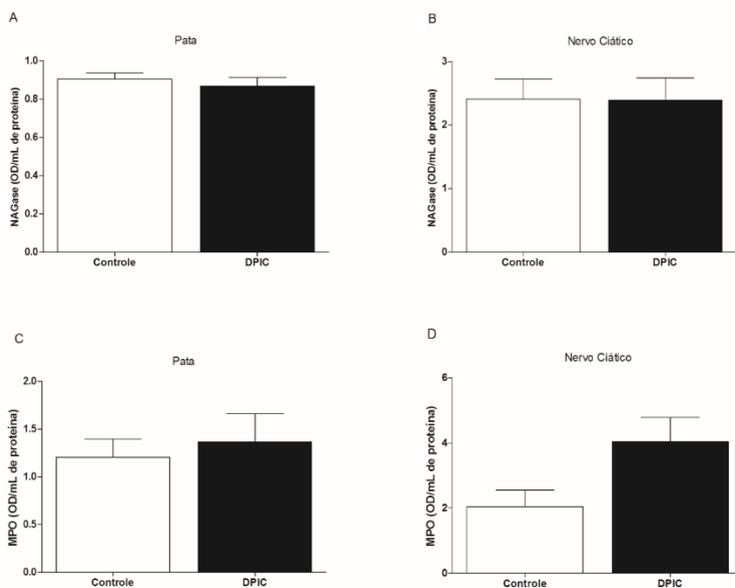


Figura 13. No modelo de dor pós-isquemia crônica (DPIC) em camundongos não há presença de inflamação de neutrófilos ou macrófagos. A análise foi realizada através da determinação da atividade das enzimas (A e B) N-acetil- β -D-glucosaminidase (NAGase) ou (C e D) mieloperoxidase (MPO) como marcadores de presença de macrófagos e neutrófilos na pele de pata ou nervo ciático de animais 17 dias após DPIC ou controle. Os dados foram representados como média + S.E.M. ($n = 6$). $P > 0.05$.

4.9 O MODELO DE DPIC EM CAMUNDONGOS CAUSOU INFILTRAÇÃO DE MACRÓFAGOS E O AUMENTO DA IMMUNOREATIVIDADE PARA O AGONISTA TRPA1 (4-HNE) NO NERVO CIÁTICO DE CAMUNDONGOS

A indução do modelo DPIC em camundongos causou aumento da imunoreatividade para o agonista TRPA1 (4-HNE) em amostras do nervo ciático de camundongos 17 dias após a DPIC quando comparado aos animais controle (Figura 14A e 14B). Também, induziu a infiltração de macrófagos (F4/80) quando este parâmetro foi avaliado no nervo ciático após 17 dias da indução de DPIC em relação ao grupo controle (Figura 14A e 14B).

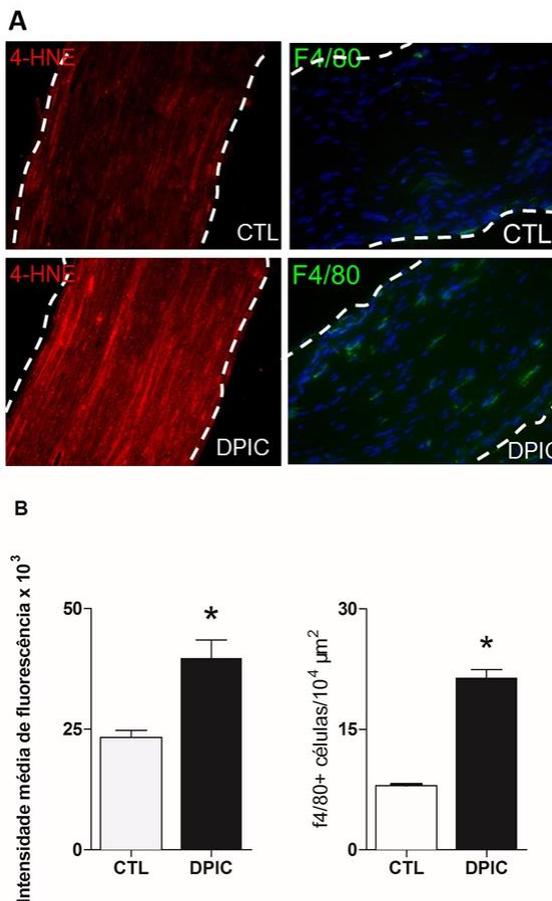


Figura 14. O modelo de dor pós-isquemia crônica (DPIC) em camundongos causou aumento da imunoreatividade para o agonista TRPA1 (4-HNE) e a infiltração de macrófagos no nervo ciático de camundongos. (A) Imagens representativas e (B) dados agrupados da imunoreatividade para o agonista TRPA1 4-hidroxi-nonenal (4-HNE) e de monócitos/macrófagos infiltrados no nervo ciático de camundongos controle ou 17 dias após a indução de dor crônica pós-isquemia (DPIC). As linhas tracejadas representam a borda do epineuro de um dos ramos lesionados do nervo ciático. Os dados foram representados como média + S.E.M. (n =6). * $P < 0.05$, quando comparado ao grupo controle (CTL).

4.10 A FASE CRÔNICA DO MODELO DE DPIC EM CAMUNDONGOS FOI ACOMPANHADA POR AUMENTO DA ATIVIDADE DE ENZIMAS SOD E NADPH OXIDASE E TAMBÉM DOS NÍVEIS DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

A indução do modelo DPIC em camundongos causou aumento das atividades das enzimas SOD (Figura 15 A e B) e NADPH oxidase (Figura 16 A e B), como também dos níveis do agonista TRPA1 (peróxido de hidrogênio) (Figura 17 A e B) quando estes parâmetros foram mensurados na pele da pata ou no nervo ciático após 17 dias após a indução de DPIC em relação ao grupo controle.

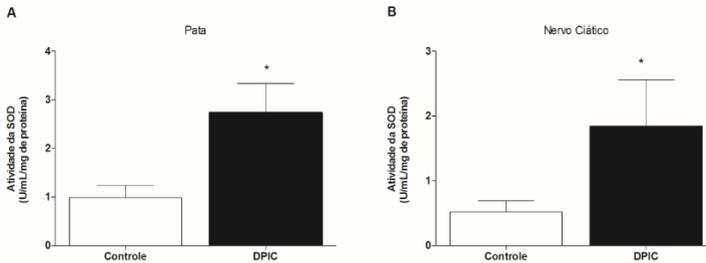


Figura 15. A indução de isquemia e reperfusão no modelo de dor pós-isquemia crônica (DPIC) aumentou a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em camundongos. Análise da atividade da SOD em amostras de (A) pata traseira ou (B) nervo ciático 17 dias após a DPIC ou em animais controle. Os dados foram representados como média + S.E.M. (n = 7). * $P < 0.05$, quando comparado ao grupo controle.

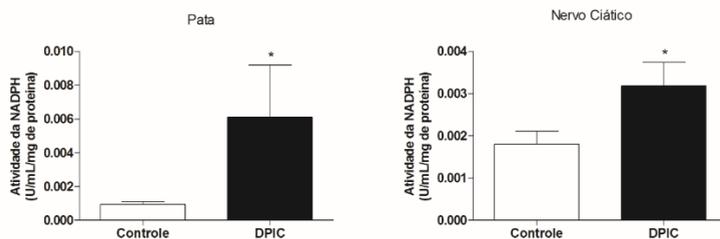


Figura 16. A indução de isquemia e reperfusão no modelo de dor pós-isquemia crônica (DPIC) aumentou a atividade da enzima NADPH oxidase em camundongos. Análise da atividade da NADPH oxidase em amostras de (A) pata traseira ou (B) nervo ciático 17 dias após a DPIC ou em animais controle. Os dados foram representados como média + S.E.M. ($n = 7$). * $P < 0.05$, quando comparado ao grupo controle.

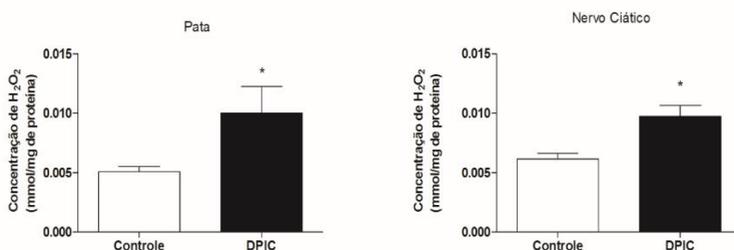


Figura 17. A indução de isquemia e reperfusão no modelo de dor pós-isquemia crônica (DPIC) causou aumento dos níveis de peróxido de hidrogênio em camundongos. Análise dos níveis de peróxido de hidrogênio em amostras de (A) pata traseira ou (B) nervo ciático 17 dias após a DPIC ou em animais controle. Os dados foram representados como média + S.E.M. ($n = 5$). * $P < 0.05$, quando comparado ao grupo controle.

4.11 A ADMINISTRAÇÃO DE UM COMPOSTO ANTIOXIDANTE REDUZIU A ALODINIA MECÂNICA E AO FRIO EM CAMUNDONGOS APÓS A INDUÇÃO DE ISQUEMIA E REPERFUSÃO

O tratamento com ácido α -lipóico (100 mg/kg, i.g.) no modelo animal de DPIC após 17 dias causou efeito antinociceptivo de 1 a 2 horas após o tratamento tanto para a alodinia mecânica como para a alodinia ao frio. Os valores de inibição calculados foram de $56 \pm 11\%$ e $87 \pm 5\%$, para a alodinia mecânica ou ao frio (calculados 1 hora após a administração), respectivamente (Figura 18 A e B).

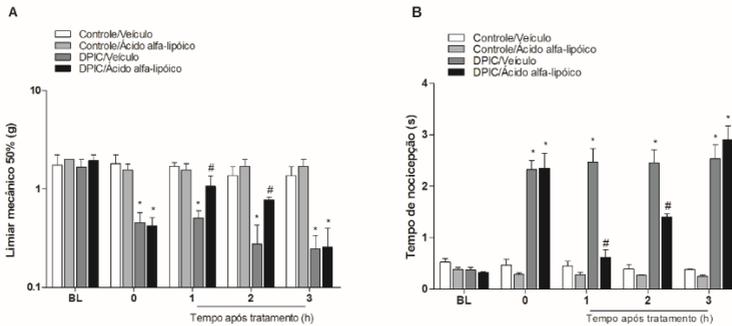


Figura 18. O ácido α -lipóico apresentou efeito antinociceptivo no modelo de dor pós-isquemia crônica em camundongos. Avaliação do efeito (A) anti-alodínico para o estímulo mecânico ou (B) ao frio após a administração de ácido α -lipóico (100 mg/kg) avaliados nos tempos de 1, 2 e 3 horas após a administração intragástrica (i.g.). O limiar mecânico foi avaliado utilizando filamentos de von Frey (expresso com limiar de 50% em g) de diferentes intensidades (0,07-4 g), e o tempo de nocicepção foi avaliado pela exposição da pata traseira do animal a gota de acetona (20 μ l). As medidas basais foram representadas como BL no gráfico, e o tempo 0 representa as medidas realizadas 17 dias após a indução do modelo DPIC em camundongos. Os dados foram representados como média + S.E.M. (n = 8). #*P* < 0.05, quando comparado aos valores basais; **P* < 0.05, quando comparado ao grupo DPIC/veículo.

