

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

Sabrina Qader Kudsi

**A APLICAÇÃO TÓPICA DE UM ANTAGONISTA TRPA1 REDUZ A
NOCICEPÇÃO E A INFLAMAÇÃO EM UM MODELO DE LESÃO
MUSCULAR TRAUMÁTICA EM RATOS**

Santa Maria, RS
2023

Sabrina Qader Kudsi

**A APLICAÇÃO TÓPICA DE UM ANTAGONISTA TRPA1 REDUZ A NOCICEPÇÃO
E A INFLAMAÇÃO EM UM MODELO DE LESÃO MUSCULAR TRAUMÁTICA EM
RATOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia – **Ênfase em Neuropsicofarmacologia e imunofarmacologia.**

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

Santa Maria, RS
2023

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Kudsi, Sabrina

A APLICAÇÃO TÓPICA DE UM ANTAGONISTA TRPA1 REDUZ A NOCICEPÇÃO E A INFLAMAÇÃO EM UM MODELO DE LESÃO MUSCULAR TRAUMÁTICA EM RATOS / Sabrina Kudsi.- 2023.

125 p.; 30 cm

Orientador: Gabriela Trevisan dos Santos
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós Graduação em Farmacologia, RS, 2023

1. Dor musculoesquelética 2. HC-030031 3. Canais TRP
4. Mialgia 5. Inflamação I. Trevisan dos Santos, Gabriela
II. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, SABRINA KUDSI, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Sabrina Qader Kudsi

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia – Ênfase em **Neuropsicofarmacologia e imunofarmacologia**.

Aprovado em 15 de fevereiro de 2023.

Gabriela Trevisan dos Santos, Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Patrícia Severo Nascimento, Dra. (UFSM)

Maria Fernanda de Paula Werner, Dra. (UFPR)

Santa Maria, RS
2023

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação de mestrado a minha família, especialmente aos meus pais, Wafa e Taissir (in memorian), as minhas irmãs, Yasmin, Islam e Mirian (in memorian), ao meu irmão, Yusef, e aos meus avós Karimah, Jasser e Fahimah (in memorian) pela dedicação e amor incondicionais. Também dedico este trabalho ao povo palestino!

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer em primeiro lugar a Allah (Deus) por iluminar e guiar o meu caminho durante o mestrado. À minha família pelo apoio incondicional, especialmente a minha mãe Wafa, uma pessoa guerreira, trabalhadora que sempre me apoiou, me ajudou e faz o impossível pela minha felicidade. Muito obrigada, pelas suas orações, carinho e amor, mãe! Te amo. Ao meu irmão Yusf, obrigada pelo apoio incondicional e aos seus conselhos e sempre está preocupado comigo. Te amo!

Gostaria de agradecer ao meu pai Taissir (*in memorian*), por mais que você não esteja mais entre nós, sei que onde quer que você esteja, está me protegendo e torcendo por mim. Te amo, pai! Saudades infinitas.

Às minhas irmãs, Yasmin, Islam e Mirian (*in memorian*) que contribuíram para minha escolha de cursar farmácia e seguir na pesquisa, como eu sempre dizia quando era criança: “eu irei estudar muito, para curar a doença das minhas irmãs” Vocês não estão mais presentes aqui, mas meu sonho continua e continua por vocês. Amo vocês!

Gostaria de agradecer a minha orientadora professora Dra. Gabriela Trevisan pela oportunidade de participar como aluna de iniciação científica e no mestrado. Por estar sempre disponível e preocupada comigo e com os meus estudos. Muitas vezes, eu me sentia preocupada e frustrada pelo tempo e pelos resultados e a prof. Gabi sempre me acalmava com seus conselhos e que daria tudo certo. No fim, sempre dá certo. Muito obrigada prof. Gabi.

Meus agradecimentos, carinhosamente, em todos que me ajudaram neste trabalho, mas especialmente a Caren Antoniazzi, Camila Camponogara, Diéssica Dalenogare e Graziela Moro Meira. Muito obrigada pela ajuda e pela troca de conhecimento. Vocês foram muito importantes para mim e para meu amadurecimento na pesquisa. Meus agradecimentos as alunas Marcella Amorim, Ana Merian, Rubya Zaccaron e Carolina Stein pela contribuição ao trabalho. Meus agradecimentos aos professores Paulo Silveira, Rafael Noal, Sara Marchesan e Juliano Ferreira pela contribuição ao trabalho.

Meus agradecimentos aos meus colegas do Farmacodor, muito obrigada pelo aprendizado, pelos momentos bons e muitos bolos da Judite.

Agradeço à UFSM pela oportunidade de cursar um ensino superior e pós-graduação de qualidade e aos órgãos de fomento como Fapergs, CNPQ e CAPES.

Bismillah al-raham- al rahim

(Em nome de Allah, O Clemente, O Misericordioso).

RESUMO

A APLICAÇÃO TÓPICA DE UM ANTAGONISTA TRPA1 REDUZ A NOCICEPÇÃO E A INFLAMAÇÃO EM UM MODELO DE LESÃO MUSCULAR TRAUMÁTICA EM RATOS

AUTORA: Sabrina Qader Kudsi
ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Gabriela Trevisan Dos Santos

A dor musculoesquelética é um problema de saúde pública amplamente vivenciado, principalmente após lesão muscular traumática. Além disso, é uma causa comum de incapacidade, mas esse tipo de dor ainda não possui tratamento eficaz. No entanto, a fisiopatologia da dor e inflamação associadas à lesão muscular traumática não foi totalmente elucidada. Nesse sentido, o receptor de potencial transitório anquirina 1 (TRPA1) tem sido estudado em condições inflamatórias e dolorosas. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito antinociceptivo e anti-inflamatório da aplicação tópica de um antagonista TRPA1 em um modelo de lesão muscular traumática em ratos. O modelo de trauma mecânico foi desenvolvido por um único impacto no músculo gastrocnêmio direito de ratos machos Wistar (250-350 g). Os animais foram divididos em quatro grupos (Sham/veículo; sham/HC-030031 0,05%; lesão/veículo e lesão/HC-030031 0,05%) e tratados topicamente com uma base de creme Lanette® N contendo o antagonista TRPA1 (HC- 030031, 0,05%; 200 mg/músculo) ou veículo (Lanette® N creme base; 200 mg/músculo) em 2, 6, 12, 24 e 46 horas após a lesão muscular. Além disso, avaliou-se a contribuição do canal TRPA1 nos parâmetros nociceptivos, inflamatórios e oxidativos. A aplicação tópica do antagonista TRPA1 reduziu os biomarcadores de lesão muscular (relação lactato/glicose), nocicepção espontânea (escala facial para rato), inflamatória (infiltração de células inflamatórias, níveis de citocinas, atividades de mieloperoxidase e N-acetil-β-D-glucosaminidase), parâmetros oxidativos (níveis de nitrito e fluorescência de diclorofluoresceína) e níveis de mRNA *Trpa1* no tecido muscular. Assim, esses resultados demonstram que o TRPA1 pode ser um alvo anti-inflamatório e antinociceptivo promissor no tratamento da dor musculoesquelética após lesão muscular traumática.

Palavras-chave: Dor musculoesquelética. HC-030031. Canais TRP. Mialgia. Inflamação.

ABSTRACT

TOPICAL APPLICATION OF A TRPA1 ANTAGONIST REDUCED NOCICEPTION AND INFLAMMATION IN A MODEL OF TRAUMATIC MUSCLE INJURY IN RATS

AUTHOR: Sabrina Qader Kudsi

ADVISOR: Prof^a. Dra. Gabriela Trevisan Dos Santos

Musculoskeletal pain is a widely experienced public healthcare issue, especially after traumatic muscle injury. Besides, it is a common cause of disability, but this type of pain remains poorly managed. However, the pathophysiology of traumatic muscle injury-associated pain and inflammation has not been fully elucidated. In this regard, the transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) has been studied in inflammatory and painful conditions. Thus, this study aimed to evaluate the antinociceptive and anti-inflammatory effect of the topical application of a TRPA1 antagonist in a model of traumatic muscle injury in rats. The mechanical trauma model was developed by a single blunt trauma impact on the right gastrocnemius muscle of *Wistar* male rats (250–350 g). The animals were divided into four groups (Sham/vehicle; sham/HC-030031 0.05%; injury/vehicle, and injury/HC-030031 0.05%) and topically treated with a Lanette[®] N cream base containing a TRPA1 antagonist (HC-030031, 0.05%; 200 mg/muscle) or vehicle (Lanette[®] N cream base; 200 mg/muscle) was applied at 2, 6, 12, 24, and 46 h after muscle injury. Furthermore, we evaluated the contribution of the TRPA1 channel on nociceptive, inflammatory, and oxidative parameters. The topical application of TRPA1 antagonist reduced biomarkers of muscle injury (lactate/glucose ratio), spontaneous nociception (rat grimace scale), inflammatory (inflammatory cells infiltration, cytokine levels, myeloperoxidase, and N-acetyl- β -D-glucosaminidase activities), oxidative (nitrite levels and dichlorofluorescein fluorescence) parameters, and mRNA *Trpa1* levels in the muscle tissue. Thus, these results demonstrate that TRPA1 may be a promising anti-inflammatory and antinociceptive target in treating muscle pain after traumatic muscle injury.

Keywords: Skeletal Muscle pain. HC-030031. TRP channels. Myalgia. Inflammation.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

FIGURA 1 – Classificação da dor	18
FIGURA 2 – Processamento da dor nociceptiva	19
FIGURA 3 – Vias ascendentes da dor	21
FIGURA 4 – Vias descendentes da dor.....	23
FIGURA 5 – Dor neuropática e suas classificações	24
FIGURA 6 – Dor nociplástica.....	26
FIGURA 7 – Dor inflamatória.....	27
FIGURA 8 – Principais modelos de hiperalgesia muscular.....	40
FIGURA 9 – Os receptores de potencial Transitório (TRPs).....	43
FIGURA 10 – O Receptor de Potencial Transitório Anquirina 1.....	45
FIGURA 11 – Vias de sinalização presentes na dor musculoesquelética envolvendo TRPA1.....	102
FIGURA 12 – Principais achados no modelo de lesão muscular traumática	104
FIGURA 13 – Perspectivas para novos estudos em modelo de lesão muscular traumática.....	106

MANUSCRITO

FIGURA 1 – <i>Schematic representation of experimental design.....</i>	73
FIGURA 2 – <i>TRPA1 antagonism decreases the glucose/lactate ratio after induction of traumatic muscle injury.....</i>	74
FIGURA 3 – <i>TRPA1 antagonism reduced spontaneous nociception without altering the locomotor activity after induction of traumatic muscle injury.....</i>	75
FIGURA 4 – <i>TRPA1 antagonism reduces the inflammatory cells infiltration after induction of traumatic muscle injury</i>	76
FIGURA 5 – <i>TRPA1 antagonism reduces the oxidative and inflammatory mediators after induction of traumatic muscle injury</i>	78
FIGURA SUPLEMENTAR 1 – <i>Traumatic muscle injury-induced no changes alteration on locomotor activity and force grip in rats.....</i>	83
FIGURA SUPLEMENTAR 2 – <i>TRPA1 antagonism not reduce score nociception, mechanical and cold allodynia after induction of traumatic injury muscle.....</i>	84

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO

TABELA 1 – List of forward and reverse primers used on RT - qPCR assays and their respective sequences.....	79
---	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS.....	15
2.1	OBJETIVO GERAL	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
2.3	JUSTIFICATIVA.....	16
3	REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1	DOR	17
3.2	DOR MUSCULOESQUELÉTICA.....	28
3.3	FISIOPATOLOGIA DA DOR MUSCULOESQUELÉTICA.....	28
3.4	TIPOS DE LESÕES MUSCULARES.....	30
3.5	MECANISMOS DE DANO E REPARO MUSCULAR.....	31
3.6	BIOMARCADORES DE LESÃO MUSCULAR.....	34
3.7	TERAPIAS NÃO FARMACOLÓGICAS E FARMACOLÓGICAS PARA A DOR MUSCULOESQUELÉTICA.....	36
3.8	MODELOS PRÉ-CLÍNICOS DE DOR MUSCULOESQUELÉTICA.....	37
3.9	RECEPTORES DE POTENCIAL TRANSITÓRIO.....	41
3.10	TRPA1 E SEU PAPEL NA DOR MUSCULOESQUELÉTICA.....	43
4	DESENVOLVIMENTO.....	49
4.1	MANUSCRITO CIENTÍFICO.....	49
5	DISCUSSÃO.....	96
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	106
7	PERSPECTIVAS.....	108
	REFERÊNCIAS.....	110
	ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	123
	ANEXO B – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	124

1 INTRODUÇÃO

De acordo com a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP, do inglês, *International Association for the Study of Pain*), a dor é definida como uma “experiência sensitiva e emocional desagradável associada, ou semelhante àquela associada, a algum dano tecidual real ou potencial” (RAJA et al., 2020). Em contraste ao termo dor, temos o conceito de nocicepção que foi definido como um sistema de codificação e processamento de estímulos nocivos (TREEDE, 2019; RAJA et al., 2020). Além disso, a dor não pode ser medida em modelos pré-clínicos por ser uma experiência pessoal influenciada por variáveis no âmbito biológico, social e psicológico, não podendo ser compreendida apenas pela atividade de neurônios sensoriais. Então, a nocicepção, sendo o processamento de estímulos nocivos, é possível de ser mensurada em modelos animais (RAJA et al., 2020).

A dor também pode ser classificada em diferentes categorias de acordo com os mecanismos fisiopatológicos, como dor nociceptiva, neuropática e nociplástica (LOESER; TREEDE, 2008; TROUVIN; PERROT, 2019). A dor musculoesquelética é um tipo de dor inflamatória, a qual se enquadra na categoria de dor nociceptiva, mais prevalente na população mundial (SCHOFIELD et al., 2015; BRIGGS et al., 2018; TROUVIN; PERROT, 2019). Esta forma de dor afeta em torno de 13,5% e 47% da população em geral, comprometendo a realização de tarefas diárias e de trabalho de pacientes acometidos por esta condição (CIMMINO; FERRONE; CUTOLO, 2011). Além disso, a dor musculoesquelética pode estar presente em vários distúrbios neuromusculares, incluindo miopatias, neuropatias periféricas e doenças do neurônio motor inferior (FILOSTO et al., 2019). No entanto, a causa mais comum de lesão muscular é o trauma mecânico (YANG; HU, 2018).

O músculo é suscetível a diversas lesões diariamente, como traumas mecânicos, estresse térmico, agentes miotóxicos, isquemia, danos neurológicos e outras condições patogênicas (YANG; HU, 2018). Após a lesão do músculo esquelético, ocorre um mecanismo geral de dano e reparação, sendo dividido em 4 etapas sequenciais complexas como degeneração, inflamação, regeneração e fibrose (HUARD et al., 2016; YANG; HU, 2018). Na fase inflamatória, vários mediadores inflamatórios podem ser liberados ou produzidos no local da lesão, como prostaglandinas, citocinas e óxido nítrico (PARIHAR et al., 2008; YANG; HU, 2018).

Estes mediadores contribuem para a sensibilização dos nociceptores ocasionando alodinia (dor a estímulos previamente descritos como inócuos) e hiperalgesia (hipersensibilidade a estímulos dolorosos) (LOESER; TREEDE, 2008; LANDINI et al., 2022).

Assim, diferentes receptores podem participar do desenvolvimento da dor musculoesquelética como os receptores de potencial transitório (TRPs, do inglês, *Transient Receptor Potential*). Os canais TRPs são expressos em neurônios sensoriais que detectam estímulos nocivos. Este grupo de receptores é uma das maiores famílias de canais iônicos e estas proteínas compartilham semelhanças estruturais possuindo seis domínios transmembrana (S1 a S6) (NILIUS; SZALLASI, 2014; MORAN; SZALLASI, 2017). Nos mamíferos, os canais TRP consistem em 27 proteínas de membrana sendo classificadas em seis subfamílias. Além disso, essa superfamília de canais iônicos está envolvida em processos fisiológicos, dolorosos e inflamatórios (KUDSI et al., 2022). Entre esses receptores, está o TRP anquirina 1 (TRPA1) que tem sido estudado no desenvolvimento da nocicepção induzida por mediadores inflamatórios (KOIVISTO et al., 2022).

O TRPA1 é um canal catiônico não-seletivo permeável a cátions (principalmente cálcio), geralmente encontrado em neurônios sensoriais peptidérgicos colocalizado com o TRP vanilóide 1 (TRPV1) (GIORGI, et al., 2019). Este canal pode ser ativado por compostos irritantes derivados de plantas, como o isotiocianato de alila (encontrado no óleo de mostarda). Também, compostos endógenos como o 4-hidroxinonenal (4-HNE), o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e o óxido nítrico (NO) são capazes de causar uma sensibilização e conseqüentemente ativar o receptor (BENEMEI; DUSSOR, 2019; DE LOGU et al., 2022). O TRPA1 também pode ser expresso a nível neuronal e não neuronal. Em nível neuronal, esse receptor é amplamente expresso em gânglios da raiz dorsal (GRD) e gânglio trigeminal (GT). Enquanto em nível não neuronal, o receptor é expresso em várias células inflamatórias como mastócitos e em células epiteliais como células dendríticas e queratinócitos, ou ainda em células de Schwann, astrócitos e oligodendrócitos (MORAN et al., 2018; DE LOGU et al., 2020).

Diversos estudos demonstraram a expressão do TRPA1 em aferentes musculares do músculo masseter e indicam que o TRPA1 pode atuar como um transdutor sensorial para estímulos mecânicos nocivos (RO; LEE; ZHANG, 2009; ASGAR et al., 2015). Um estudo anterior mostrou que ocorre ativação de correntes

mediadas pelo receptor TRPA1 em GRD de ratos que inervam o músculo gastrocnêmio (XING; LI, 2017). Além disso, este canal iônico poderia desempenhar um papel essencial no desenvolvimento da hipersensibilidade mecânica sob várias condições de dor inclusive em patologias relacionadas à dor musculoesquelética (SUGIYAMA; KANG; BRENNAN, 2017; WANG et al., 2018). Porém ainda deve ser estudado se após lesão traumática do músculo ocorre aumento da expressão do receptor TRPA1 ou ainda a sua sensibilização por mediadores inflamatórios.

Até o momento os antagonistas do canal TRPA1 não conseguiram completar a fase III de estudos clínicos, especialmente devido a problemas relacionados a sua biodisponibilidade e baixa absorção por via oral. Então, a aplicação tópica de antagonistas do receptor TRPA1 poderia ter efeito local causando analgesia em diferentes tipos de dor restrita ao local da lesão (KOIVISTO et al., 2022). Dessa forma, estudos recentes descrevem que a administração tópica na pele com o composto HC-030031 (um antagonista seletivo do TRPA1) causou efeito antinociceptivo, anti-inflamatório e antioxidante em modelos de lesão por queimadura solar e térmica (ANTONIAZZI et al., 2018; FIALHO et al., 2020). Neste sentido, como a lesão traumática muscular causa dor localizada e inflamação seria interessante testar o efeito de um antagonista deste receptor neste modelo (HAUPENTHAL et al., 2020; KUDSI et al., 2020).

Em estudos anteriores, a administração de H₂O₂, um agonista TRPA1, no músculo gastrocnêmio causou comportamento nociceptivo que foi bloqueado por antagonismo do canal TRPA1 por via intramuscular em ratos e camundongos (usando os antagonistas seletivos do TRPA1 AP18 ou HC-030031) ou deleção gênica do TRPA1 em camundongos (SUGIYAMA et al., 2017; SUGIYAMA; KANG; BRENNAN, 2017). Além disso, nosso grupo de pesquisa mostrou que um modelo de lesão muscular traumática em ratos causou parâmetros nociceptivos e inflamatórios em ratos (KUDSI et al., 2020). Diversos estudos também relataram que a lesão muscular causa a produção de compostos oxidantes, e estes poderiam estar associados a indução de inflamação e nocicepção (HAUPENTHAL et al., 2020; KUDSI et al., 2020). Diante disso, o objetivo deste estudo foi avaliar se a aplicação tópica de HC-030031 reduz a nocicepção e a inflamação em um modelo de lesão muscular traumática em ratos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar se a aplicação tópica de um antagonista TRPA1 reduz a nocicepção e a inflamação em um modelo de lesão muscular traumática em ratos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito antinociceptivo do antagonista TRPA1 em um modelo de lesão muscular traumática em ratos;
- Avaliar o efeito do antagonista do receptor TRPA1 sobre a atividade locomotora e exploratória em um modelo de lesão muscular traumática em ratos;
- Avaliar o efeito do antagonista do receptor TRPA1 sobre parâmetros bioquímicos, inflamatórios e oxidativos em um modelo de lesão muscular traumática em ratos;
- Investigar o efeito do antagonista do receptor TRPA1 sobre a resposta celular inflamatória em cortes histológicos do tecido muscular em um modelo de lesão muscular traumática em ratos;
- Estudar os níveis de mRNA do receptor TRPA1 em tecido muscular e gânglio da raiz dorsal em um modelo de lesão muscular traumática em ratos após o tratamento com um antagonista do TRPA1.

2.3 JUSTIFICATIVA

O receptor TRPA1 pode participar na via de sinalização frente a estímulos dolorosos e inflamatórios que poderiam participar no desenvolvimento da dor musculoesquelética (RO et al., 2009; ASGAR et al., 2015; WANG et al., 2018). Há estudos que demonstraram que a expressão funcional de TRPA1 é significativamente maior nos neurônios dos GRD que inervam o músculo esquelético do que nos neurônios dos gânglios da raiz dorsal que inervam a pele (MALLIN et al., 2011). Além disso, estudos anteriores registraram correntes induzidas por AITC com ativação de TRPA1 em neurônios do GRD de ratos inervando a porção branca do músculo gastrocnêmio (XING; LI, 2017). Dessa forma, o receptor TRPA1 é encontrado nos aferentes do músculo gastrocnêmio e poderia ser ativado após a produção de agonistas endógenos ou sensibilizados pela produção de mediadores inflamatórios após lesão muscular traumática.

Nesse modelo, após o dano muscular, há também um aumento na produção de compostos oxidativos, o que poderia causar a ativação do TRPA1 (HAUPENTHAL et al., 2020; KUDSI et al., 2020). Em modelos de dor, como queimaduras por UVB ou lesão térmica, o tratamento tópico com o antagonista TRPA1 HC-030031 na concentração de 0,05% causou uma redução nos parâmetros nociceptivos, inflamatórios e oxidativos (FIALHO et al., 2020; ANTONIAZZI et al., 2019). No entanto, como a participação do canal TRPA1 na indução de dor e inflamação em lesões musculares traumáticas do músculo gastrocnêmio ainda não foi estudada. Dessa maneira, este trabalho poderá esclarecer se o antagonismo do TRPA1 por via tópica poderia ser utilizado como tratamento na dor e inflamação após lesão muscular traumática. Assim o nosso estudo poderá auxiliar na melhora do tratamento da dor musculoesquelética após lesão traumática.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 DOR

A dor é uma sensação desagradável, mas também é um componente essencial do sistema de defesa do nosso organismo. Nos casos em que se pode ter uma lesão grave, como queimar a mão ao encostar em uma panela aquecida no fogão, existe um mecanismo de resposta reflexa para a dor. Este mecanismo é gerado como uma forma de aviso rápido, onde o sistema nervoso inicia uma resposta motora para afastar a mão da panela a fim de minimizar os danos físicos causados pela exposição ao calor nocivo, por exemplo (YAM et al., 2018). A falta da capacidade de sentir dor, como na condição rara de insensibilidade congênita à dor, pode causar problemas de saúde muito graves, como automutilação e auto amputação (BENNETT; WOODS, 2014). Dessa forma a dor aguda e nociceptiva é muito importante para a manutenção da integridade dos tecidos e da percepção que nos permite interpretar certo tipo de informação sensorial (MCCARBERG; PEPPIN, 2019).