4. 12 ANIMAIS COM DELEÇÃO GÊNICA PARA O RECEPTOR TRPA1 (TRPA1^{-/-}) NÃO APRESENTARAM O DESENVOLVIMENTO DE NOCICEPÇÃO NO MODELO DE DPIC

Em conjunto, os achados farmacológicos até aqui apresentados demonstram claramente que o receptor TRPA1 desempenham um papel importante na alodinia mecânica e ao frio no modelo de DPIC em camundongos. Portanto, para confirmar esses resultados farmacológicos fez-se uso de animais com deleção genética para o receptor TRPA1 (*Trpa1*^{-/-}) e de animais do tipo selvagem (*Trpa1*^{+/+}). Os animais *Trpa1*^{-/-} mostraram redução significativa da alodinia mecânica e ao frio após os procedimentos de DPIC, quando comparado aos animais *Trpa1*^{+/+} (controle). A porcentagem de inibição atingida nos animais *Trpa1*^{-/-} foi $98 \pm 9\%$ e $89 \pm 5\%$ após 1º e 17º dia, respectivamente, para o limiar mecânico (Figura 19A). Também, os animais *Trpa1*^{-/-} apresentaram reduzida alodinia ao frio nocivo após a indução de DPIC, e a porcentagem de inibição calculada foi de $79 \pm 8\%$ e $97 \pm 3\%$ após o 1º e 17º dia, respectivamente (Figura 19B).

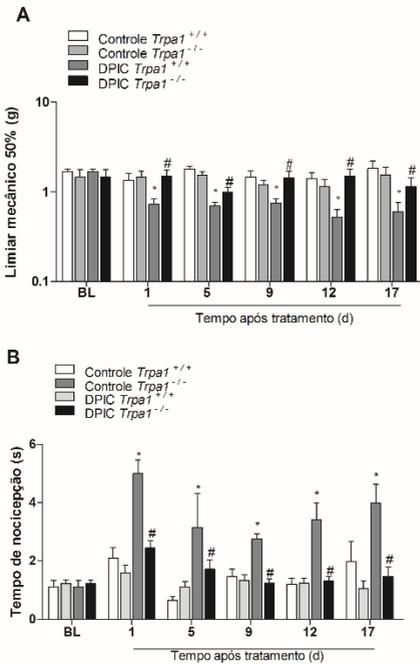


Figura 19. Animais com deleção gênica para o receptor TRPA1 (*Trpa1*^{-/-}) apresentaram reduzido desenvolvimento de nocicepção no modelo de dor pós-isquêmica crônica (DPIC) em camundongos. Avaliação do efeito (A) anti-alodínico frente ao estímulo mecânico ou (B) frente ao estímulo térmico a frio. O limiar mecânico foi avaliado utilizando filamentos de von Frey (expresso com limiar de 50% em g) de diferentes intensidades (0,07-4 g), e o tempo de nocicepção foi avaliado pela exposição da pata traseira do animal a gota de acetona (20 μ l). As medidas basais foram representadas como BL no gráfico, e os dias 1, 5, 9, 12 e 17 representam as medidas realizadas após a indução do modelo DPIC em camundongos. Os dados foram representados como média + S.E.M. (n = 6). **P* < 0.05, quando comparado aos valores basais; #*P* < 0.05, quando comparado ao grupo DPIC/*Trpa1*^{+/+}.

4.13 A ADMINISTRAÇÃO DO OLIGONUCLEOTÍDEO ANTISENTIDO PARA O RECEPTOR TRPA1 DE FORMA PREVENTIVA INIBIU O DESENVOLVIMENTO DE NOCICEPÇÃO NO MODELO DE DPIC EM CAMUNDONGOS

Para avaliar o papel do receptor TRPA1 no desenvolvimento do processo nociceptivo o oligonucleotídeo antisentido para o receptor TRPA1 foi administrado por via i.t por 3 dias consecutivos (dias -2, -1 e 0 antes do modelo da DPIC), como controle o NoSense foi administrado seguindo o mesmo protocolo experimental. O tratamento com o Antisense para o receptor TRPA1 bloqueou significativamente o desenvolvimento de alodinia após os procedimentos da DPIC, quando comparado aos animais que receberam o controle do oligonucleotídeo anti-sentido (NoSense) para TRPA1 pela mesma via de administração. As porcentagens de inibição atingidas pela supressão da expressão do receptor TRPA1 foram de $50 \pm 8\%$ e $71 \pm 9\%$ após o 1º e 17º dia após os procedimentos, respectivamente (Figura 20A) para o limiar mecânico. De forma semelhante aos resultados obtidos para a alodinia mecânica, o tratamento intratecal com Antisense para o receptor TRPA1 reduziu a alodinia ao frio nocivo, e a porcentagem de inibição atingida foi de $91 \pm 5\%$ e $100 \pm 5\%$ após o 1º e 17º dia após os procedimentos, respectivamente) (Figura 20B).

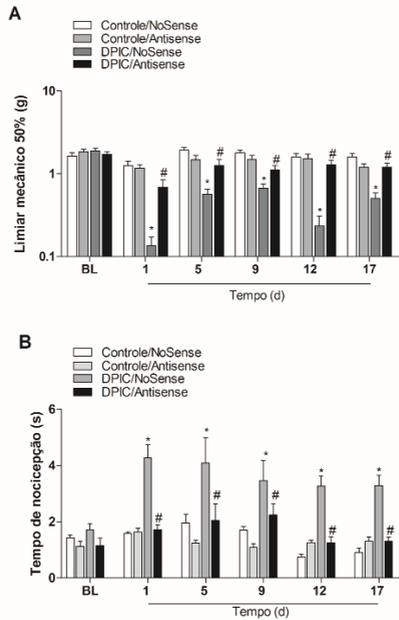


Figura 20. A administração do oligonucleotídeo antisentido para o receptor TRPA1 previniu o aparecimento da alodinia (A) mecânica ou (B) ao frio no modelo de dor pós-isquemia crônica (DPIC) em camundongos. O oligonucleotídeo antisentido para o receptor TRPA1 (Antisense) foi administrado por intratecal (volume de 5 μ L, 30 μ g/kg/10 mL), ou foi administrado o controle do oligonucleotídeo anti-sentido para o TRPA1 (NoSense, 30 μ g/kg/10 mL). Os animais receberam por 3 dias a administração (dias -2, -1 e 0), após 1 hora da administração foi realizada o procedimento de DPIC. O limiar mecânico foi avaliado utilizando filamentos de von Frey (expresso com limiar de 50% em g) de diferentes intensidades (0,07-4 g), e o tempo de nocicepção foi avaliado pela exposição da pata traseira do animal a gota de acetona (20 μ l). As medidas basais foram representadas como BL no gráfico, e os dias 1, 2, 5, 9, 12 e 17 representam as medidas realizadas após a indução do modelo DPIC em camundongos ou em animais controle. Os dados foram representados como média + S.E.M. (n = 8). # $P < 0.05$, quando comparado aos valores basais; * $P < 0.05$, quando comparado ao grupo DPIC/veículo.

4.14 A ADMINISTRAÇÃO DE UM ANTAGONISTA DO RECEPTOR TRPA1 OU DO ÁCIDO α -LIPÓICO APRESENTARAM EFEITO PREVENTIVO NA NOCICEPÇÃO OBSERVADA NO MODELO DE DPIC EM CAMUNDONGOS

A administração do antagonista do receptor TRPA1 (HC-030031, 300 mg/kg, i.p.) de forma repetida (três vezes ao dia por três dias) no modelo de DPIC reduziu de forma significativa o desenvolvimento de alodinia mecânica nos dias 1, 5, 9, 12 e 17 após a DPIC (inibição de 69 ± 15 e $80 \pm 18\%$ após 1 e 17 dias, respectivamente) (Figura 21A). O tratamento repetido com HC-030031 também diminuiu a alodinia ao frio observada nos camundongos após DPIC e depois do tratamento em todos os tempos testados (inibição de 95 ± 5 e $65 \pm 10\%$ após 1 e 17, respectivamente) (Figura 21B).

Também, a administração repetida do antioxidante ácido α -lipóico (100 mg/kg, i.g.), avaliado desde o 1º ao 17º dia após os procedimentos de DPIC mostrou efeito antinociceptivo, levando a redução da alodinia mecânica até o 5º dia (Figura 21C) após modelo de DPIC (79 ± 12 e $68 \pm 16\%$ inibição no 1º e 5º dia após os procedimentos, respectivamente). Também, o ácido α -lipóico preveniu o desenvolvimento de alodinia ao frio até 9 dias após a indução de DPIC (93 ± 6 e $69 \pm 8\%$ de inibição no 1º e 9º dia após os procedimentos, respectivamente) (Figura 21D).