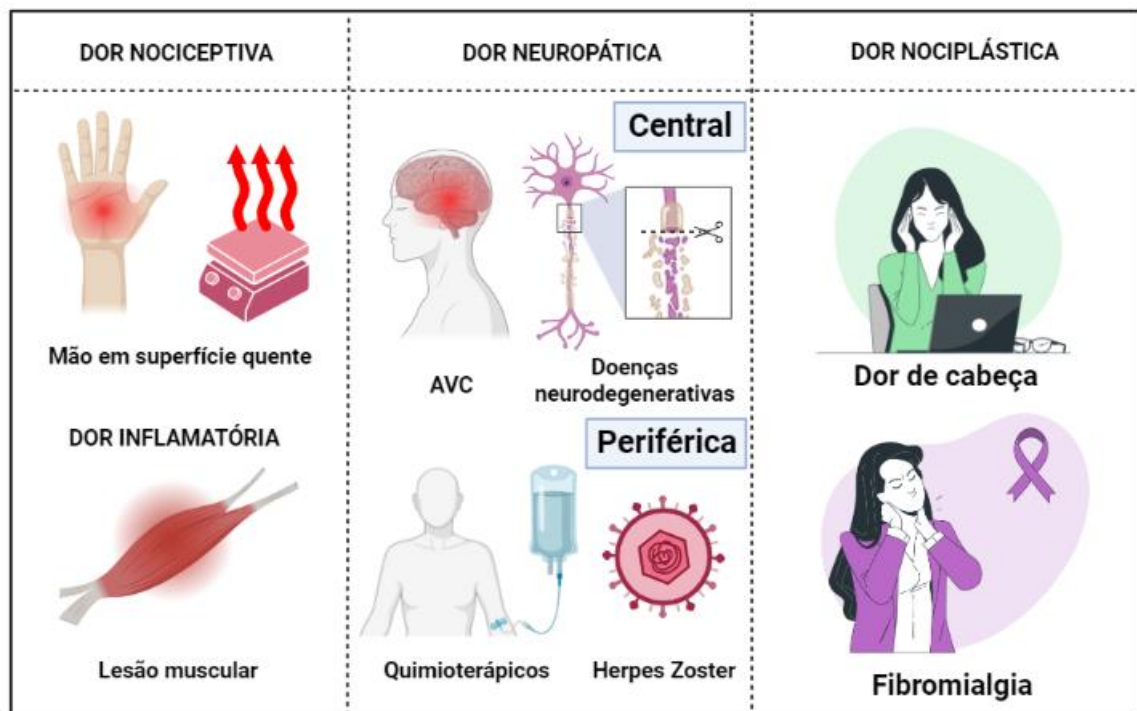
Neste contexto, a percepção é o processo que nos permite interpretar informações sensoriais como, por exemplo, comer determinado alimento e sentir um gosto desagradável ou ouvir determinada música e gostar da melodia. Esse tipo de distinção também pode ser aplicado à dor. Assim, a dor é uma forma de percepção que nos permite interpretar certo tipo de informação sensorial e existem órgãos especializados nessa sinalização (MCCARBERG; PEPPIN, 2019). Para entender os mecanismos envolvidos na dor deve-se compreender a diferença entre os conceitos de dor e nocicepção (APKARIAN, 2019; BALIKI; APKARIAN, 2015; RAJA et al., 2020). A dor de acordo com a IASP é uma “experiência sensitiva e emocional desagradável associada, ou semelhante àquela associada, a algum dano tecidual real ou potencial” (RAJA et al., 2020). Além disso, a dor pode ser entendida como uma modalidade somatossensorial envolvendo um complexo grupo de experiências sensoriais, emocionais e cognitivas desagradáveis provocadas por dano tecidual real ou potencial, e manifestada com diferentes reações autonômicas, psicológicas e comportamentais (LOESER; TREEDE, 2008; RAJA et al., 2020). Já o termo nocicepção, é definido como um processo neural de codificação de estímulos nocivos, a qual é mensurada em modelos animais. Enquanto a dor envolve não somente

aspectos sensoriais, mas também emocionais, dificultando, dessa forma, sua mensuração em modelos animais (LOESER; TREEDE, 2008; RAJA et al., 2020).

A dor pode ser classificada quanto ao seu tempo de evolução sendo chamada de dor aguda ou crônica. A dor aguda aparece rapidamente e dura por pouco tempo, mas ainda pode ser de alta intensidade. O período de duração da dor aguda é de no máximo 3 meses, de acordo com a definição da IASP (SCHOLZ et al., 2019; TREEDE et al., 2019). A dor aguda pode ser considerada protetiva, pois sinaliza dano, lesão ou doença ao tecido via estímulos nociceptivos e inflamatórios (KATZ; ROSENBLOOM; FASHLER, 2015). Já a dor crônica deve durar um período maior do que o estabelecido para a dor aguda, ou seja, um intervalo maior que 3 meses (SCHOLZ et al., 2019; TREEDE et al., 2019) sem servir para nenhum processo adaptativo (KATZ et al., 2015). A dor normalmente pode levar a sensibilização central e periférica, que estão relacionadas ao desenvolvimento de dor espontânea, alodinia e hiperalgesia (MIRABELLI; ELKABES, 2021).

Além disso, pode-se classificar a dor quanto aos aspectos fisiopatológicos em dor nociceptiva, neuropática e nociplástica (Figura 1).

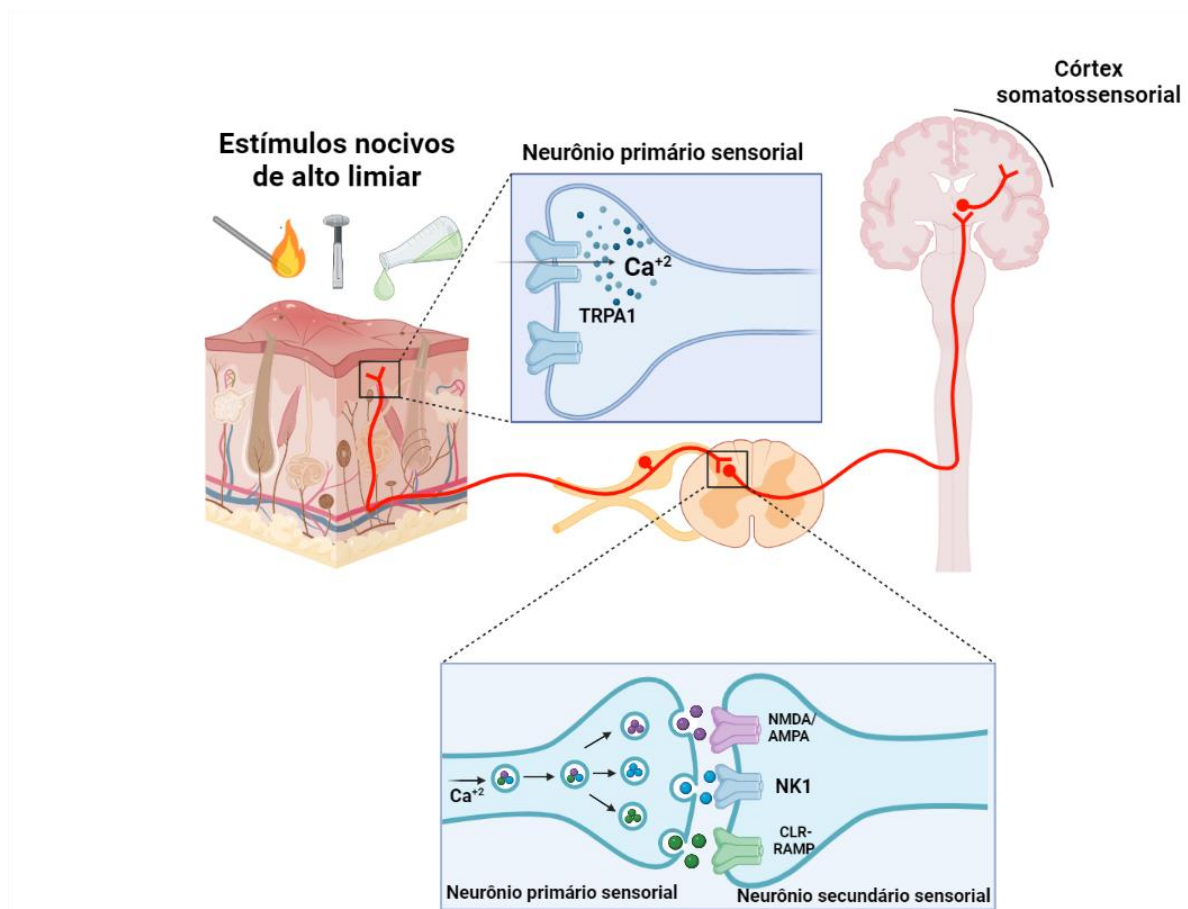
FIGURA 1- Classificação da dor.



Legenda: Tipos de dor classificados de acordo com aspectos fisiopatológicos como a dor nociceptiva, nociplástica e neuropática. Por outro lado, a dor ligada a inflamação ativa temos a dor inflamatória. Fonte: Do autor (2023).

A dor que é associada à proteção do organismo em circunstâncias que podem causar dano potencial aos tecidos é definida como dor nociceptiva (Figura 2). Além disso, a dor relacionada a inflamação ativa também se enquadra como dor nociceptiva. Esta é gerada pela ativação de terminações sensoriais livres (nociceptores), as quais transmitem os sinais nociceptivos até estruturas supraespinhais, envolvidas na percepção da dor, como o tálamo e o córtex somatossensorial. Portanto, um estímulo nocivo de alto limiar (mecânico, térmico ou químico) deve ser capaz de ativar os nociceptores, causando uma resposta dolorosa ao organismo (BASBAUM et al., 2009; WOOLF, 2010) (Figura 2).

FIGURA 2 – Processamento da dor nociceptiva.



Legenda: A dor nociceptiva é uma dor protetiva desencadeada por estímulos nocivos de alto limiar como estímulos mecânicos, químicos e térmicos. A pele é ricamente inervada por neurônios sensoriais primários como as fibras C e fibras A δ . O estímulo nocivo de alto limiar é detectado por esses neurônios sensoriais primários gerado um impulso elétrico convertido em potencial de ação. Esse potencial de ação é conduzido por essas fibras sensoriais primárias até a medula espinal onde ocorrerá a comunicação com neurônios sensoriais secundários ou neurônios de segunda ordem. Nesse sentido, haverá a liberação de neurotransmissores após o influxo de cálcio como glutamato que se liga a receptores NMDA e/ou AMPA, substância P (SP) que se liga a receptores de neuroquinina 1 (NK1) e o gene relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) que se liga a receptores de calcitonina (CLR) e de CGRP (RAMP) que juntos formam um complexo e que formam receptor para CGRP. A ativação de neurônios nociceptivos secundários contribuem para que o estímulo ascenda para as vias de processamento nociceptivo. Fonte: Do autor (2023).

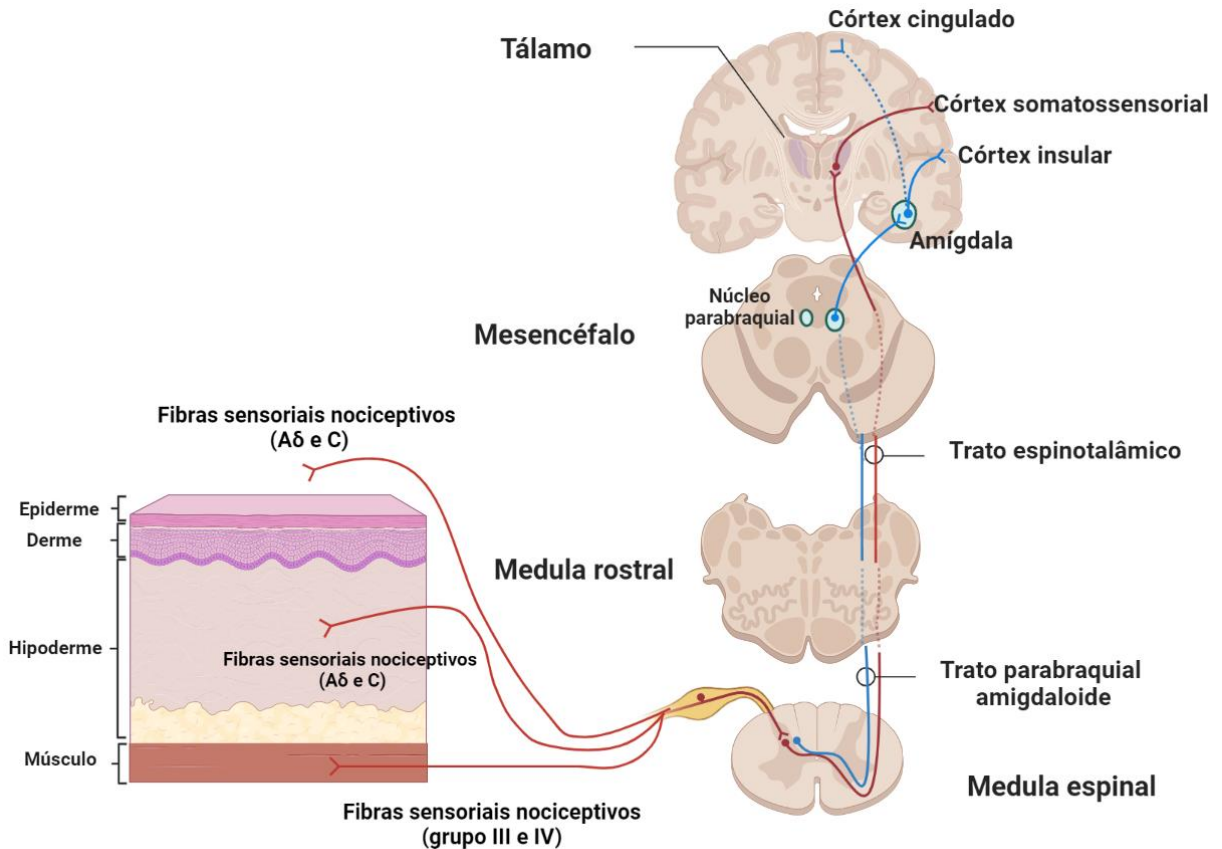
A pele é inervada por várias terminações nervosas livres de neurônios aferentes primários e a transmissão de sensações somáticas e dolorosas ocorrem através dessas fibras. A primeira classe inclui as fibras aferentes mielinizadas A δ de calibre médio que mediam a dor primária ou rápida, aguda e localizada. Já a segunda classe de nociceptores incluem as fibras C não mielinizadas de pequeno calibre que transmitem a dor secundária ou lenta, e pouco localizada (BASBAUM et al., 2009; MCCARBERG; PEPPIN, 2019). As fibras aferentes mielinizadas de grande diâmetro (A β) não conduzem estímulos nocivos, estando relacionadas à detecção do toque e da propriocepção. Por outro lado, estímulos, primeiramente inócuos, são transmitidos como estímulos nocivos após sensibilização e ocorrem geralmente em condições de dor crônica (BASBAUM et al., 2009; MCCARBERG; PEPPIN, 2019; VON HEHN; BARON; WOOLF, 2012; WOOLF, 2010).

Ainda, os neurônios aferentes primários, com seus corpos celulares localizados nos GRD para o corpo, GT para a face e nos gânglios nodoso e vagal para as vísceras (MCCARBERG; PEPPIN, 2019) podem ser classificados como pseudo-unipolares, uma vez que possuem dois terminais; um central e um periférico. Os terminais periféricos estão voltados para a periferia da pele, tecidos profundos e/ou das vísceras, enquanto os terminais centrais estão voltados para a medula espinal e tronco cerebral (MCCARBERG; PEPPIN, 2019). Nesta perspectiva, na presença de estímulos nocivos de alto limiar (mecânicos, químicos e térmicos), os nociceptores são ativados, por intermédio de diferentes receptores ali expressos. Esses receptores detectam a categoria do estímulo, levando posteriormente a ativação de canais de

sódio dependentes de voltagem, com consequente geração de um potencial de ação (SOUZA MONTEIRO DE ARAUJO et al., 2020).

Então, este potencial é transmitido até a medula espinal ou tronco encefálico, culminando na liberação de neurotransmissores excitatórios, como o glutamato e a substância P (SP) (SCHOU et al., 2017). Como consequência, ocorre a ativação de neurônios de segunda ordem (situados na medula espinal ou tronco cerebral), os quais transmitem os sinais nociceptivos para estruturas supraespinhais, através de duas vias ascendentes da dor: espinotalâmica e parabraquial amigdalóide (BASBAUM et al., 2009). A via espinotalâmica transmite o sinal nociceptivo da medula espinal até neurônios de terceira ordem, situados no tálamo, sendo caracterizada como via discriminativa sensorial da dor. Uma vez que o sinal nociceptivo ascende através do tálamo até o córtex somatossensorial ocorre a discriminação da localização, da intensidade e do tipo de estímulo. Já a via parabraquial amigdalóide permite que o sinal sensorial seja transmitido da medula até o núcleo parabraquial, deste local ocorre a transmissão até a amígdala, e então até o córtex cingulado e insular, onde há a percepção emocional da dor (BASBAUM et al., 2009) (Figura 3).

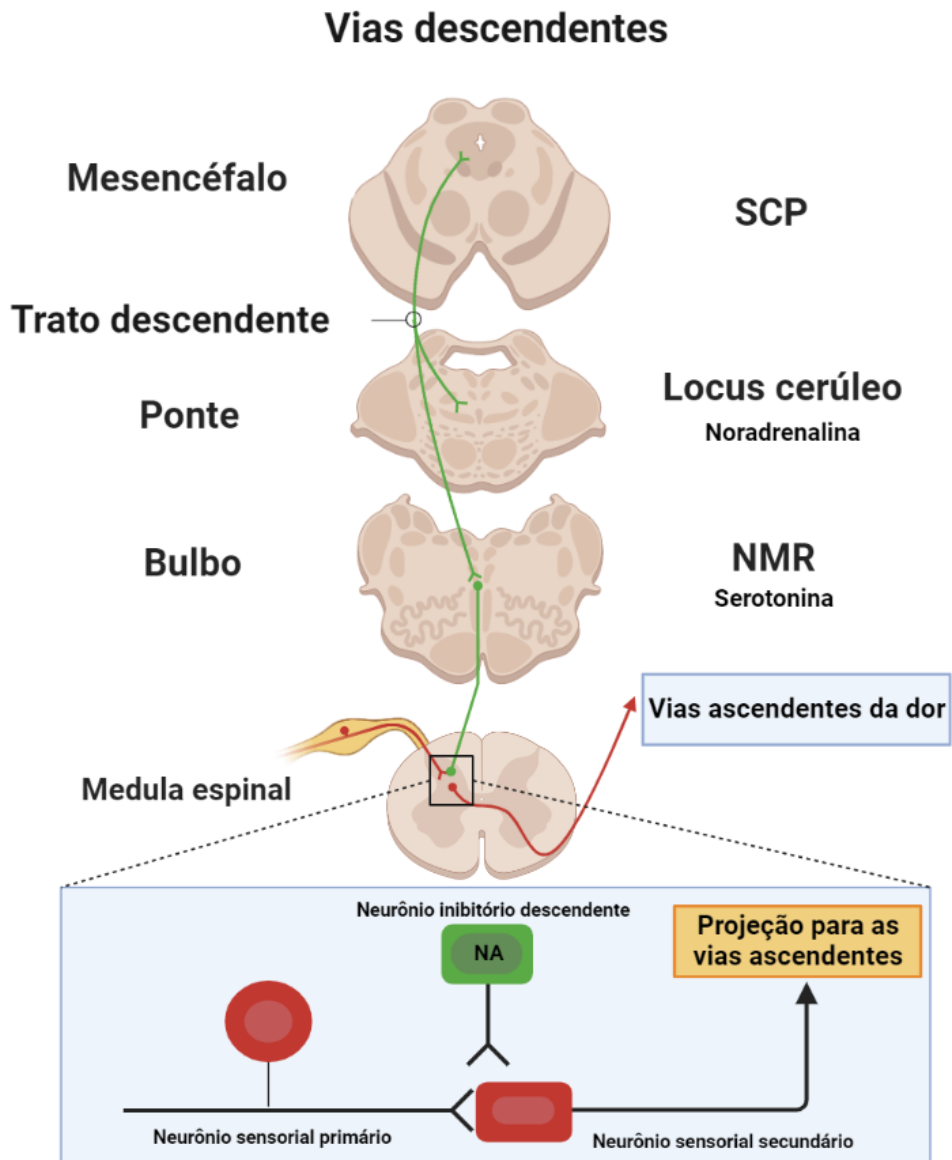
FIGURA 3 – Vias ascendentes da dor.



Legenda: A pele é inervada por várias fibras sensoriais nociceptivas importantes para transdução do sinal nociceptivo conhecidas como fibras A δ e C ou no músculo conhecidas como grupo III e grupo IV, respectivamente. Dessa forma, o estímulo doloroso é conduzido pela via espinotalâmica (linha vermelha), via discriminativa sensorial da dor, e pela via parabraquial amigdalóide (linha azul), via discriminativa emocional. A via espinotalâmica tem comunicação na medula espinal ao tálamo e após para o córtex somatossensorial (onde será discriminado o estímulo em localização, intensidade e tipo de estímulo). Por outro lado, a via parabraquial amigdalóide tem comunicação na medula espinal ao núcleo parabraquial e após a estruturas relacionadas ao sistema límbico como amígdala, córtex insular e cingulado. Na via parabraquial amigdalóide é processado a parte afetiva da dor. Fonte: Do autor (2023).

Diversos estudos demonstraram que em situações que levam a dores extremamente intensas ocorre uma resposta fisiológica que é capaz de bloquear a sinalização ascendente da dor (HUANG et al., 2019; OSSIPOV et al., 2010). Essa modulação da dor existe na forma de uma via de inibição descendente onde a substância cinzenta periaquedutal (PAG, do inglês, *periaqueductal gray*) recebe aferências de diferentes áreas do SNC como o hipotálamo, a amígdala e o córtex cingulado anterior rostral. A ativação SCP pode modular dois sistemas inibitórios descendentes de forma principal, o lócus cerúleo (LC) e o núcleo magno da Rafe (NMR) (CHEN; HEINRICHER, 2019; HUANG et al., 2019). A SCP controla indiretamente a informação nociceptiva podendo levar a ativação dos neurônios serotoninérgicos presentes no NMR e a liberação de serotonina (OSSIPOV et al., 2010). Já a ativação de neurônios do lócus cerúleo (LC) leva a liberação de noradrenalina como mostrado abaixo na Figura 4. Ambas as vias têm sido estudadas em diversas condições de dor e utilizadas como um alvo para o tratamento de pacientes com dor crônica, como a dor neuropática (CORDERO-ERAUSQUIN et al., 2016; KREMER et al., 2018).

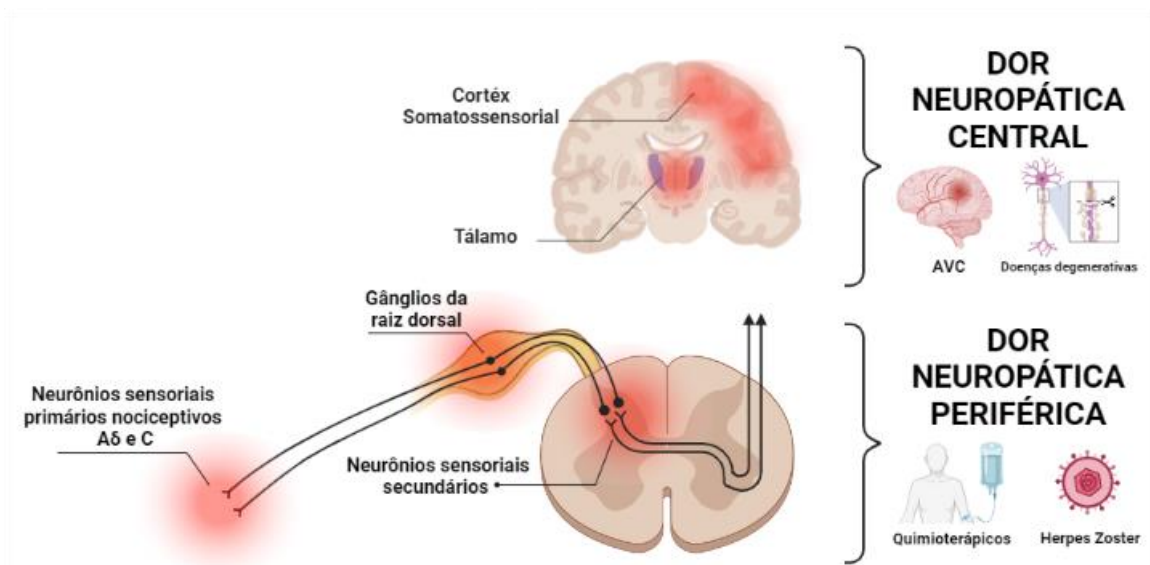
FIGURA 4 – Vias descendentes da dor.



Legenda: A substância cinzenta periaquedutal (SCP) possui duas vias descendentes: uma projeção vai do SCP até o lócus cerúleos que é formado por neurônios noradrenérgicos e outra projeção vai até o núcleo magno da rafe formado por neurônios serotoninérgicos. Essas projeções tem comunicação com a medula espinal onde será liberado monoaminas como a serotonina e noradrenalina que causam a redução da exocitose de vesículas pré-sinápticas de neurônios sensoriais primários e também diminuir a excitação pós-sináptica de neurônios sensoriais secundários. Fonte: Do autor (2023).

A dor neuropática desenvolve-se em decorrência a danos ao sistema nervoso somatossensorial ou doença deste local causados por um insulto direto aos neurônios sensoriais primários, com conseqüente morte celular e/ou comprometimento das vias de percepção da dor (MEACHAM et al., 2017; SCHOLZ et al., 2019). A dor neuropática é uma descrição clínica, e não um diagnóstico, pois necessita da verificação de investigações diagnósticas como imagem, neurofisiologia, biópsias, exames laboratoriais que observem uma anormalidade ou trauma no sistema nervoso (BREIVIK, 2002; SCHOLZ et al., 2019). Este tipo de dor pode ser subdividido em duas categorias gerais: dor neuropática central ou dor neuropática periférica (MEACHAM et al., 2017; SCHOLZ et al., 2019; FINNERUP; KUNER; JENSEN, 2021). A dor neuropática periférica ocorre quando há lesões ou doenças que acometem o sistema somatossensorial periférico como a neuropatia diabética, o uso de quimioterápicos em tratamentos oncológicos, infecções pelo vírus Herpes zoster que podem sensibilizar principalmente raízes dorsais (MEACHAM et al., 2017). A dor neuropática central ocorre quando há alguma lesão no sistema nervoso central, como um acidente vascular cerebral (AVC), ou alguma doença neurodegenerativa, como no caso da esclerose múltipla (MEACHAM et al., 2017; RACKE; FROHMAN; FROHMAN, 2022) (ver figura 5).