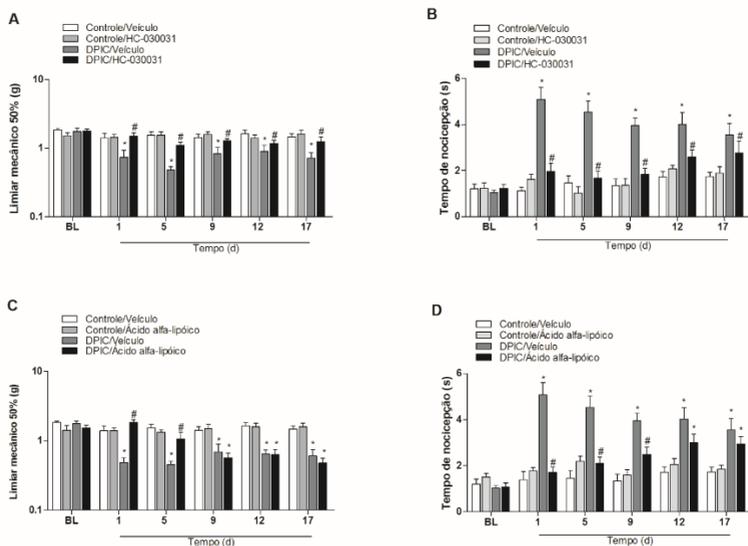


Figura 21. A administração do antagonista TRPA1 (HC-030031) ou do composto antioxidante (ácido α -lipóico) de forma repetida preveniu o desenvolvimento de nociceção no modelo de dor pós-isquemia crônica (DPIC) em camundongos. Avaliação do efeito (A e C) anti-alodínico frente ao estímulo mecânico ou (B e D) efeito anti-alodínico frente ao tempo de nociceção (s) com administração intragástrica (i.g.) do antagonista HC-030031 (300 mg/kg) e do ácido α -lipóico (100 mg/kg) com administração 3 vezes ao dia e por 3 dias consecutivos de administração após o modelo de DPIC, e foram avaliados limiares mecânicos e o tempo de nociceção (s) nos dias 1, 5, 9, 12 e 17 após DPIC. O limiar mecânico foi avaliado utilizando filamentos de von Frey (expresso com limiar de 50% em g) de diferentes intensidades (0,07-4 g), e o tempo de nociceção foi avaliado pela exposição da pata traseira do animal a gota de acetona (20 μ l). As medidas basais foram representadas como BL no gráfico, e os tempos de 1, 5, 9, 12 e 17 dias representam os dias que foram realizadas as medidas após a indução do modelo DPIC em camundongos. Os dados foram representados como média + S.E.M. (n = 8). * $P < 0.05$, quando comparado aos valores basais; # $P < 0.05$, quando comparado ao grupo isquemia.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo mostrou pela primeira vez resultados utilizando o modelo animal de DPIC em camundongos (C57BL/6), esta linhagem de camundongos foi utilizada para que o modelo de DPIC pudesse ser estudado em animais com deleção gênica para o receptor TRPA1 (*Trpa1*^{-/-}), pois estes apresentam o tipo selvagem (*Trpa1*^{+/+}) desenvolvido a partir da linhagem C57BL/6. O modelo utilizado previamente para avaliar o papel do receptor TRPA1 foi desenvolvido em ratos Wistar, o que impediu a extrapolação dos dados em camundongos com deleção gênica para o receptor TRPA1 (Klafke et al., 2016).

Para desenvolver um novo modelo de DPIC em camundongos diferentes parâmetros de isquemia, inflamação e nocicepção (limiar ao estímulo mecânico ou ao frio) foram avaliados na fase aguda e também na fase crônica após a indução de isquemia/reperfusão. Assim verificou-se que os animais expostos ao modelo de DPIC apresentaram alterações fisiológicas na fase aguda (inflamatória, 1 dia após a indução de DPIC), incluindo o aumento dos níveis de lactato (soro e nervo tibial); aumento da temperatura da pata traseira e edema (pata e tornozelo), alodinia mecânica e ao frio. Já na fase crônica (neuropática, 17 dias após a indução de DPIC) observou-se o aumento da hipersensibilidade aos estímulos mecânicos e ao frio, porém não foram detectadas características inflamatórias ou de isquemia tecidual. Foi relevante observar duas fases neste modelo para que se pudesse estudar a transição da fase aguda a àquela crônica, e então avaliar estratégias preventivas dessas fases. Dessa forma, o modelo desenvolvido exibe características que são semelhantes aquelas observadas em pacientes, com o aparecimento de uma fase aguda e uma crônica da dor (Birklein e Schlereth, 2015). Como a maioria dos pacientes com dor aguda, terá desenvolvimento da fase crônica (Klafke et al., 2016), é interessante estudar estratégias de prevenção destas formas de dor.

Quando avaliada a fase aguda no modelo de DPIC, foi observado hiperemia, edema, aumento dos níveis de lactato e hipersensibilidade mecânica e ao frio nos camundongos. Estes dados estão de acordo com aqueles descritos para ratos, onde após 1 dia da indução da DPIC foi também observado o aumento dos níveis de lactato no soro, e este resultado se mostrou aumentado apenas 1 dia após a indução de isquemia e reperfusão (Klafke et al., 2016). Provavelmente isso ocorra pelo fato

que o segmento corpóreo afetado pela isquemia, apresenta uma diminuição da oxigenação pela hemoglobina capilar (HbO_2), refletindo um aumento da glicólise anaeróbica e como produto final o lactato (Rogatzki et al., 2015). No entanto tais achados apresentados no modelo do presente projeto são consistentes com condições de isquemia/reperfusão.

Segundo outro estudo, o tecido muscular de membros amputados de pacientes com SDCR-I exibe fibras atroficas e camadas de membrana basal dos capilares espessas, consistente com a presença de estresse oxidativo e condições isquêmicas resultante da microangiopatia em tecido muscular (van der Laan et al., 1999; Perez et al., 2010). Assim, há aumento de densidade dos vasos perfundidos, maior filtração capilar (um índice de permeabilidade microvascular) e extravasamento do plasma no membro afetado nas fases iniciais da SDCR-I (Tan et al., 2005; Nishikawa et al., 2008). Embora estas alterações são acompanhadas por uma pressão venosa periférica elevada e manobras arteriovenosa no membro afetado dos pacientes (Schürmann et al., 2000), também é relatado que existe um alto fluxo arterial no membro do paciente com a SDCR-I, mas baixo consumo de oxigênio, bem como altos níveis de lactato no tecido isquêmico (Tan et al., 2005).

Também corroborando com a literatura estes resultados sugerem que há alterações locais da microvasculatura, com diminuição do fluxo sanguíneo causando danos permanentes ao tecido (Coderre et al., 2004; Klafke et al., 2016), mostrando sinais e sintomas presentes na SDCR. Através de imagens de ultrassom, foi possível realizar na pata dos camundongos (com DPIC) a avaliação do fluxo sanguíneo para confirmar o quadro de isquemia e reperfusão. Na avaliação os animais apresentaram-se fluxo sanguíneo normal sem o torniquete de borracha (animais controle), e logo após com a presença do torniquete na pata do animal (modelo de DPIC) houve queda no fluxo sanguíneo no primeiro momento avaliado. Para o fim da aplicação do torniquete pelo tempo de 2 horas, em alguns camundongos a pata traseira permaneceu com cianose durante todo o tempo de isquemia. Segundo estudo, uma pata traseira normal comparada com uma pata traseira com um torniquete de borracha, esta mostra evidência clara de hipoxia, tornando-se fria e cianótica (Coderre et al., 2004).

Apesar da extensa literatura sobre lesão após isquemia/reperfusão, o aspecto sensorial tem sido pouco estudado em fases distintas após a lesão, pois a maioria dos estudos exploram apenas os parâmetros nociceptivos em fases agudas após o modelo da SDCR-I (Klafke et al., 2016). Assim os estudos realizados até o momento indicam que a disfunção sensorial induzida por isquemia/reperfusão pode estar relacionada ao quadro de estresse oxidativo e inflamação (Heumann, 1987; Lin et al., 2000; Sasaki et al., 2014). Os pacientes que sofrem da SDCR-I muitas vezes experimentam disfunção sensorial distinta, como a alodinia mecânica e térmica, sendo muito desagradável e difícil de tratar, desenvolvendo uma dor crônica (Duarte et al., 2009). Portanto, de acordo com os sintomas observados em pacientes, o presente estudo mostra que os animais expostos ao modelo de DPIC exibiram alodinia mecânica e ao frio em 1 e 17 dias após a indução da isquemia/reperfusão. Devido ao fato do componente da dor neuropática após a reperfusão poder ser mantido por múltiplas alterações fisiopatológicas que ocorrem nos sistemas nervoso central e periférico, como sensibilização do nociceptor e neuroplasticidade mal adaptativa (Muthuraman et al., 2011), no entanto, outros mecanismos envolvidos na fase da dor neuropática ainda não foram totalmente explorados na literatura.

Assim nesse estudo, foi utilizado a amitriptilina (controle positivo para dor neuropática), pois em alguns estudos têm sido apontado que a terapia com o uso de antidepressivos podem reduzir a dor aguda e a resposta inflamatória da SDCR-I (Gierthmuhlen et al., 2014). E foi visto nos resultados do presente estudo que a hipersensibilidade mecânica foi revertida pelo antidepressivo amitriptilina, pois este composto apresentou efeito anti-alodínico. Em geral, a farmacoterapia recomendada para dor neuropática de difícil tratamento em pacientes, inclui o uso de alguns antidepressivos, tais como antidepressivos tricíclicos, como por exemplo a amitriptilina (Jeanson et al., 2016). O mecanismo de ação da amitriptilina pode ocorrer pelo bloqueio da recaptção da serotonina e da norepinefrina, aumentando a atividade dessas monoaminas nos terminais das vias de modulação da dor (Jeanson et al., 2016). No entanto, os fármacos antidepressivos não são analgésicos agudos e seus mecanismos não são totalmente claros na dor, e por isso os pacientes necessitam de um tratamento crônico com os mesmos para aliviar a dor neuropática, o que sugere o recrutamento de mecanismos secundários, bem como a

plasticidade neuronal molecular a longo prazo (Chaplan et al., 2010). Porém a amitriptilina possui ações anticolinérgicas, tais como boca seca, retenção urinária, delírio, entre outros efeitos colaterais que podem diminuir o uso pelos pacientes especialmente em síndromes dolorosas crônicas (Jeanson et al., 2016). Dessa forma, é claro que ainda não existe um tratamento padronizado para o controle da dor neuropática observada na SDCR-I, mostrando a necessidade de novos fármacos (Klafke et al., 2016).

A dor neuropática por ser causada por lesão neuronal no sistema nervoso central ou periférico (von Hehn et al., 2012), e a busca de novos mecanismos para o tratamento da mesma é relevante observando que os analgésicos comuns utilizados têm efeitos adversos ou eficácia reduzida (Finnerup et al., 2015). Assim tem sido extensivamente estudado em modelos animais de neuropatia o envolvimento de TRPA1 em mecanismos de dor neuropática (Venkatachalam e Montell 2007b; Raisinghani et al., 2011). Segundo dados da literatura, mostram que o TRPA1 é um canal catiônico que funciona como um sensor celular, detectando estímulos mecânicos, químicos e térmicos, sendo um componente dos tecidos neuronais, epiteliais, sanguíneos e músculo liso. No entanto, pelo fato do receptor TRPA1 ser permeável ao íon cálcio (Ca^{2+}), sendo esse íon citotóxico quando presente em excesso, como por exemplo após uma lesão (Venkatachalam e Montell 2007b; Raisinghani et al., 2011), com isso ocorre maior indução aos danos celulares (Sattler e Tymianski, 2000), podendo então esses danos levarem a condição dolorosa, como visto após a indução da isquemia/reperfusão no modelo de DPIC.