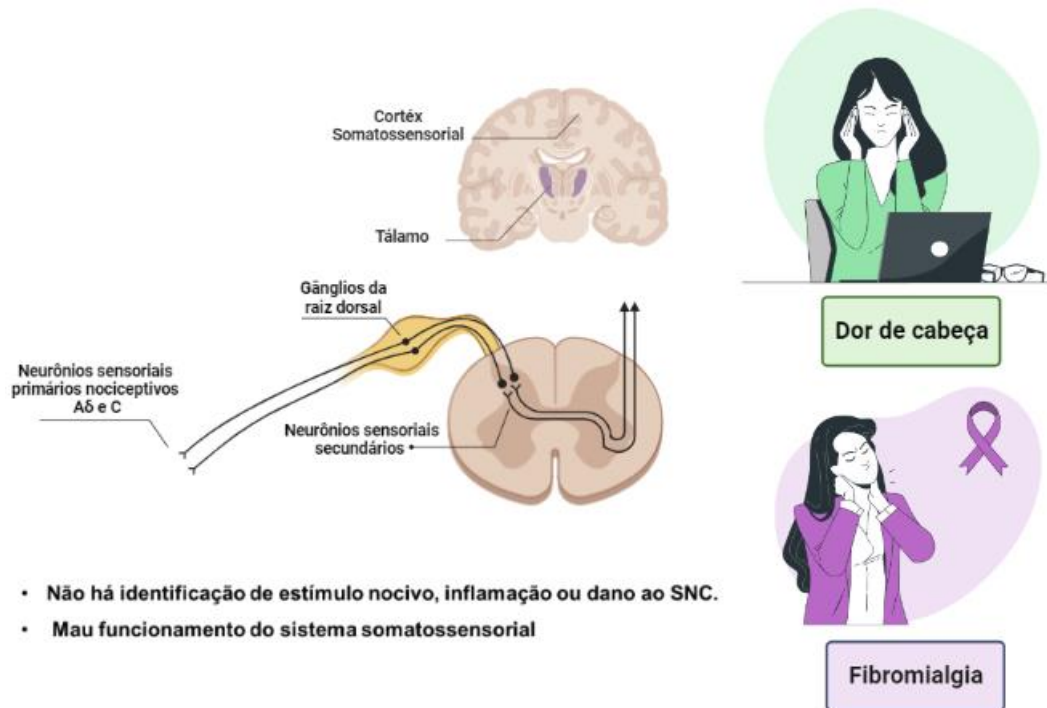
FIGURA 5 – Dor neuropática e suas classificações.



Legenda: A dor neuropática é decorrente de doenças e/ou lesões a nível de sistema somatossensorial. A dor neuropática periférica ocorre devido a lesões ou doenças que acometem o sistema somatossensorial periférico como por exemplo o tratamento de quimioterápicos em pacientes oncológicos e doenças como Herpes Zoster no qual o vírus tem maior preferência em raízes dorsais ocorrendo a sensibilização e favorecendo a dor. Já, a dor neuropática central ocorre quando há alguma lesão e/ou a presença de doenças neurodegenerativas afetando o sistema nervoso central como por exemplo no acidente vascular cerebral (AVC) e em doenças neurodegenerativas. Fonte: Do autor (2023).

A dor nociplástica ocorre em situações nas quais não há identificação de inflamação ou dano ao sistema nervoso, podendo ser considerada como uma doença por si só, causada pelo mau funcionamento do sistema somatossensorial (KOSEK et al., 2015; GRINBERG et al., 2017). Segundo a IASP, o termo “dor nociplástica” foi introduzido para caracterizar as mesmas condições de dor disfuncional (antigo termo utilizado inadequadamente), causadas pela plasticidade desadaptativa no sistema nervoso central (sem qualquer presença real de dano ao sistema nervoso). Em condições como na fibromialgia, síndrome do intestino irritável e cistite intersticial, a dor nociplástica parece resultar de uma amplificação autônoma de sinais nociceptivos dentro do sistema nervoso central (TROUVIN; PERROT, 2019). Os mecanismos envolvidos na dor nociplástica não são totalmente compreendidos, mas acredita-se que exista uma alteração na modulação e sinalização sensorial. Os sintomas observados na dor nociplástica incluem dor multifocal sendo uma dor disseminada e/ou intensa (FITZCHARLES et al., 2021). Existem ainda a presença de outros sintomas como fadiga, alterações do sono, perda de memória e alterações de humor. Esse tipo de dor pode ocorrer isoladamente, como ocorre frequentemente em condições como fibromialgia ou cefaleias primárias (cefaleia tensional e enxaqueca). Também, ocorre como parte de um estado de dor mista em combinação com dor nociceptiva ou neuropática contínua, como pode ocorrer na dor crônica na região lombar (NIJS et al., 2021).

FIGURA 6 – Dor nociplástica.

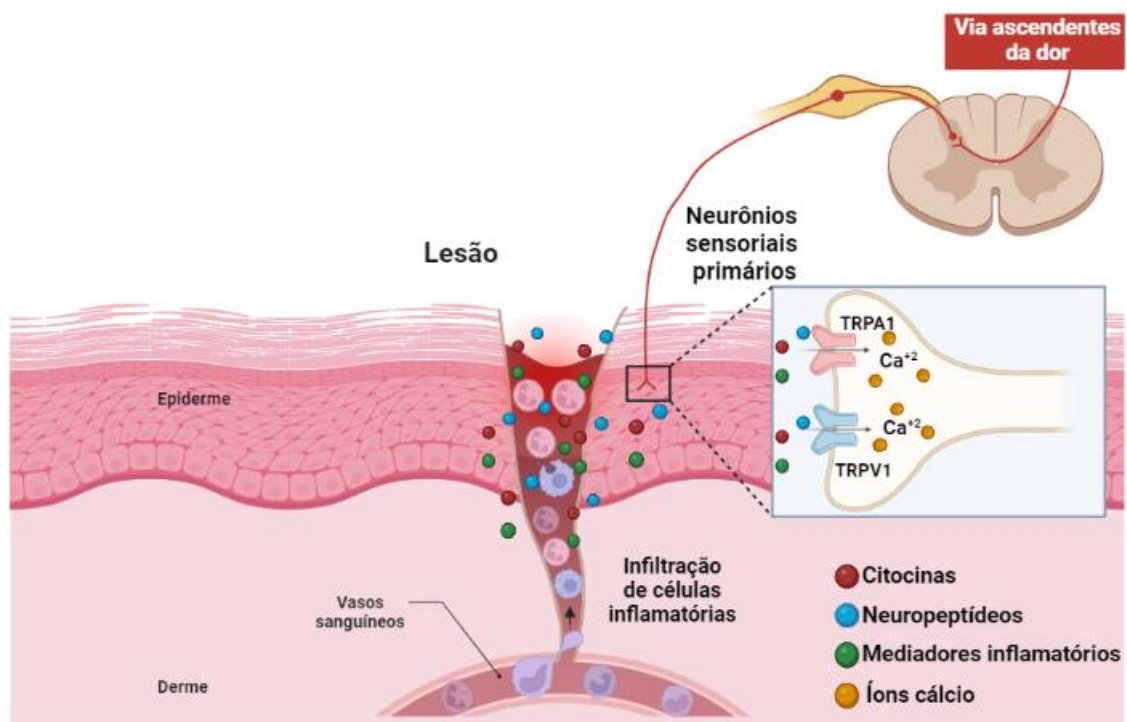


Legenda: A dor nociplástica é um tipo de dor que não há identificação dos estímulos nocivos ou dano aparente e está presente em doenças como fibromialgia e condições clínicas como dor de cabeça.
Fonte: Do autor (2023).

A dor inflamatória, tipo de dor que se enquadra categoria nociceptiva, ocorre frente a uma lesão tecidual e/ou muscular, conseqüentemente, leva a uma resposta inflamatória com ativação do sistema imune. Além disso, a dor associada à inflamação ativa se enquadra na categoria nociceptiva (ORR; SHANK; BLACK, 2017). Em condições normais, a inflamação é essencial para proteger nosso corpo de potenciais patógenos invasores, além de promover remodelação e reparação tecidual e /ou muscular. Por outro lado, a inflamação persistente não tem nenhum propósito benéfico e resulta em dano tecidual e dor (MULEY; KRUSTEV; MCDOUGALL, 2016). Neste sentido, o sistema nervoso sensorial sofre uma profunda mudança em sua capacidade de resposta, levando a alodinia ou hiperalgesia, como resultado da sensibilidade aumentada nas regiões lesadas/inflamadas (hiperalgesia primária), bem como, em regiões circundantes a lesão (hiperalgesia secundária) (COSTIGAN; SCHOLZ; WOOLF, 2009). Em suma, a hipersensibilidade na dor inflamatória é decorrente da

ativação de células residentes e também pela infiltração de células inflamatórias, com consequente produção/liberação de mediadores inflamatórios (PINHO-RIBEIRO; VERRIJR; CHIU, 2017; MULEY; KRUSTEV; MCDUGALL, 2016). Assim, prostaglandinas, citocinas, quimiocinas, proteases, neuropeptídeos e fatores de crescimento são liberados nos locais de inflamação e são capazes de sensibilizar os neurônios periféricos nociceptivos (Figura 7) (PINHO-RIBEIRO; VERRIJR; CHIU, 2017; MULEY; KRUSTEV; MCDUGALL, 2016). Nesta categoria de dor, a dor musculoesquelética se enquadra como exemplo de dor inflamatória.

Figura 7 – Dor inflamatória



Legenda: A dor inflamatória pode ocorrer após uma lesão tecidual e/ou muscular e promove a liberação de mediadores inflamatórios pelas células residentes e pela infiltração de células inflamatórias. Dessa forma, promove o processo de sopa inflamatória causa sensibilização periférica através modificação da expressão ou fosforilação de receptores de canais na periferia por mediadores inflamatórios e por ativadores endógenos (citocinas, neuropeptídeos e mediadores inflamatórios) aumentando a excitabilidade dos nociceptores periféricos. Os TRPs podem estar envolvidos na sensibilização periférica observada na dor inflamatória. Fonte: Do autor (2023).

3.2 DOR MUSCULOESQUELÉTICA

O músculo esquelético é o tecido mais abundante no corpo humano e compõe cerca de 40% do peso corporal. Além disso, o tecido musculoesquelético tem papel vital na produção de energia e metabolismo de proteínas, bem como geração de força para locomoção e estabilidade corporal. Essas funções essenciais podem ser interrompidas por lesões musculares que levam ao desconforto, edema e principalmente a dor (HOWARD et al., 2020). A dor musculoesquelética pode estar presente em decorrência de lesões no músculo esquelético e é o tipo de dor mais prevalente na população mundial (ANDERSEN; HAAHR; FROST, 2007; MURRAY et al., 2013). Esta forma de dor afeta em torno de 13,5% e 47% da população em geral, comprometendo a realização de tarefas diárias e de trabalho de pacientes acometidos por esta condição (CIMMINO; FERRONE; CUTOLO, 2011).

A dor musculoesquelética é caracterizada por condições patológicas que afetam ligamentos, articulações e ossos, podendo gerar sensação dolorosa localizada ou difundida para outras regiões do corpo além da diretamente afetada. Também, esta forma de dor é relatada como a dor mais prevalente em pessoas que sofrem de dor crônica (PERROT et al., 2019). Conforme a Classificação Internacional de Doenças 11 (CID-11), desenvolvida pela IASP em parceria com representantes da Organização Mundial da Saúde (OMS), a dor crônica musculoesquelética pode ser dividida em primária ou secundária. A dor musculoesquelética crônica primária não pode ser atribuída especificamente a alguma patologia ou dano, como ocorre na fibromialgia (PERROT et al., 2019). Já a dor musculoesquelética crônica secundária surge devido a alguma doença subjacente para qual a sensação dolorosa poderia ser considerada um dos sintomas, como na lesão muscular traumática (PERROT et al., 2019; TREEDE et al., 2019).

3.3 FISIOPATOLOGIA DA DOR MUSCULOESQUELÉTICA

As fibras sensoriais ou aferentes musculares são classificadas em quatro grupos com base no tamanho e mielinização como as fibras dos grupos I, II, III e IV. As fibras dos grupos I e II são fibras grandes mielinizadas e desempenham um papel na propriocepção. As fibras dos grupos III e IV são fibras pequenas e mielinizadas e não mielinizadas, respectivamente, correspondendo as fibras da pele A δ e C (GREGORY; SLUKA, 2014; AMANN et al., 2015; LAURIN et al., 2015).

As fibras sensoriais que inervam o músculo desempenham um papel significativo no desenvolvimento da fadiga durante o exercício físico como o aumento da reflexão a ventilação e respostas hemodinâmicas centrais (débito cardíaco) e centrais (fluxo sanguíneo de membros) (GREGORY; SLUKA, 2014; AMANN et al., 2015; LAURIN et al., 2015). Por outro lado, a projeção central dos aferentes musculares do grupo III e IV limita o exercício humano por meio de seu efeito de diminuição na saída de neurônios motores espinhais, o que diminui a ativação muscular voluntária. Além disso, estudos anteriores sugerem a existência de dois subtipos de aferentes musculares do grupo III/IV (GREGORY; SLUKA, 2014; AMANN et al., 2015; LAURIN et al., 2015). Enquanto um subtipo responde apenas a níveis fisiológicos e inócuos de metabólitos intramusculares endógenos (lactato, ATP, prótons) associados ao exercício o outro subtipo responde apenas a níveis patológicos mais altos e concomitantemente nocivos de metabólitos presentes no músculo durante contrações isquêmicas (GREGORY; SLUKA, 2014; AMANN et al., 2015; LAURIN et al., 2015).

Durante a contração prolongada do músculo esquelético, o grupo de aferentes musculares III e IV, representam mais de 50% dos aferentes musculares totais, e contribuem informando estruturas centrais sobre estímulos somáticos e/ou nocivos do tipo mecânico, térmico e químico (GREGORY; SLUKA, 2014; AMANN et al., 2015; LAURIN et al., 2015). No entanto, as fibras do grupo IV, não mielinizadas, surgem exclusivamente de terminações nervosas livres, enquanto o grupo mielinizado das fibras III também podem ser conectadas a fibras corpúsculos de paciniformes sugerindo dessa forma que fibras III são mais mecanossensíveis do que as fibras do

grupo IV. Enquanto, fibras do grupo IV são mais mecanossensíveis que o grupo III (GREGORY; SLUKA, 2014; AMANN et al., 2015; LAURIN et al., 2015).

A maioria desses neurônios terminam como terminações livres na adventícia dos vasos sanguíneos, um local ideal para amostragem de sangue para identificação de vários metabólitos liberados como subprodutos da contração do músculo como lactato, creatina quinase, íons como cálcio e potássio, $\alpha\beta$ meATP, bradicinina, produtos derivados do ácido araquidônico como prostaglandinas e tromboxanos, espécies reativas de oxigênio, prótons entre outros. Esses metabólitos geram estímulos poderosos para a ativação do grupo de fibras III e IV e essa ativação está relacionada também a ativação de receptores TRPs, principalmente TRPA1 e TRPV1 que em estudos anteriores já foi demonstrado a sua expressão em aferentes musculares do músculo gastrocnêmio (XING; LI, 2017; FUJI et al., 2008; FANG et al., 2020) e do músculo masseter (RO et al., 2015; ASGAR et al., 2015).

Essas fibras sensoriais ao deixarem o músculo, seguem o mesmo caminho que as fibras cutâneas, se projetam para diferentes camadas da medula espinal. Os aferentes dos grupos I e II projetam-se para as camadas profundas do corno dorsal (camadas III-IV), enquanto os aferentes dos grupos III e IV projetam-se para camadas superficiais (I, II e III) (GREGORY; SLUKA, 2014; AMANN et al., 2015; LAURIN et al., 2015). Os aferentes musculares nociceptivos então se projetam para o cérebro via trato espinotalâmico (GREGORY; SLUKA, 2014), onde terminam no núcleo submédio, núcleo paraventricular anterior (PVA) (KAWAKITA et al. 1993; MIN et al., 2011) e núcleo pósterolateral ventral do tálamo (GREGORY; SLUKA, 2014; AMANN et al., 2015; LAURIN et al., 2015).

A dor musculoesquelética, assim como a dor cutânea, ativa múltiplas regiões cerebrais, incluindo o córtex cingulado anterior, córtex somatossensorial primário e secundário, córtex pré-frontal dorsolateral e a córtex insular (PEYRON et al, 2000; GREGORY; SLUKA, 2014). No entanto, a dor musculoesquelética ativa regiões do cérebro associadas ao processamento emocional mais fortemente do que a dor cutânea como a amígdala, núcleo caudado, córtex orbito frontal, hipocampo e giro para-hipocampo (CHENG et al. 2011; TAKAHASHI et al. 2011; GREGORY; SLUKA, 2014). Dessa forma, os mecanismos fisiopatológicos da dor musculoesquelética bem como mecanismos neuromusculares dos aferentes musculares ainda permanecem pouco elucidados.

3.5 TIPOS DE LESÕES MUSCULARES

As lesões musculares podem causar dor, inchaço e hematomas que são sintomas que fazem parte do processo inflamatório. Além disso, as lesões musculares podem resultar em uma gama de eventos, incluindo trauma direto como lacerações, estiramentos, contusões ou distensões e causas indiretas como isquemia, infecção ou disfunção neurológica (JENSEN; BANGSBO; HELLSTEN, 2004; ROSA et al., 2019; HOWARD et al., 2020; SINGH et al., 2017).

As lacerações são um tipo de lesão muscular de trauma direto causada após ferimento com objeto externo pontiagudo ou objeto interno como osso fraturado que atinge o músculo esquelético e são lesões menos frequentes em comparação a outros tipos de lesões musculares (FERNANDES; PEDRINELLI; HERNANDEZ, 2011). O estiramento ou tração muscular (ou tendínea) é uma lesão causada pelo uso excessivo do músculo, caracterizado pelos alongamentos das fibras além dos limites basais, levando ao estiramento das miofibrilas e, conseqüentemente, a ruptura muscular (FERNANDES; PEDRINELLI; HERNANDEZ, 2011). Os estiramentos constituem cerca de 90% dos casos das lesões musculares (KÄÄRIÄINEN et al., 1998; ROSA et al., 2019; KUDSI et al., 2020) e esse tipo de lesão muscular ocorre predominantemente em músculos superficiais que cruzam duas articulações, como o músculo gastrocnêmio (ROSA et al., 2019; KUDSI et al., 2020). A contusão muscular geralmente ocorre por trauma direto quando uma força compressiva de alta intensidade é e repentinamente aplicada ao músculo, e é uma lesão comum em esportes de contato (SINGH et al., 2017; ROSA et al., 2019). As lesões por contusão manifestam-se clinicamente pela presença de dor, edema, rigidez muscular, restrição da amplitude de movimento e sensibilidade à palpação (JARVINEN et al., 2005; SINGH et al., 2017; ROSA et al., 2019).

Os tipos de lesão muscular também podem ser classificados em grau 1, 2 ou 3. O grau 1 é caracterizado por edema e desconforto; o grau 2 decorre-se por perda da função e equimose eventual; e o grau 3 é definido pela ruptura total, hematoma extenso e dor intensa (FERNANDES; PEDRINELLI; HERNANDEZ, 2011). As lesões musculares podem ocorrer em qualquer músculo, sendo os músculos dos membros

inferiores os mais afetados, como o quadríceps, isquiotibiais, reto femoral e gastrocnêmio (SINGH et al., 2017; ROSA et al., 2019)

3.6 MECANISMOS DE DANO E REPARO MUSCULAR

O músculo esquelético de mamíferos adultos é estável em condições normais, com apenas fusão esporádica de células satélites para compensar a renovação muscular causada pelo desgaste diário. No entanto, o músculo esquelético tem uma capacidade notável de regenerar após lesão (HOWARD et al., 2020). Assim, após lesão muscular este tecido possui um mecanismo geral de dano e reparação, sendo dividido em 4 etapas sequências: degeneração, inflamação, regeneração e fibrose (HUARD et al., 2016). Os processos de degeneração e inflamação muscular ocorrem nos primeiros dias após a lesão, onde ocorre a ruptura das fibras musculares e a formação do hematoma. Além disso, a maioria das lesões do músculo esquelético tem mecanismos de resolução sem a formação de tecido cicatricial fibroso, porém a proliferação dos fibroblastos, em alguns casos, pode ser excessiva, resultando na formação de tecido cicatricial (HOWARD et al., 2020).

A angiogênese ou vascularização é um processo chave na regeneração muscular após lesão (OCHOA et al., 2007; MIYAZAKI et al., 2011; HUEY et al., 2016; SINGH et al., 2017). A regeneração muscular bem-sucedida depende da restauração da rede vascular necessária para a troca de oxigênio e nutrientes e da formação de fibras musculares maduras (RHOADS et al., 2009; SINGH et al., 2017). Após a lesão, a angiogênese é fortemente coordenada com a proliferação, diferenciação e fusão das células satélites com as miofibras existentes (CHRISTOV et al., 2007; SINGH et al., 2017). As células satélites ativadas se acumulam e proliferam perto dos capilares e são estimuladas a crescer por vários fatores de crescimento secretados pelas células epiteliais circundantes (CHRISTOV et al., 2007; SINGH et al., 2017). As células satélites em proliferação e diferenciação estimulam as células endoteliais a se unirem para formar vasos sanguíneos nascentes (CHRISTOV et al., 2007; SINGH et al., 2017) e fragmentos microvasculares para formar novos brotos (RHOADS et al., 2009; SINGH et al., 2017).

A angiogênese no tecido muscular em regeneração também depende de macrófagos, quimiocinas como a proteína quimiotática de monócitos 1 e vários fatores de crescimento e seus receptores (OCHOA et al., 2007; WAGATSUMA, 2007; NOVAK

et al., 2011; CEAFALAN et al., 2015; SINGH et al., 2017). O processo de vascularização é muito importante, pois auxilia na regeneração muscular e recuperação da estrutura morfológica do músculo (HUARD et al., 2016). Durante a fase inflamatória, vários mediadores inflamatórios podem ser liberados ou produzidos no local da lesão, como: prostaglandinas, bradicinina, citocinas, quimiocinas e óxido nítrico (PARIHAR et al., 2008). Estas substâncias quando em contato com os terminais nociceptivos podem ocasionar a sensibilização dos nociceptores (periférico e central), promovendo sintomas nos pacientes como alodinia e hiperalgesia (LOESER; TREEDE, 2008; CHANG; WAXMAN, 2010).

Um dos mecanismos associados a resposta inflamatória é o aumento da produção de espécies reativas de em células inflamatórias, como neutrófilos e macrófagos (HOŞNUTER et al., 2004; PARIHAR et al., 2008). Os neutrófilos são as primeiras células inflamatórias a infiltrarem o tecido frente a uma lesão, apresentando um papel primordial na fagocitose e no sistema imune (KHARRAZ et al. 2013; ENDO et al., 2016; MAHDY, 2016; WINTERBOURN; KETTLE; HAMPTON, 2016). Durante uma lesão, essas células são recrutadas para locais de infecção onde fagocitam e destroem patógenos invasores. A ação antimicrobiana e inflamatória dos neutrófilos está relacionada ao processo conhecido como explosão respiratória (EL-BENNA et al., 2016). Durante este processo, grandes quantidades de oxigênio são consumidas e convertidas em radicais superóxidos e, conseqüentemente, em peróxido de hidrogênio, produzidos pela ação subsequente das enzimas NADPH oxidase (reduz o oxigênio em ânion superóxido) e superóxido dismutase (promove a dismutação do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio) (KLEBANOFF et a.,2013; ENDO et al., 2016; WINTERBOURN; KETTLE; HAMPTON, 2016).

Sucessivamente, a presença de peróxido de hidrogênio e íons cloreto (no citosol dos neutrófilos) torna-se um substrato para ação da enzima mieloperoxidase (MPO; presente em grânulos azurófilos dos neutrófilos), a qual gera um potente oxidante secundário e microbicida, o ácido hipocloroso (KLEBANOFF et a.,2013; ENDO et al., 2016; WINTERBOURN; KETTLE; HAMPTON, 2016). Através da liberação de citocinas quimioatraentes, os monócitos são recrutados ao músculo (SOEHNLEIN; LINDBOM; WEBER, 2009) convertendo-se em macrófagos (ARNOLD et al., 2007), os quais podem ser detectados indiretamente no tecido através da medida da atividade da enzima N-acetil- β -Dglicosaminidase (NAGase) (COELHO et al., 2014; PEGORARO et al., 2017).