E em mamíferos, o TRPA1 é largamente expresso em neurônios sensoriais primários que medeiam processos somatossensoriais e a transmissão nociceptiva (Andrade et al. 2012). A ativação do receptor TRPA1 em diferentes locais aferentes tem sido relacionada à inflamação neurogênica, já que este canal é expresso em neurônios peptidérgicos e leva à liberação de CGRP e substância P (Geppetti et al., 2008b; Benemei et al., 2014b). Ainda, a ativação deste receptor em células não neuronais pode induzir a liberação de mediadores inflamatórios (Hatano et al., 2012; Nassini et al., 2012; Bautista et al., 2013b). Portanto, o TRPA1 vem sendo revelado no desenvolvimento na dor inflamatória e neuropática. Em vista disso, e levando em consideração o que já existe na literatura sobre a importância do receptor TRPA1 nesse modelo de DPIC (Klafke et al., 2016), foi analisado a possível participação deste receptor na alodinia

mecânica e ao frio através do uso de tratamentos para a dor neuropática que vem sendo utilizados nos pacientes com a SRCR-I.

Quando utilizados antagonistas seletivos para TRPA1 (HC-030031 e A-967079) nesse estudo, bloqueou a alodinia mecânica e ao frio induzida pela isquemia/reperfusão. Assim revelando o envolvimento do TRPA1 tem na nocicepção nesse modelo, pois quando os efeitos dos antagonistas desapareceram, a resposta nociceptiva retornou, sugerindo que a ativação do TRPA1 é crítica para a manutenção da sensibilização induzida pela isquemia/reperfusão. O efeito anti-alodínico do HC-030031 e A-967079 durou cerca de 2 horas, o qual é consistente com outros estudos prévios que demonstram que o TRPA1 atua na resposta nociceptiva neste período de tempo em diferentes modelos de neuropatia (Obata et al., 2005b; Petrus et al., 2007; Eid et al., 2008a; Trevisan et al., 2013a, 2016). Os resultados apresentados colaboram para elucidar os avanços acerca do envolvimento do receptor TRPA1 em modelos de dor induzida por isquemia/reperfusão, e que corroboram com outros estudos com efeito antinociceptivo em outros modelos de dor (Trevisan et al., 2013a, 2016; Preti et al., 2015).

O receptor TRPA1 é ainda multissensorial para estímulos nocivos, tais como substâncias oxidativas, mas principalmente tem papel na hipersensibilidade para temperaturas frias nocivas (menos de 17°C), assim o antagonismo do receptor pode reduzir a sensibilidade térmica ao frio (Story et al., 2003). Além disso, este canal é também expresso em diferentes tecidos não neuronais tais como células epiteliais, células endoteliais vasculares, células presentes no trato gastrointestinal e entres outros locais, mostrando que TRPA1 poderia ter funções distintas em neurônios e tecidos não neuronais (Sasaki et al., 2014). Portanto, o antagonismo de TRPA1 representa um promissor tratamento para a fase crônica da dor observada após a isquemia e reperfusão.

Além do bloqueio farmacológico do receptor TRPA1 através do uso de antagonistas seletivos, foi utilizado a supressão gênica do TRPA1 pelo tratamento com o oligonucleotídeo antisense para o TRPA1, que mostrou efeito antinociceptivo quando administrado na fase crônica da DPIC, validando o envolvimento do receptor pela redução da alodinia mecânica e ao frio nos camundongos. Esses dados corroboram com os dados da literatura que demonstraram significativa diminuição da nocicepção após tratamento intratecal com antisense do TRPA1, e ainda levando a uma redução na expressão da proteína TRPA1 nos neurônios

da medula espinhal e GRD, e nos terminais dos neurônios sensoriais, enfim resultando em diminuição de neurotransmissores e liberação de mediadores locais (Schwarz et al., 2017). Assim, a redução da expressão do TRPA1 após o tratamento com antisense poderia estar sendo suficiente para reduzir a nocicepção observada no modelo da DPIC.

E quando avaliado os níveis da proteína do receptor TRPA1 em amostra do nervo ciático de camundongos com 17 dias após a indução do modelo de DPIC, foi possível observar um aumento da expressão do receptor. Estes resultados estão de acordo com a literatura, pois outros modelos de nocicepção crônica relatam aumento da expressão do canal TRPA1, o que foi associado também ao desenvolvimento de hipersensibilidade ao frio causada por inflamação e danos aos nervos (Obata et al., 2005b; Yamamoto et al., 2015a). Os resultados também mostram que quando aplicado um agonista de TRPA1 (AITC) na pata do animal com isquemia levou a um maior tempo de nocicepção, podendo esse receptor estar relacionado aos sintomas da DPIC. Isso ocorre pelo fato do AITC ser 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) (Eid et al., 2008a). A hipersensibilidade química seletiva aos agonistas de TRPA1 como o AITC tem sido relatada em dor neuropática experimental (Trevisan et al., 2013a). Outro estudo mostra que respostas nociceptivas produzidas por AITC, foram intensas em modelos de dor neuropática e que não apresentaram nocicepção em modelo animais *Trpa1*^{-/-} (Trevisan et al., 2016), assim confirmando a importância do receptor na indução do estímulo doloroso.

No momento que se avaliou a atividade das enzimas MPO e NAGase, não foram alteradas na pele da pata e no nervo ciático no modelo (17 dias após a DPIC). Corroborando com os resultados da literatura, pois é na fase aguda da hipersensibilidade que há aumento na atividade dessas enzimas e não na fase crônica como observado (Klafke et al., 2016). Assim, essas enzimas devem ter uma função importante na indução, mas não na manutenção da hipersensibilidade após isquemia/reperfusão (Coderre et al., 2004; Klafke et al., 2016). Portanto, como não houve aumento de NAGase e MPO isso informa que não há a presença de dor inflamatória em 17 dias após a DPIC. No entanto, provavelmente por esse motivo o uso de fármacos antiinflamatórios não são eficazes neste modelo na fase

crônica, assim é necessário verificar se essas enzimas possam estar promovendo mudança nas defesas oxidantes, sendo avaliado através de outros métodos e outros marcadores após o modelo na fase crônica da DPIC.

No entanto, foi observado que após a isquemia/reperfusão, em amostras do nervo ciático de camundongos houve aumento notável na coloração por imunofluorescência de 4-HNE (agonista do TRPA1). Esse resultado suporta a hipótese de que subprodutos de estresse oxidativo como o 4-HNE são os mediadores que ativam o receptor TRPA1 levando à dor, assim corroborando com o estudo em modelo de dor neuropática trigeminal, que mostra que esses agonistas do TRPA1 podem levar ao aumento resposta nociceptiva quando injetados em ratos e camundongos (Trevisan et al., 2016). A produção excessiva de substâncias oxidantes como o peróxido de hidrogênio e o 4-HNE que são produzidos nos locais da lesão (Trevisani et al., 2007; Andersson et al., 2008; Klafke et al., 2016), induzem a liberação de neuropeptídios e assim a geração de potenciais de ação na periferia que podem ampliar a condução do estímulo nocivo gerando a dor (Andrade et al., 2012).

Ainda os resultados do presente estudo também apresentaram que após isquemia/reperfusão no nervo ciático dos camundongos houve infiltração de macrófagos quando estes parâmetros foram avaliados 17 dias após a DPIC. Os dados na literatura trazem o aumento da infiltração dos monócitos/macrófagos que se acumulavam no local de lesão nervosa e podem ter papel na indução da dor neuropática (Komori et al., 2011; Trevisan et al., 2016). Assim como estudo mostra que o receptor 1 (Romano et al., 2013), assim a presença de macrófagos no nervo ciático após a isquemia/reperfusão pode estar relacionado ao maior aumento do receptor TRPA1. No entanto, a presença dos monócitos/macrófagos e o aumento nos níveis de 4-HNE no tecido lesionado pode levar a nocicepção, que pode ocorrer por causa da infiltração celular, visto isso também em modelos de dor neuropática avaliados por modelos comportamentais semelhantes à dor provocada em pacientes (Trevisan et al., 2016).

Em relação a avaliação do estresse oxidativo após a indução do modelo de DPIC em camundongos, observou-se um aumento nos níveis da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e NADPH oxidase, como também do agonista TRPA1 (peróxido de hidrogênio) na

pele da pata e nervo ciático após 17 dias da indução da DPIC. Estudos sugerem que o acúmulo de ROS produzido por isquemia/reperfusão é um elemento-chave na dor pós-isquêmica, e que esse excesso de ROS pode levar à peroxidação de lípidos, a oxidação de proteínas, sobrecarga de cálcio, danos no DNA e a produção de citocinas inflamatórias (So et al., 2016). E além de causar efeitos citotóxicos os ROS podem ativar especificamente canais TRP redox sensíveis, incluindo o TRPA1 (Klafke et al., 2016), isso ocorre através da produção de ROS induzirem o estresse oxidativo levando a lesão celular devido ao envolvimento dos canais TRP permeáveis ao Ca^{2+} . Assim esses canais atuam como sensores reativos de ROS. Portanto uma inibição desses canais reativos representa um desafio futuro que pode conduzir a novas estratégias terapêuticas para o tratamento da dor neuropática apresentada nos pacientes com a SDCR (Yamamoto e Shimizu, 2016).

E ainda em relação ao peróxido de hidrogênio, tem sido demonstrado o seu papel no desenvolvimento de diferentes patologias dolorosas em modelos animais de dor inflamatória (Trevisan et al., 2013b; Moilanen et al., 2015a), ou em modelos de dor neuropática (Trevisan et al., 2016). No entanto, segundo estudo revela que a produção de peróxido de hidrogênio por células como macrófagos e neutrófilos poderia favorecer a sensibilização dos nociceptores via ativação do TRPA1 (Trevisan et al., 2014). A literatura mostra que a vasodilatação mediada por cinamaldeído (agonista TRPA1), foi totalmente reduzida após o tratamento com sequestradores de ROS (como a SOD e NADPH oxidase) (Aubdool et al., 2016). Muitos dos oxidantes produzidos durante a inflamação, como o 4-HNE (Trevisani et al., 2007) ou peróxido de hidrogênio (Andersson et al., 2008) atuam diretamente sobre o receptor de TRPA1, assim, muitas substâncias produzidas endogenamente durante a resposta inflamatória induzida pela isquemia/reperfusão podem levar a ativação do receptor de TRPA1.