Existem dois fenótipos de macrófagos: os macrófagos M1 (pro-inflamatório), os quais invadem precocemente o tecido (24 horas após a lesão). Eles apresentam marcadores de superfície, bem como produzem citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina (IL)-1 β e IL-6 e o fator de necrose tumoral (TNF)- α e EROs (YIN; PRICE; RUDNICKI, 2013; OGLE et al., 2016). Por outro lado, os macrófagos M2 (anti-inflamatório/imunossupressor) produzem diversas citocinas e fatores de crescimento com ação anti-inflamatória, como a IL-10 e o fator de crescimento transformante (TGF)- β , promovem a regeneração tecidual, angiogênese e contribuem para a imunossupressão (diferenciação de células Th2 e Treg) (DUQUE; DESCOTEAUX, 2014). A ativação de fenótipos pró-inflamatório ou anti-inflamatório de macrófagos dependerá do microambiente em que é encontrado o macrófago e dos sinais/estímulos ali liberados (DUQUE; DESCOTEAUX, 2014). A cinética e a interconversão dos fenótipos M1 e M2 de macrófagos parecem ser críticos para os processos de dano muscular e regeneração musculoesquelética (PERANDINI et al., 2018; ZUO et al., 2018). Após o dano muscular, o influxo de neutrófilos é seguido pela infiltração de macrófagos M1, os quais promovem a supressão de células necróticas e produzem diversas citocinas associadas à ativação e proliferação inicial de células satélites. Durante as etapas posteriores, os macrófagos M1 são gradualmente substituídos pelo fenótipo M2, esses responsáveis pela diferenciação das células satélites em miotubos e pelo remodelamento e reparo tecidual (SACLIER et al., 2013; PERANDINI et al., 2018).

3.7 BIOMARCADORES DE LESÃO MUSCULAR

Os principais biomarcadores da lesão muscular utilizados em estudos são enzimas como creatina quinase (CK), lactato desidrogenase (LDH), mioglobina, aspartato-aminotransferase (AST) e níveis de alguns cátions como cálcio e magnésio. Entretanto, a CK e o produto formado pela catalisação da lactato desidrogenase como o lactato são os importantes biomarcadores de lesões musculares e são normalmente utilizados para o diagnóstico de desordens musculoesqueléticas (LEE et al., 2017).

A CK, CPK conhecida também como creatina fosfoquinase, é uma enzima dimérica, composta de duas subunidades (B e M) que são separadas em três formas moleculares diferentes (isoenzimas): CK-BB ou CK-1 encontrada principalmente no cérebro; CK-MB ou CK-2, forma híbrida, localizada principalmente no miocárdio e CK-

MM ou CK-3, situada no músculo esquelético (BRANCACCIO; LIPPI; MAFFULLI, 2010). Deste modo, qualquer lesão que afete células musculares, cerebrais ou do miocárdio provocará um aumento na atividade sérica de CK composta. A principal atividade da CK está no tecido muscular (esquelético e cardíaco). Durante períodos de repouso, sua principal função é fosforilar de forma reversível a creatina em creatina fosfato, de maneira dependente de adenosina trifosfato (ATP). Entretanto, durante a atividade muscular, a reação processa-se no sentido inverso, a fim de liberar moléculas de ATP para o processo de contração muscular (MANOJLOVIĆ; ERČULJ, 2019; LEE et al., 2017).

A CK pode ser denominada de enzima de extravasamento, e no contexto de dano muscular, essa é liberada a partir de células musculares, com consequente aumento da sua atividade sérica. No entanto, mesmo em casos de lesão muscular em fase inicial, já se percebe alterações na atividade sérica de CK, uma vez que sendo uma enzima citoplasmática, está sujeita a uma rápida liberação na circulação sanguínea (LEVY et al., 2011; BAPTISTELLA, 2009; BRANCACCIO; LIPPI; MAFFULLI, 2010). A atividade sérica de CK encontra-se aumentada em várias condições clínicas associadas à lesão muscular aguda (miosite, distrofia muscular e traumatismo muscular), e após esforço muscular intenso, cirurgia ou convulsões (LEVY et al., 2011; SILVEIRA et al., 2013; BRIGO et al., 2015; SIERRA et al., 2019; LEE et al., 2017; SORICHTER et al., 1999).

Estudos anteriores mostraram que após lesão muscular ou exercício extenuante devido à supressão da concentração de oxigênio ocorre a transição do metabolismo aeróbico para o anaeróbico para que o músculo esquelético possa gerar ATP e energia (THEOFILIDIS et al., 2018; MANOJLOVIC; ERCULJ, 2019). Desta forma, o piruvato, com a ajuda de enzimas que as células dispõem como a lactato desidrogenase, pode ser convertido em lactato. Por sua vez, o lactato e prótons são transportados para o plasma. Em condições aeróbicas, o piruvato também pode ser convertido em acetil-CoA que vai agir no Ciclo de Krebs ou também conhecido como ciclo de ácido cítrico. Além disso, através do ciclo de Krebs ocorre a geração de portadores de elétrons como 6 NADH, 2 FADH₂ e 2 ATP (THIRUPATHI; PINHO, 2018). Esses portadores de elétrons são importantes para geração de produtos de espécies reativas de oxigênio (EROs) pela cadeia de transporte e agem principalmente no complexo I, II e IV contribuindo com a formação do ânion superóxido

que é o precursor da maioria das espécies reativas de oxigênio (THIRUPATHI; PINHO, 2018).

Nesse sentido, o lactato formado causa uma redução do pH no músculo pelo acúmulo de prótons, favorecendo a produção de compostos reativos, incluindo peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e óxido nítrico (NO) (THIRUPATHI; PINHO, 2018; RIEMANN et al., 2011; LOGU et al., 2019). Esses subprodutos podem iniciar e manter a sensibilização/ativação do receptor TRPA1, pois são agonistas endógenos do TRPA1 e se ligam covalentemente a resíduos de aminoácidos como cisteína/lisina que constituem o receptor TRPA1, ativando-o (De LOGU et al., 2019). Além disso, o lactato produzido por lesão ou isquemia pode sensibilizar ou ativar o TRPA1 (SUGIYAMA et al., 2017a; 2017b; TREVISAN et al., 2016; DE LA ROCHE et al., 2016).

3.8 TERAPIAS NÃO FARMACOLÓGICAS E FARMACOLÓGICAS PARA A DOR MUSCULOESQUELÉTICA

Na clínica, os tratamentos não farmacológicos e farmacológicos para a dor musculoesquelética ainda são pouco efetivos, o que torna necessário a busca de novas alternativas terapêuticas efetivas e seguras que reduzem a dor, melhorem a inflamação e auxiliem na recuperação funcional do músculo lesado (BARCELOS et al., 2017). Os tratamentos não farmacológicos mais usados são crioterapia, laserterapia, ultrassom terapêutico e a utilização de protocolos como PRICE (do inglês - *Protection, Rest, Ice, Compression and Elevation*) que incluem proteção, repouso, gelo e compressão do membro lesionado (SILVEIRA et al., 2010; ALMEIDA et al., 2013; SILVEIRA et al., 2016; ROSA et al., 2017).

Por outro lado, dentre os tratamentos farmacológicos destacam-se os anti-inflamatórios não esteroides (AINES), analgésicos não opioides (paracetamol), opioides (morfina, codeína e tramadol) e relaxantes musculares (carisoprodol, ciclobenzaprina, orfenadrina, tizanidina e baclofeno) (BARBARINDE et al., 2017). Os AINES são a classe de medicamentos mais utilizada para o tratamento da dor musculoesquelética. Geralmente, são aplicados no local da dor e podem ser apresentados na forma de cremes, géis, pomadas, adesivos e aerossóis (sprays) (ALMEIDA et al., 2013; BARCELOS et al., 2017). Os AINES são um grupo diverso de fármacos com atividade anti-inflamatória, além de analgésica e antipirética. O efeito farmacológico dos AINES ocorre pela inibição das enzimas ciclooxigenases (COX-1 e

COX-2) e, conseqüente, redução de eicosanoides, como as prostaglandinas (PGs), as quais apresentam um papel importante na modulação da inflamação, nocicepção e entre outros processos fisiológicos (ALMEIDA et al., 2013; VAN WALSEM et al., 2015; FRANCIO et al., 2017). Embora os AINES apresentem relativa eficácia no tratamento da dor e inflamação muscular, seu uso prolongado pode acarretar déficits na regeneração muscular, devido à redução da proliferação e diferenciação das células satélites, com conseqüente formação de fibras musculares mais finas e fracas, além de acúmulo de tecido conjuntivo (MENSE; GERWIN, 2010).

Alguns AINES utilizados são ibuprofeno, naproxeno, ácido mefenâmico e o diclofenaco monossódico (BARBARINDE et al., 2017). Dentre os AINES, o diclofenaco monossódico é o mais utilizado e seu mecanismo de ação é através da inibição não seletivo da COX. Porém este composto tem uma ação maior sobre a COX-2 onde exibe ações inibitórias sobre essa enzima, promovendo redução da inflamação e dor, incluindo na dor musculoesquelética associada ao exercício extensivo e ao trauma muscular (BOOKMAN; 19 WILLIAMS; SHAINHOUSE, 2004; WONGRAKPANICH et al., 2018). Paradoxalmente, outros estudos relatam que o diclofenaco no pós-exercício não apresentou efeito analgésico (KRAEMER et al., 2010), nem reduziu os parâmetros de alodinia e hiperalgesia mecânica observados em modelos de dor inflamatória em camundongos (KNIGHTS; GENTRY; BEVAN, 2012). Em nosso estudo anterior com o modelo de lesão muscular traumática (KUDSI et al., 2020), o diclofenaco monossódico a 1% não reduziu parâmetros de alodinia mecânica e ao frio e o escore de nocicepção. Por outro lado, o diclofenaco monossódico a 1% teve efeito anti-inflamatório e reduziu a produção de compostos oxidantes (KUDSI et al., 2020). Além disso, o tratamento com diclofenaco pode vir associado ao desenvolvimento de efeitos adversos, tais como hepatotoxicidade, nefrotoxicidade e cardiotoxicidade, limitando seu uso a longo prazo (KISHIDA et al., 2012; AHMED; GAD; EL-RAOUF, 2017; ABDEL-DAIM et al., 2018). Dessa forma, é necessário a procurar de novos alvos terapêuticos para tratamentos mais eficazes na dor musculoesquelética.

3.9 MODELOS PRÉ-CLÍNICOS DE DOR MUSCULOESQUELÉTICA

Muitas condições clínicas que incluem dores musculoesqueléticas como fibromialgia, síndrome de dor complexa regional, lombalgia, dor miofascial têm maior prevalência em mulheres (QUEME; JANKOWSKI, 2019). Além disso, as mulheres também costumam relatar maior comprometimento funcional em comparação aos homens (QUEME; JANKOWSKI, 2019). Embora as diferenças entre os sexos na epidemiologia da dor musculoesquelética são conhecidas por algum tempo, só recentemente os estudos começaram a se concentrar nessas diferenças em múltiplas condições de dor musculoesquelética ou em modelos animais. A maioria dos estudos anteriores muitas vezes se concentraram apenas no sexo masculino ou em modelos pré-clínicos utilizando apenas ratos ou/e camundongos machos. Além disso, poucos estudos centraram-se nos mecanismos básicos da dor musculoesquelética ou na sua transição para a dor crônica (QUEME; JANKOWSKI, 2019).

Em modelos pré-clínicos, a dor musculoesquelética têm sido estudadas por meio de múltiplas abordagens, tanto em termos de indução e mensuração da dor como avaliação de tratamentos para melhor resolução do estado inflamatório e doloroso. A dor musculoesquelética é comumente estudada em músculos como o gastrocnêmio (SILVEIRA et al., 2016; KUDSI et al., 2020), masseter (WANG et al., 2017) e o tibial (FANG et al., 2020). Assim até o momento, há vários modelos de hiperalgesia muscular como métodos que dependem da aplicação de compostos nocivos ao tecido muscular (RO et al., 2009; ASGAR et al., 2015), métodos que utilizam exercícios físicos (RETAMOSO et al., 2013), métodos que apresentam modelos pós-incisionais (SUGIYAMA et al., 2017; SUGIYAMA; KANG; BRENNAN, 2017) e métodos que causam lesões musculares traumáticas (KUDSI et al., 2020).