Portanto foi realizado o tratamento nos camundongos com 17 dias da indução da DPIC, com o uso de um antioxidante (ácido α -lipóico), onde mostrou efeito analgésico levando a redução da alodinia mecânica e ao frio, perdurando esse efeito por algumas horas. Segundo um estudo recente, sugere-se que o ácido α -lipóico desempenha um papel muito mais amplo do que simplesmente ser um antioxidante (Nascimento et al., 2016), agindo nas reações de desidrogenase mitocondrial, demonstrando

proteção contra o estresse oxidativo em modelos de lesão após isquemia/reperfusão, diabetes, neurodegeneração e entre outras patologias (Mitsui et al., 1999). Também outro estudo com diabéticos, mostrou que uma dose diária de 600 mg de ácido α -lipóico oral para dor neuropática, levou a uma redução da dor com menos efeitos secundários (Mijnhout et al., 2012). Como observou-se no presente estudo a hipersensibilidade mecânica e a frio foram revertidas pelo antioxidante ácido α -lipóico mostrando efeito anti-alodínico, sugerindo que o estresse oxidativo possa estar envolvido na indução e manutenção da hipersensibilidade mecânica observada na DPIC (Klafke et al., 2016). As alterações inflamatórias e privação de oxigênio causadas por isquemia/reperfusão induzem a geração de ROS, que podem reagir com diferentes biomoléculas, como proteínas e lipídios. Isto leva a alterações ou perda de função, e produção de metabolitos tóxicos, caracterizando o estado de estresse oxidativo (Gierthmuhlen et al. 2014). No entanto, essa produção de tais metabolitos tem sido caracterizada após a isquemia e porém podem causar danos neuronais, sustentando a resposta inflamatória e levando ao quadro de dor/nocicepção (Gierthmuhlen et al., 2014).

Ainda para confirmar esses resultados farmacológicos fez-se uso de animais com deleção genética para o receptor TRPA1 (*Trpa1*^{-/-}) e com C57BL/6 do tipo selvagem (*Trpa1*^{+/+}), onde verificou-se que nesses animais *Trpa1*^{-/-} após a indução da isquemia/reperfusão, responderam a um limiar menor na alodinia mecânica e ao frio em relação aos animais *Trpa1*^{+/+}. Sendo assim, esses achados podem sugerir o importante envolvimento do receptor no modelo da SDCR/DPIC. Isso corrobora com estudo realizado com modelo de dor neuropática periférica induzida por quimioterápicos, onde a nocicepção apresentada pelo modelo foi completamente abolida em camundongos geneticamente deficientes de TRPA1, destacando o papel essencial do receptor na dor neuropática (Trevisan et al., 2013b).

Em relação a avaliação do efeito protetor da administração i.t de oligonucleotídeo anti-sentido para o receptor TRPA1, realizado em três dias antes da indução do modelo de DPIC, pode-se observar o bloqueio significativo na alodinia mecânica e ao frio quando avaliado até 17 dias após a indução da isquemia/reperfusão. Assim, confirmando o envolvimento do canal TRPA1 na nocicepção apresentada no modelo de dor crônica em camundongos. Também, observou-se que o uso do

antagonista HC-030031, dessa vez tratado por três dias e também tratado no dia da indução do modelo da DPIC em camundongos, mostrou uma redução do 1º ao 17º dia a alodinia mecânica e ao frio observada após o tratamento, levando a uma prevenção da nocicepção aguda e crônica. Ainda, para o mesmo protocolo de tratamento, foi utilizado um antioxidante (ácido α -lipóico) que mostrou da mesma forma o efeito analgésico, mas levando a redução da alodinia mecânica somente até o 5º dia, e ao frio somente até o 9º dia após isquemia/reperfusão em camundongos, sendo que não se obteve uma prevenção por completo da nocicepção crônica com o uso desse antioxidante como obteve-se com o uso do antagonista do TRPA1. Mas o uso do ácido α -lipóico vem sendo estudado por ser um co-fator essencial no metabolismo mitocondrial com atividade antioxidante, demonstrando uma atividade periférica e central atuando sobre os mecanismos de neuroinflamação, podendo reduzir a dor (Costantino et al., 2015).

Em estudo com modelo neuropático periférico induzido por quimioterápicos, mostra que a presença de estresse oxidativo leva a ativação do canal TRPA1, e a hipersensibilidade pode ser revertida transitoriamente por tratamento com curto prazo com o antagonista de TRPA1 (HC-030031) e ácido α -lipóico, sendo os animais tratados antes da indução do modelo de neuropatia. Além disso, o estudo atual sugere estratégias de prevenção para dor neuropática em pacientes através do uso de tratamentos precoces, de curto prazo, com antagonistas do TRPA1. Desta maneira, destacando o papel essencial na ativação/sensibilização precoce do receptor TRPA1 por subprodutos do estresse oxidativo na neuropatia (Trevisan et al. 2013b).

Quando observado que o ácido α -lipóico reverteu a nocicepção, avaliado pela alodinia mecânica e ao frio até alguns dias após a isquemia/reperfusão, indica que subprodutos do estresse oxidativo gerados por uma lesão nervosa possa promover comportamentos semelhantes à dor (Nassini et al., 2014). Isto pode ocorrer pelo fato de moléculas reativas ativarem o receptor TRPA1, e por esta razão, o mesmo é considerado um sensor de estresse oxidativo, pois esses subprodutos do estresse oxidativo medeiam os comportamentos semelhantes à dor através do receptor TRPA1 (Trevisan et al., 2016). Desde modo, pode-se confirmar que tanto o bloqueio do TRPA1 avaliado com o uso do seu antagonista e como a inibição do estresse oxidativo com o uso do ácido

α -lipóico administrados de forma preventiva da dor neuropática, podem levar a uma diminuição dos comportamentos nociceptivos crônicos.

A fisiopatologia da SDCR-I pode estar relacionada à inflamação neuronal periférica, inflamação sistêmica local, disfunção do sistema nervoso simpático e anormalidade do sistema nervoso central (Kim et al., 2017). Existem vários mecanismos moleculares e celulares que operam dentro dos sistemas nervoso periférico e central para produzir as diferentes formas de dor, e o entendimento desses mecanismos é fundamental para o desenvolvimento de tratamentos que visam especificamente as causas subjacentes e não apenas os sintomas (Scholz e Woolf, 2002). Os resultados do presente estudo fornecem evidências que o estresse oxidativo possa estar relacionado no quadro doloroso após a indução do modelo da DPIC, no entanto, esse achado é mais uma ferramenta importante para explorar o envolvimento do receptor TRPA1 em situações fisiopatológicas crônicas da SDCR-I.

Contudo baseado nesses resultados, pode-se observar que o processo inflamatório na SDCR1/DPIC parece estar mais envolvido durante a fase aguda (inflamatória). No entanto, foram avaliados os diferentes mecanismos no desenvolvimento da dor neuropática, visto que a nocicepção analisada em camundongos com a DPIC poderia ser promovida pela ativação de TRPA1, através de agonistas reativos, e, no entanto, este canal pode ser melhor explorado em novas pesquisas como um alvo alternativo para o tratamento da dor nessa condição. Além disso, é necessário analisar mais detalhadamente esse modelo da SDCR-I, pois ainda é um desafio poder compreender a fisiopatologia da dor neuropática apresentada. Portanto mais estudos são necessários para a elaboração de fármacos que visem alvos específicos para a dor e que possam interagir com o receptor TRPA1, proporcionando assim respostas mais eficazes no tratamento dessa síndrome.

E neste modelo animal apresentou a validade de face, no qual mostrou a capacidade do modelo de produzir nocicepção avaliado pelos testes de alodinia mecânica e ao frio, assim como observado em pacientes com a SDCR. Além disso pode-se avaliar a validade preditiva, no qual vai se referir a sensibilidade do modelo em testar fármacos para o controle da dor, como foi avaliado pelo antidepressivo amitriptilina. E também se avaliou a validade de constructo, no qual foi relacionada a mimetização da fisiopatologia da SDCR no modelo animal de DPIC,

mostrando que as alterações bioquímicas apresentadas estão correlacionadas com os sintomas presentes em pacientes (Kapczinski et al., 2011).

6 CONCLUSÕES

Conclui-se com os resultados obtidos no presente trabalho que:

1. O modelo de DPIC em camundongos causou nas fases aguda ou crônica alodinia mecânica e ao frio, porém os níveis de lactato estavam aumentados apenas na fase aguda e também ocorreu a indução de edema e aumento da temperatura do tecido isquêmico apenas na fase aguda, assim o modelo padronizado em camundongos mostrou sinais e sintomas semelhantes àqueles observados em pacientes com SDCR-I.
2. O uso do antidepressivo (amitriptilina) no modelo de DPIC em camundongos durante a fase crônica mostrou efeito antinociceptivo para a hipersensibilidade mecânica, dessa forma verificou-se que um fármaco usado no controle da dor crônica na SDCR-I apresentou efeito antinociceptivo no modelo de DPIC em estudo;
3. Os antagonistas do receptor TRPA1 (HC-030031 e A-967079) administrados durante a fase crônica da nocicepção no modelo de dor induzida por isquemia/reperfusão em camundongos, foram capazes de reduzir a hipersensibilidade mecânica e térmica ao frio, demonstrando dessa maneira o envolvimento deste canal iônico nesta forma de nocicepção;
4. Na avaliação do desenvolvimento da nocicepção no modelo de DPIC após a administração i.t de oligonucleotídeo anti-sentido para o receptor TRPA1 durante a fase crônica, este apresentou bloqueio significativo na alodinia mecânica e ao frio nocivo, confirmando que esse receptor tenha envolvimento na hipersensibilidade demonstrada no modelo de DPIC;
5. A imunoreatividade do receptor TRPA1 em nervo ciático na fase crônica da indução da isquemia/reperfusão em camundongos foi aumentada, dessa maneira o uso de antagonista TRPA1 estaria possivelmente reduzindo a possibilidade de hipersensibilidade mediada pelo aumento da expressão do receptor TRPA1;
6. A administração i.p do agonista TRPA1 (AITC) causou hiperalgesia química na fase crônica do modelo de dor induzida por isquemia/reperfusão em camundongos, dessa maneira confirmando que esse receptor possa estar relacionado nos sintomas de dor no modelo de DPIC/SDCR-I;
7. As atividades das enzimas MPO e NAGase na pata e nervo ciático no modelo de DPIC em camundongos, não se encontraram alteradas na

fase crônica, esses dados estão de acordo com a literatura pois é apenas na fase aguda da nocicepção que ocorre aumento na atividade dessas enzimas, pois a fase crônica não deve envolver componente inflamatório generalizado;

8. Na imunofluorescência do nervo ciático houve aumento da migração de macrófagos e também da imunoreatividade para o 4-HNE (agonista TRPA1), assim confirmando o envolvimento destas células no local da lesão e do estresse oxidativo podendo esses estarem envolvidos com o receptor TRPA1 e causarem os eventos nociceptivos observados no modelo de DPIC;
9. Na fase crônica da DPIC houve aumento do conteúdo do agonista endógeno do receptor TRPA1 (peróxido de hidrogênio), e também a atividade de enzimas oxidantes (NADPH oxidase e da SOD), indicando que a formação do agonista TRPA1 endógeno poderia estar contribuindo para o efeito nociceptivo apresentado após o modelo de DPIC;
10. A hipersensibilidade mecânica e ao frio foi revertida pelo uso do composto antioxidante (ácido α -lipóico) em um modelo de dor induzida por meio de isquemia/reperfusão em camundongos durante a fase crônica mostrando potencial antinociceptivo, isso sugere que o estresse oxidativo possa estar envolvido na indução e na manutenção da hipersensibilidade mecânica observada na DPIC;
11. Na avaliação do desenvolvimento da nocicepção em camundongos com deleção genética para o receptor TRPA1 (*Trpa1^{-/-}*) houve bloqueio do desenvolvimento da alodinia mecânica e ao frio nocivo no modelo da DPIC, sugerindo o envolvimento do receptor TRPA1 nos sintomas apresentados no modelo de DPIC;
12. A administração i.t de oligonucleotídeo anti-sentido para o receptor TRPA1 administrado no modelo de DPIC de modo preventivo, teve efeito protetor no desenvolvimento da nocicepção, pois bloqueou significativamente a alodinia mecânica e ao frio nocivo, confirmando ainda que esse receptor tem papel importante na indução da hipersensibilidade apresentada no modelo;
13. O antagonista do receptor TRPA1 (HC-030031) e o composto antioxidante (ácido α -lipóico) no modelo de dor induzida por meio de isquemia/reperfusão em camundongos, mostraram potencial preventivo, levando a uma diminuição dos comportamentos nociceptivos agudos e crônicos, dessa maneira o estresse oxidativo e o receptor TRPA1 têm grande importância no desenvolvimento da dor aguda e crônica nesse modelo de DPIC.

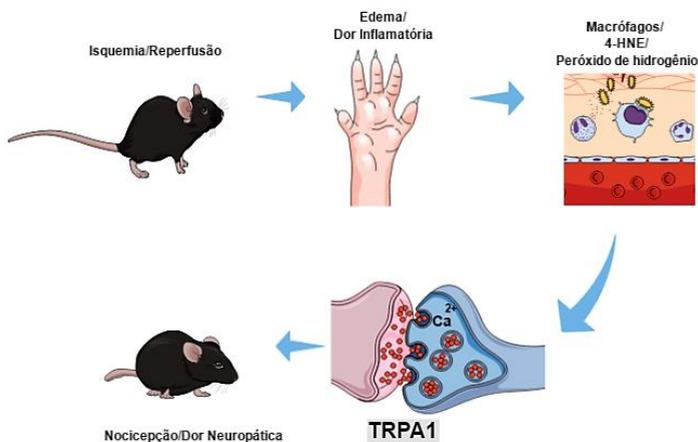


Figura 22. Na dor inflamatória a lesão tecidual após isquemia/reperusão induz a infiltração de célula inflamatórias (macrófagos) que levam a produção e liberação de mediadores agonistas TRPA1 (4-HNE ou peróxido de hidrogênio), estes por sua vez são capazes de ativar e/ou sensibilizar os aferentes sensoriais (nociceptores) através do receptor TRPA1, causando assim sensibilização do local afetado levando a dor neuropática. Fonte: do autor.

Portanto, a partir dos resultados obtidos neste estudo pode-se perceber que o receptor TRPA1 está plenamente envolvido nos mecanismos da dor neuropática no modelo de DPIC, dessa forma pode ser ainda explorado na investigação de analgésicos com a finalidade de tratamento da dor neuropática apresentada na SDCR-I (Figura 22).

REFERÊNCIAS

- Ahmad F, Kumar KH. Failure to fire after an electrical injury - a complex syndrome in a soldier. *Mil Med Res.* 2015;2:8.
- 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 5;28(10):2485–94.
- Andrade EL, Meotti FC, Calixto JB. TRPA1 antagonists as potential analgesic drugs. *Pharmacol Ther.* 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 α,β -unsaturated aldehydes and the TRPA1 receptor in rodents. *J Clin Invest.* 2008a 1;118(7):2574–82.
- Aschner M. Immune and inflammatory responses in the CNS: modulation by astrocytes. *Toxicol Lett.* 1998 28;102–103:283–7.
- Aubdool AA, Kodji X, Abdul-Kader N, Heads R, Fernandes ES, Bevan S. TRPA1 activation leads to neurogenic vasodilatation: involvement of reactive oxygen nitrogen species in addition to CGRP and NO. *Br J Pharmacol.* 2016;173(15):2419–33.
- 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, Yoo S, Yang TJ, Cho H, Kim YG, Hwang SW. Resolvin D1 attenuates activation of sensory transient receptor potential channels leading to multiple anti-nociception. *Br J Pharmacol.* 2010;161(3):707–20.
- Bannister J V, Calabrese L. Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem Anal.* 1987;32:279–312.
- 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. *J Med Chem.* 2010. 22;53(14):5085–107.
- Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell.* 2009. 16;139(2):267–84.
- Bautista DM, Jordt S-E, Nikai T, Tsuruda PR, Read AJ, Poblete J, et al. TRPA1 Mediates the Inflammatory Actions of Environmental Irritants and Proalgesic Agents. *Cell.* 2006;124(6):1269–82.
- Bautista DM, Pellegrino M, Tsunozaki M. TRPA1: A gatekeeper for inflammation. *Annu Rev Physiol.* 2013a;75:181–200.
- Bautista DM, Pellegrino M, Tsunozaki M. TRPA1: A gatekeeper for

- inflammation. *Annu Rev Physiol.* 2013b;75:181–200.
- Benemei S, Fusi C, Trevisan G, Geppetti P. The TRPA1 channel in migraine mechanism and treatment. *Br J Pharmacol.* 2014 May;171(10):2552–67.
- Bessac BF, Jordt S-E. Breathtaking TRP channels: TRPA1 and TRPV1 in airway chemosensation and reflex control. *Physiology (Bethesda).* 2008; 23:360–70.
- Birklein F, Schlereth T. Complex regional pain syndrome — significant progress in understanding. 2015;156:94–103.
- Birklein F, Schmelz M. Neuropeptides, neurogenic inflammation and complex regional pain syndrome (CRPS). *Neurosci Lett.* 2008. 6;437(3):199–202.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248–54.
- Brennan F, Carr DB, Cousins M. Pain Management: A Fundamental Human Right. *Anesth Analg.* 2007; 105(1):205–21.
- Bruhl S. An Update on the Pathophysiology of Complex Regional Pain Syndrome. *Anesthesiology.* 2010;1:206–23.
- Calixto J, Kassuya C, Andre E, Ferreira J. Contribution of natural products to the discovery of the transient receptor potential (TRP) channels family and their functions. *Pharmacol Ther.* 2005;106(2):179–208.
- Cao D-S, Zhong L, Hsieh T, Abooj M, Bishnoi M, Hughes L, et al. Expression of Transient Receptor Potential Ankyrin 1 (TRPA1) and Its Role in Insulin Release from Rat Pancreatic Beta Cells. Obukhov AG, editor. *PLoS One.* 2012;7(5):e38005.
- Chaplan SR, Eckert III WA, Carruthers NI. Drug Discovery and Development for Pain. *Translational Pain Research: From Mouse to Man.* CRC Press/Taylor & Francis; 2010.
- Clapham DE, Runnels LW, Strübing C. The TRP ion channel family. *Nat Rev Neurosci.* 2001;2(6):387–96.
- Coderre TJ, Bennett GJ. Objectifying CRPS-I. *Pain.* 2008;138(1):3–4.
- Coderre TJ, Xanthos DN, Francis L, Bennett GJ. Chronic post-ischemia pain (CPIP): a novel animal model of complex regional pain syndrome-type I (CRPS-I; reflex sympathetic dystrophy) produced by prolonged hindpaw ischemia and reperfusion in the rat. *Pain.* 2004;112(1–2):94–105.
- Colloca L, Ludman T, Bouhassira D, Baron R, Dickenson AH, Yarnitsky D, et al. Neuropathic pain. *Nat Rev Dis Prim.* 2017. 16;3:17002.

- Costantino D, Guaraldi C, Costantino M, Bounous VE. [Use of alpha-lipoic acid and omega-3 in postpartum pain treatment]. *Minerva Ginecol.* 2015 Oct;67(5):465–73.
- Cousins MJ, Lynch ME. The Declaration Montreal: Access to pain management is a fundamental human right. *Pain.* 2011;152(12):2673–4.
- Dixon WJ. Efficient analysis of experimental observations. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1980;20:441–62.
- Duarte MMMF, Rocha JBT, Moresco RN, Duarte T, Da Cruz IBM, Loro VL, et al. Association between ischemia-modified albumin, lipids and inflammation biomarkers in patients with hypercholesterolemia. *Clin Biochem.* 2009;42(7–8):666–71.
- Durward A. The blood supply of nerves. *Postgrad Med J.* 1948;24(267):11.
- 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(1):48.
- Feliu MH, Edwards CL. Psychologic Factors in the Development of Complex Regional Pain Syndrome: History, Myth, and Evidence. *Clin J Pain.* 2010 Mar;26(3):258–63.
- Fernandes ES, Fernandes MA, Keeble JE. The functions of TRPA1 and TRPV1: moving away from sensory nerves. *Br J Pharmacol.* 2012 May;166(2):510–21.
- Ferrari R, Ceconi C, Curello S, Cargnoni A, Pasini E, De Giuli F, et al. Role of oxygen free radicals in ischemic and reperfused myocardium. *Am J Clin Nutr.* 1991 Jan;53(1 Suppl):215S–222S.
- Finnerup NB, Jensen TS, Lund K, Haroutounian S, Dworkin RH, Finnerup NB, et al. Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: a systematic review and meta-analysis. www.thelancet.com/neurology *Artic Lancet Neurol.* 2015;14:162–73.
- Frantseva M V, Carlen PL, Perez Velazquez JL. Dynamics of intracellular calcium and free radical production during ischemia in pyramidal neurons. *Free Radic Biol Med.* 2001 Nov 15;31(10):1216–27.
- Freyenhagen R, Bennett MI. Diagnosis and management of neuropathic pain. *BMJ.* 2009 Aug 12;339:b3002.
- Geppetti P, Nassini R, Materazzi S, Benemei S. The concept of neurogenic inflammation. *BJU Int.* 2008a Mar;101(s3):2–6.
- Gierthmuhlen J, Binder A, Baron R. Mechanism-based treatment in

- complex regional pain syndromes. *Nat Rev Neurol*. 2014;10(9):518–28.
- Hatano N, Itoh Y, Suzuki H, Muraki Y, Hayashi H, Onozaki K, et al. Hypoxia-inducible Factor-1 (HIF1) 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 Sep 14;287(38):31962–72.
- von Hehn CA, Baron R, Woolf CJ. Deconstructing the neuropathic pain phenotype to reveal neural mechanisms. *Neuron*. 2012 Feb 23;73(4):638–52.
- Heumann R. Regulation of the synthesis of nerve growth factor. *J Exp Biol*. 1987 Sep ;132:133–50.
- Hinman A, Chuang H -h., Bautista DM, Julius D. TRP channel activation by reversible covalent modification. *Proc Natl Acad Sci*. 2006 Dec 19 ;103(51):19564–8.
- Huygen FJPM, de Bruijn AGJ, de Bruin MT, Groeneweg JG, Klein J, Zijlstra FJ. Evidence for local inflammation in complex regional pain syndrome type 1. *Mediators Inflamm*. 2002 Feb;11(1):47–51.
- Hylden JL, Wilcox GL. Intrathecal morphine in mice: a new technique. *Eur J Pharmacol*. 1980 Oct 17;67(2–3):313–6.
- Jeanson T, Duchêne A, Richard D, Bourgoin S, Picoli C, Ezan P, et al. Potentiation of Amitriptyline Anti-Hyperalgesic-Like Action By Astroglial Connexin 43 Inhibition in Neuropathic Rats. *Sci Rep*. 2016 Dec 12;6:38766.
- 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 Jan 15;427(6971):260–5.
- Julius D. TRP Channels and Pain. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2013 Oct 6;29(1):355–84.
- Katsura H, Obata K, Mizushima T, Yamanaka H, Kobayashi K, Dai Y, et al. Antisense knock down of TRPA1, but not TRPM8, alleviates cold hyperalgesia after spinal nerve ligation in rats. *Exp Neurol*. 2006;200(1):112–23.
- 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):135–42.
- Kilkenny C, Browne W, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG, National

- Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research. Animal research: reporting in vivo experiments--the ARRIVE guidelines. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2011 Apr;31(4):991–3.
- Kim JH, Kim YC, Nahm FS, Lee PB. The Therapeutic Effect of Vitamin C in an Animal Model of Complex Regional Pain Syndrome Produced by Prolonged Hindpaw Ischemia-Reperfusion in Rats. *Int J Med Sci.* 2017;14(1):97–101.
- King NB, Fraser V. Untreated pain, narcotics regulation, and global health ideologies. *PLoS Med.* 2013 Jan;10(4):e1001411.
- Klafke JZ, da Silva M a., Trevisan G, Rossato MF, da Silva CR, Guerra GP, et al. Involvement of the glutamatergic system in the nociception induced intrathecally for a TRPA1 agonist in rats. *Neuroscience.* 2012;222:136–46.
- Klafke JZ, da Silva MA, Rossato MF, de Prá SDT, Rigo FK, Walker CIB, et al. Acute and chronic nociceptive phases observed in a rat hind paw ischemia/reperfusion model depend on different mechanisms. *Pflügers Arch - Eur J Physiol.* 2016 Feb 21;468(2):229–41.
- Komori T, Morikawa Y, Inada T, Hisaoka T, Senba E. Site-specific subtypes of macrophages recruited after peripheral nerve injury. *Neuroreport.* 2011 Dec 7;22(17):911–7.
- 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 Jun 10;66(5):671–80.
- Kwan KY, Glazer JM, Corey DP, Rice FL, Stucky CL. TRPA1 modulates mechanotransduction in cutaneous sensory neurons. *J Neurosci.* 2009 Apr 15;29(15):4808–19.
- van der Laan L, van Spaendonck K, Horstink MW, Goris RJ. The Symptom Checklist-90 Revised questionnaire: no psychological profiles in complex regional pain syndrome-dystonia. *J Pain Symptom Manage.* 1999 May;17(5):357–62.
- Lee Y, Hong S, Cui M, Sharma PK, Lee J, Choi S. Transient receptor potential vanilloid type 1 antagonists: a patent review (2011 - 2014). *Expert Opin Ther Pat.* 2015 Mar;25(3):291–318.
- Levine JD, Alessandri-Haber N. TRP channels: Targets for the relief of pain. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis.* 2007 Aug;1772(8):989–1003.
- Lin Y, Mather LE, Power I, Cousins MJ. The effect of diclofenac on the expression of spinal cord c-fos-like immunoreactivity after ischemia-reperfusion-induced acute hyperalgesia in the rat tail.

- Anesth Analg. 2000 May;90(5):1141–5.
- Lloret S, Moreno JJ. Effects of an anti-inflammatory peptide (antiflammin 2) on cell influx, eicosanoid biosynthesis and oedema formation by arachidonic acid and tetradecanoyl phorbol dermal application. *Biochem Pharmacol.* 1995;50(3):347–53.
- Loeser JD, Treede R-D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. *Pain.* 2008 Jul 31;137(3):473–7.
- Lohman D, Schleifer R, Amon JJ. Access to pain treatment as a human right. *BMC Med.* 2010 Dec 20;8(1):8.
- McDonald MK, Tian Y, Qureshi RA, Gormley M, Ertel A, Gao R, et al. Functional significance of macrophage-derived exosomes in inflammation and pain. *Pain.* 2014 Aug;155(8):1527–39.
- Macpherson LJ, Geierstanger BH, Viswanath V, Bandell M, Eid SR, Hwang S, et al. The Pungency of Garlic: Activation of TRPA1 and TRPV1 in Response to Allicin. *Curr Biol.* 2005 May 24;15(10):929–34.
- Maihöfner C, Seifert F, Markovic K. Complex regional pain syndromes: new pathophysiological concepts and therapies. *Eur J Neurol.* 2010 May;17(5):649–60.
- Materazzi S, Fusi C, Benemei S, Pedretti P, Patacchini R, Nilius B, et al. TRPA1 and TRPV4 mediate paclitaxel-induced peripheral neuropathy in mice via a glutathione-sensitive mechanism. *Pflügers Arch - Eur J Physiol.* 2012 Apr 19;463(4):561–9.
- 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 .14;104(33):13525–30.
- Mijnhout GS, Kollen BJ, Alkhalaf A, Kleefstra N, Bilo HJG. Alpha lipoic Acid for symptomatic peripheral neuropathy in patients with diabetes: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Int J Endocrinol.* 2012;2012:456279.
- Minke B. The history of the Drosophila TRP channel: the birth of a new channel superfamily. *J Neurogenet.* 2010;24(4):216–33.
- Mitsui Y, Schmelzer JD, Zollman PJ, Mitsui M, Tritschler HJ, Low PA. Alpha-lipoic acid provides neuroprotection from ischemia-reperfusion injury of peripheral nerve. *J Neurol Sci.* 1999; 1;163(1):11–6.
- Moilanen LJ, Hämäläinen M, Lehtimäki L, Nieminen RM, Moilanen E, Richette P, et al. 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. McKemy DD, editor. PLoS One. 2015 Feb 6;10(2):e0117770.
- Montell C. The TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE*. 2005. 22; 2005(272).
- Montell C. The history of TRP channels, a commentary and reflection. *Pflugers Arch*. 2011 May;461(5):499–506.
- Montell C, Rubin GM. Molecular characterization of the *Drosophila* *trp* locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron*. 1989;2(4):1313–23.
- Moparthy L, Kichko TI, Eberhardt M, Högestätt ED, Kjellbom P, Johanson U, et al. Human TRPA1 is a heat sensor displaying intrinsic U-shaped thermosensitivity. *Sci Rep*. 2016;6:28763.
- Moran MM, McAlexander MA, Bíró T, Szallasi A. Transient receptor potential channels as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov*. 2011 Aug;10(8):601–20.
- Muthuraman A, Singla SK, Peters A. Exploring the Potential of Flunarizine for Cisplatin-Induced Painful Uremic Neuropathy in Rats. *Int Neurourol J*. 2011 Sep 30;15(3):127–34. Available from: <http://einj.org/journal/view.php?doi=10.5213/inj.2011.15.3.127>
- Nagamatsu M, Schmelzer JD, Zollman PJ, Smithson IL, Nickander KK, Low PA. Ischemic reperfusion causes lipid peroxidation and fiber degeneration. *Muscle Nerve*. 1996 Jan [cited 2015 Sep 30];19(1):37–47.
- 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 Apr 20;25(16):4052–61.
- Nascimento OJM, Pessoa BL, Orsini M, Ribeiro P, Davidovich E, Pupe C, et al. Neuropathic Pain Treatment: Still a Challenge. *Neurol Int*. 2016 Jun 15;8(2):6322.
- Nassini R, Gees M, Harrison S, De Siena G, Materazzi S, Moretto N, et al. Oxaliplatin elicits mechanical and cold allodynia in rodents via TRPA1 receptor stimulation. *PAIN®*. 2011;152(7):1621–31.
- Nassini R, Materazzi S, Benemei S, Geppetti P. The TRPA1 Channel in Inflammatory and Neuropathic Pain and Migraine. In Springer International Publishing; 2014. p. 1–43.
- Nassini R, Pedretti P, Moretto N, Fusi C, Carnini C, Facchinetti F, et al. Transient receptor potential ankyrin 1 channel localized to non-neuronal airway cells promotes non-neurogenic inflammation. *PLoS One*. 2012;7(8):e42454.
- Navani A, Rusy LM, Jacobson RD, Weisman SJ. Treatment of tremors in complex regional pain syndrome. *J Pain Symptom Manage*. 2003

- Apr;25(4):386–90.
- Navratilova E, Xie JY, King T, Porreca F. Evaluation of reward from pain relief. *Ann N Y Acad Sci.* 2013 Apr;1282:1–11.
- Nilius B, Prenen J, Owsianik G. Irritating channels: the case of TRPA1. *J Physiol.* 2011 Apr 1;589(Pt 7):1543–9.
- Nishikawa M, Tanioka M, Araki E, Matsumura Y, Kore-eda S, Nakamura Y, et al. Extensive skin necrosis of the arm in a patient with complex regional pain syndrome. *Clin Exp Dermatol.* 2008 Nov;33(6):733–5.
- Nukada H, McMorran PD. Perivascular demyelination and intramyelinic oedema in reperfusion nerve injury. *J Anat.* 1994 Oct;185(Pt 2):259–66.
- O’Connell NE, Wand BM, Gibson W, Carr DB, Birklein F, Stanton TR. Local anaesthetic sympathetic blockade for complex regional pain syndrome. In: Stanton TR, editor. *Cochrane Database of Systematic Reviews.* Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2016. p. CD004598.
- O’Connor G, Hutchinson M. Tolosa-Hunt syndrome responsive to infliximab therapy. *J Neurol.* 2009 Apr 27;256(4):660–1.
- 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.* 2005a Aug 25;115(9):2393–401.
- Ossipov MH, Dussor GO, Porreca F. Central modulation of pain. *J Clin Invest.* 2010 Nov;120(11):3779–87.
- Perez RS, Zollinger PE, Dijkstra PU, Thomassen-Hilgersom IL, Zuurmond WW, Rosenbrand KC, et al. Evidence based guidelines for complex regional pain syndrome type 1. *BMC Neurol.* 2010 Dec 31;10(1):20.
- Perez RSGM, Zuurmond WWA, Bezemer PD, Kuik DJ, van Loenen AC, de Lange JJ, et al. The treatment of complex regional pain syndrome type I with free radical scavengers: a randomized controlled study. *Pain.* 2003 Apr;102(3):297–307.
- Petrus M, Peier AM, Bandell M, Hwang SW, Huynh T, Olney N, et al. A role of TRPA1 in mechanical hyperalgesia is revealed by pharmacological inhibition. *Mol Pain.* 2007;3:40.
- Preti D, Saponaro G, Szallasi A. Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) antagonists. *Pharm Pat Anal.* 2015 Mar;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 Sep;301(3):C587-600.
- Rho RH, Brewer RP, Lamer TJ, Wilson PR. Complex Regional Pain Syndrome. *Mayo Clin Proc*. 2002 Feb;77(2):174–80.
- Richardson JD, Vasko MR. Cellular mechanisms of neurogenic inflammation. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002 Sep 1;302(3):839–45.
- Rogatzki MJ, Ferguson BS, Goodwin ML, Gladden LB. Lactate is always the end product of glycolysis. *Front Neurosci*. 2015;9:22.
- Romano B, Borrelli F, Fasolino I, Capasso R, Piscitelli F, Cascio M, et al. The cannabinoid TRPA1 agonist cannabichromene inhibits nitric oxide production in macrophages and ameliorates murine colitis. *Br J Pharmacol*. 2013 May;169(1):213–29.
- Rosa F, Trevisan G, Rigo FK, Tonello R, Andrade EL, do Nascimento Cordeiro M, et al. $\text{Ph}\alpha 1\beta$, a Peptide from the Venom of the Spider *Phoneutria Nigriventer* Shows Antinociceptive Effects after Continuous Infusion in a Neuropathic Pain Model in Rats. *Anesth Analg*. 2014 Jul;119(1):196–202.
- Rossato MF, Trevisan G, Walker CIB, Klafke JZ, de Oliveira AP, Villarinho JG, et al. Eriodictyol: a flavonoid antagonist of the TRPV1 receptor with antioxidant activity. *Biochem Pharmacol*. 2011 Feb 15;81(4):544–51.
- Sasaki A, Mizoguchi S, Kagaya K, Shiro M, Sakai A, Andoh T, et al. A mouse model of peripheral posts ischemic dysesthesia: involvement of reperfusion-induced oxidative stress and TRPA1 channel. *J Pharmacol Exp Ther*. 2014 Dec;351(3):568–75.
- Sattler R, Tymianski M. Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity. *J Mol Med (Berl)*. 2000;78(1):3–13.
- Sawada Y, Hosokawa H, Matsumura K, Kobayashi S. Activation of transient receptor potential ankyrin 1 by hydrogen peroxide. *Eur J Neurosci*. 2008 Mar;27(5):1131–42.
- Schaller B, Graf R. Cerebral Ischemia and Reperfusion: The Pathophysiologic Concept as a Basis for Clinical Therapy. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2004 Apr;24(12):351–71.
- Schmelzer JD, Zochodne DW, Low PA. Ischemic and reperfusion injury of rat peripheral nerve. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Mar;86(5):1639–42.
- Scholz J, Woolf CJ. Can we conquer pain? *Nat Neurosci*. 2002 Nov;5 Suppl(Suppl):1062–7.
- Schürmann M, Gradl G, Zaspel J, Kayser M, Löhr P, Andress H-J. Peripheral sympathetic function as a predictor of complex regional

- pain syndrome type I (CRPS I) in patients with radial fracture. *Auton Neurosci*. 2000 Dec 28;86(1–2):127–34.
- Schwarz MG, Namer B, Reeh PW, Fischer MJM. TRPA1 and TRPV1 Antagonists Do Not Inhibit Human Acidosis-Induced Pain. *J Pain*. 2017 Jan;
- Sebastin SJ. Complex regional pain syndrome. *Indian J Plast Surg*. 2011 May; 44(2):298–307.
- Sedgwick SG, Smerdon SJ. The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework. *Trends Biochem Sci*. 1999 Aug;24(8):311–6.
- So K, Tei Y, Zhao M, Miyake T, Hiyama H, Shirakawa H, et al. Hypoxia-induced sensitisation of TRPA1 in painful dysesthesia evoked by transient hindlimb ischemia/reperfusion in mice. *Sci Rep*. 2016a;6:23261.
- So K, Tei Y, Zhao M, Miyake T, Hiyama H, Shirakawa H, et al. Hypoxia-induced sensitisation of TRPA1 in painful dysesthesia evoked by transient hindlimb ischemia/reperfusion in mice. *Sci Rep*. 2016b Mar 17;6:23261.
- Stanton-Hicks M, Baron R, Boas R, Gordh T, Harden N, Hendler N, et al. Complex Regional Pain Syndromes: guidelines for therapy. *Clin J Pain*. 1998 Jun;14(2):155–66.
- 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.
- Suzuki K, Ota H, Sasagawa S, Sakatani T, Fujikura T. Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. *Anal Biochem*. 1983;132(2):345–52.
- Tan ECTH, Oyen WJG, Goris RJA. Leukocytes in Complex Regional Pain Syndrome type I. *Inflammation*. 2005 Dec 29;29(4–6):182–6.
- Taylor DL, Obrenovitch TP, Symon L. Changes in extracellular acid-base homeostasis in cerebral ischemia. *Neurochem Res*. 1996 Sep;21(9):1013–21.
- 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 May;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. 2013a Nov;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 Jul;72:200–9.
- Trevisan G, Materazzi S, Fusi C, Altomare A, Aldini G, Lodovici M, et al. Novel Therapeutic Strategy to Prevent Chemotherapy-Induced Persistent Sensory Neuropathy By TRPA1 Blockade. *Cancer Res*. 2013b May 15;73(10):3120–31.
- Trevisan G, Rossato MF, Walker CIB, Klafke JZ, Rosa F, Oliveira SM, et al. Identification of the plant steroid α -spinasterol as a novel transient receptor potential vanilloid 1 antagonist with antinociceptive properties. *J Pharmacol Exp Ther*. 2012 Nov;343(2):258–69.
- 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 Aug 14;104(33):13519–24.
- Venkatachalam K, Montell C. TRP Channels. *Annu Rev Biochem*. 2007 Jun 7;76(1):387–417.
- Vriens J, Appendino G, Nilius B. Pharmacology of Vanilloid Transient Receptor Potential Cation Channels. *Mol Pharmacol*. 2009 Jun 1;75(6):1262–79.
- Wesseldijk F, Huygen FJPM, Heijmans-Antonissen C, Niehof SP, Zijlstra FJ. Six years follow-up of the levels of TNF-alpha and IL-6 in patients with complex regional pain syndrome type 1. *Mediators Inflamm*. 2008 Jan;2008:469439.
- Woolf CJ. What is this thing called pain? *J Clin Invest*. 2010 Nov 1;120(11):3742–4.
- Xanthos DN, Bennett GJ, Coderre TJ. Norepinephrine-induced nociception and vasoconstrictor hypersensitivity in rats with chronic post-ischemia pain. *Pain*. 2008;137(3):640–51.
- 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 Aug 28;11:s12990-015–0072.
- Yamamoto S, Shimizu S. Significance of TRP channels in oxidative stress. *Eur J Pharmacol*. 2016; 15;793:109–11.

- Zhu MX. Multiple roles of calmodulin and other Ca²⁺-binding proteins in the functional regulation of TRP channels. *Pflügers Arch - Eur J Physiol.* 2005 Oct 28;451(1):105–15.
- Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain.* 1983;16(2):109–10.
- Zollinger PE, Tuinebreijer WE, Kreis RW, Breederveld RS. Effect of vitamin C on frequency of reflex sympathetic dystrophy in wrist fractures: a randomised trial. *Lancet.* 1999; 11;354(9195):2025–8.

ANEXO 1 – Carta de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais



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

Resolução

A Comissão de Ética no Uso de Animais, normatizada pela Resolução n. 02/2011/Câmara Propex e pela Lei Federal 11.794/08, analisou o projeto abaixo.

Protocolo: 009/2015-1

Professora responsável: Gabriela Trevisan dos Santos

Equipe: Juliano Ferreira, Flávia Karine Rigo, Samira Dal-Toé De Prá, Paula Ronsani Ferro, Lara Back

Título: Avaliação da inflamação e estresse oxidativo na fase aguda e crônica da nocicepção induzida por meio de isquemia/reperfusão ativando o canal TRPA1 em camundongos.

Este projeto foi **Aprovado** em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada à CEUA. Foi autorizada a utilização do total de 308 Camundongos C57Bl/6 sendo 154 fêmeas e 154 machos, de 60 dias e pesando aproximadamente 30g. Os membros da CEUA não participaram do processo de avaliação dos projetos em que constam como pesquisadores. Para demais dúvidas, contatar a CEUA pelo e-mail ceua@unesc.net.

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: 009/2015-1

Principal Investigator: Gabriela Trevisan dos Santos

Researchers: Juliano Ferreira, Flávia Karine Rigo, Samira Dal-Toé De Prá, Paula Ronsani Ferro, Lara Back

Project title: Evaluation of inflammation and oxidative stress in acute and chronic phase of nociception induced by ischemia / reperfusion by activating the TRPA1 channel in mice.

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 or by e-mail: ceua@unesc.net.

Criciúma, 10 de março de 2015.

JAIRO JOSÉ ZOCHE
Coordenador da CEUA

ANEXO 2 – Adendo da carta de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais



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: 005/2015-2 CEUA – Adendo

Professora: Gabriela Trevisan

Título: “ Avaliação da inflamação e estresse oxidativo na fase aguda e crônica da nocicepção induzida por meio de isquemia/reperfusão ativando o canal TRPA1 em camundongos”.

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

Para demais dúvidas contatar a CEUA.

www.unesc.net/ceua

Criciúma, 20 de outubro de 2015.

JAIRO JOSÉ ZOCHE

Coordenador do CEUA