Os métodos que dependem da aplicação de compostos nocivos ao tecido muscular incluem a administração intramuscular no músculo masseter de forma unilateral ou bilateral de ACF (Adjuvante completo de Freud), Carragenina (polissacarídeo de algas), capsaicina (agonista TRPV1), óleo de mostarda (agonista TRPA1), NMDA (N-metil D-Aspartato, agonista glutamatérgicos), $\alpha\beta$ meATP (a, β -metileno-ATP, agonista purinérgico P2X), DPHG (3,5-dihidroxifenilglicina, agonista dos receptores metabotrópicos de glutamato, específico para mGluR5), PMA (ativador da PKC) (RO; LEE; ZHANG, 2009; LEE et al., 2012; SALOMAN; CHUNG; RO, 2013; SIMONIC-KOCIJAN et al., 2013; ASGAR et al., 2015; CHUNG et al., 2016;

WANG et al., 2017; BAI; ZHANG; ZHOU, 2018; WANG et al., 2018). O ACF contém *Mycobacterium tuberculosis* inativado pelo calor e é um composto inflamatório padrão que vem sendo usado para induzir inflamação em diferentes modelos animais devido à ativação de mastócitos, infiltração de leucócitos e produção de radicais livres e citocinas circulatórias (MCCARSON e FEHRENBACHER, 2021). A carragenina é um polissacarídeo sulfatado extraído principalmente de algas e é um composto algogênico amplamente utilizado devido a sua habilidade de induzir inflamação aguda e edema (MCCARSON e FEHRENBACHER, 2021). A capsaicina é um composto que está presente na pimenta vermelha e tem propriedade pungente além de ser um agonista TRPV1. O óleo de mostarda é formado pelos grãos de mostarda e tem ação agonista ao receptor TRPA1. O NMDA é um aminoácido excitatório de receptores glutamatérgicos. O $\alpha\beta$ meATP é um metabólito liberados como subprodutos da contração muscular e tem ação em receptores purinérgicos como P2X (GREGORY; WHITLEY; SLUKA, 2015).

Além disso, há estudos sobre a administração intramuscular no músculo gastrocnêmio de H₂O₂, carragenina e solução salina ácida (WALDER et al., 2012; FUJII et al., 2008; SUGIYAMA et al., 2017), além da administração de ACF no músculo tibial (FANG et al., 2019). Esses métodos de aplicação de compostos algogênicos são usados para produzir hipersensibilidade muscular. Além disso, quase todos os protocolos descrevem anestesia prévia antes da administração dessas substâncias. Notavelmente, em cada um desses modelos, os comportamentos de nocicepção duram substancialmente mais do que alterações inflamatórias ou histológicas no músculo afetado.

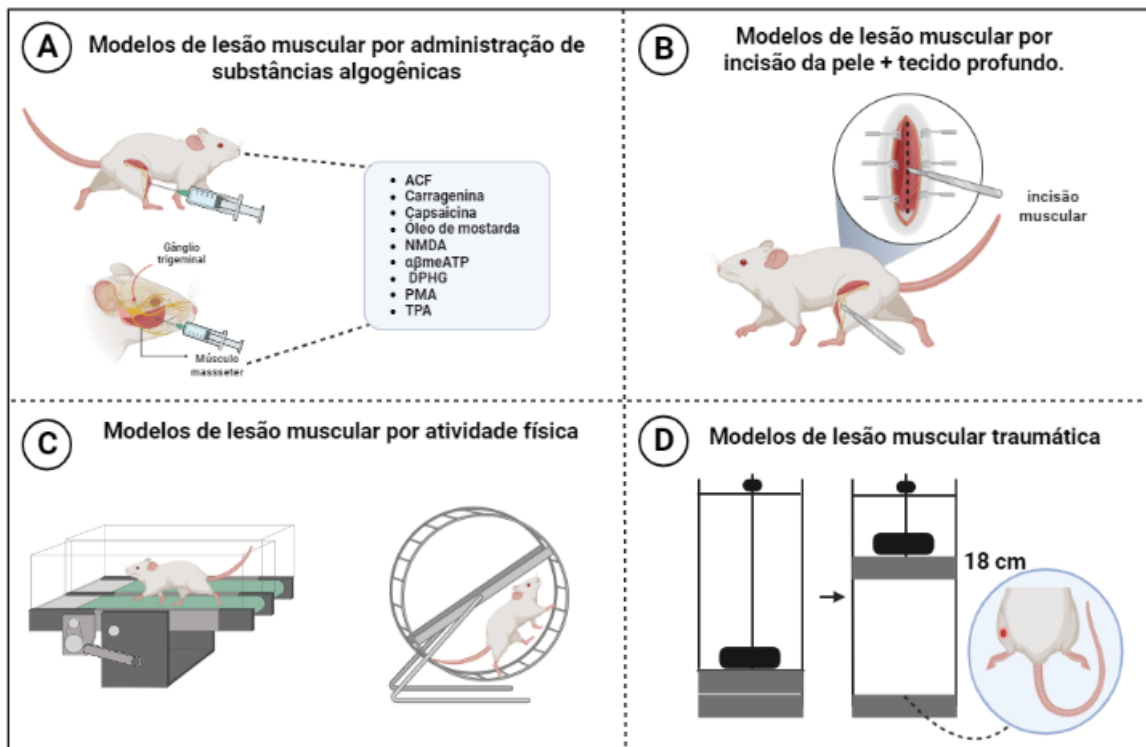
Os métodos que utilizam atividade muscular têm boa validade de face para a indução de dor musculoesquelética como muitas condições musculares dolorosas resultam de danos durante o uso ou demonstram a exacerbação da dor com a atividade (RETAMOSO et al., 2013). Os métodos mais utilizados são o uso de esteira rolante e da esteira de roda para protocolos de exercícios excêntricos (RETAMOSO et al., 2013). Os métodos que apresentam modelos incisionais também investigam a hiperalgesia muscular como a incisão em tecidos musculares como músculo gastrocnêmio e tibial dessa forma apresentam hipersensibilidade mecânica, térmica e aumento da do score facial (SUGIYAMA et al., 2017).

Além disso, o modelo de lesão muscular traumática que foi idealizado pela primeira vez em 2006 por Rizzi e colaboradores (RIZZI et al., 2006). Nesse método é

utilizado um equipamento do tipo prensa com peso e altura determinadas. O animal é levemente sedado e colocando de forma posição dorsal onde o membro posterior direito ou esquerdo do animal deve ser colocado no meio do aparelho. A barra de metal deve ser arrastada a uma altura de 18 cm e após deve ir ao encontro do músculo gastrocnêmio causando uma lesão por trauma simulando uma lesão por contusão (RIZZI et al., 2006).

A maioria dos modelos de hiperalgesia muscular não idealizam o que acontece na clínica e a avaliação de parâmetros nociceptivos acabam sendo realizados ainda durante a ação de anestésicos causando um grande viés no modelo experimental. Os modelos de administração de substâncias algogênicas não tem padronização do volume e dose das substâncias aplicadas e há muitas controvérsias em estudos publicados. Desse modo, o modelo de lesão muscular traumática que foi idealizado pelo Rizzi et al. (2006) vem sendo utilizado em outras pesquisas (HAUPENTHAL et al., 2020; KUDSI et al., 2020). Esse modelo de lesão muscular é um modelo de manuseio fácil e a indução da lesão que idealiza uma lesão tipo contusão, dessa forma a anestesia pode ser administrada em doses menores e de curta duração, evitando assim a morte dos animais e evitando interferências nas mensurações da nocicepção e também alterações bioquímicas. Esse modelo causa aumento dos parâmetros nociceptivos e inflamatórios sem impacto na atividade locomotora (KUDSI et al., 2020).

FIGURA 8 – Principais modelo pré-clínicos que avaliam a hipersensibilidade musculoesquelética.



Legenda: Os principais modelos pré-clínicos que avaliam a hipersensibilidade musculoesquelética. A) modelos de lesão muscular por administração de substâncias algogênicas como ACF (adjuvante completo de Freud), carragenina, capsaicina (agonista TRPV1), óleo de mostarda (agonista TRPA1), N-metil D-Aspartato (NMDA, agonista glutamatérgico), α , β -metileno-ATP ($\alpha\beta\text{meATP}$, agonista P2X), 3,5-dihidroxifenilglicina (DPHG, agonista dos receptores metabotrópicos de glutamato, específico para mGluR5), ativador da PKC (PMA) e 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA); B) modelos de lesão muscular por atividade física; C) modelos de lesão muscular por incisão muscular; D) Modelos de lesão muscular traumática. Fonte: Do autor (2023).

3.10 RECEPTORES DE POTENCIAL TRANSITÓRIO (TRPs)

A superfamília de canais TRPs foi inicialmente descrita em fotorreceptores de moscas do gênero *Drosophila*, caracterizados como canais catiônicos não seletivos presentes nos mais variados tipos de células e tecidos (KOIVISTO et al., 2022). Os TRPs são canais catiônicos não seletivos e podem ser ativados de várias maneiras como ligação do ligante, por voltagem, mudanças de temperatura e a modificação covalente de aminoácidos nucleofílicos (SPEKKER; KÖRTÉSI; VÉCSEI, 2022; KOIVISTO et al., 2022). Uma vez ativados, podem causar a despolarização da membrana celular e também contribuem para o transporte transcelular de muitos cátions, uma vez que têm seletividade e permeabilidade para cátions monovalentes

como sódio e para cátions divalentes como magnésio e/ou cálcio levando a uma ampla gama de respostas celulares (DUAN et al., 2018; SPEKKER; KÖRTÉSI; VÉCSEI, 2022; KOIVISTO et al., 2022).

Os canais TRPS respondem a um amplo espectro de estímulos como mecânicos, químicos (agentes irritantes), térmicos. Além disso, estão envolvidos em vários processos fisiológicos, incluindo mecanossensação, nocicepção, termossensação, mediação da liberação de citocinas e neuropeptídeos como substância P e CGRP. (SPEKKER; KÖRTÉSI; VÉCSEI, 2022; KOIVISTO et al., 2022). Nos mamíferos, os canais TRPs são classificados em seis subfamílias com base em sua homologia na sequência de aminoácidos sendo designadas como: canônico (TRPC1 ao TRPC7), vaniloide (TRPV1 ao TRPV6), melastatina (TRPM1 ao TRPM8), policistina (TRPP1 ao TRPP5), mucolipina (TRPML1 ao TRPML3) e anquirina (TRPA1) que será o receptor de estudo neste trabalho (MAGLIE et al., 2021; KOIVISTO et al., 2022) (Figura 9).

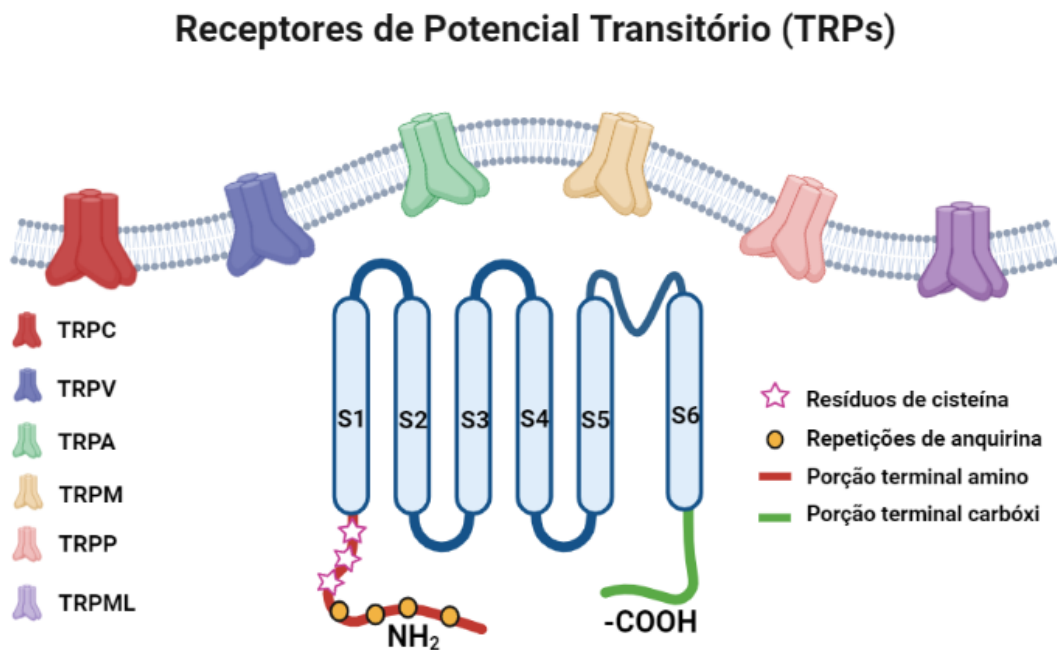
Estes canais iônicos possuem uma estrutura complexa e comum entre as seis subfamílias como a apresentação de seis domínios transmembranas (S1-S6) e regiões de comprimento variável nas porções intracelulares como amino-(NH₂) e carboxi-(COOH) (OWSIANIK et al., 2006; ZHAO; MCVEIGH; MOISEENKOVA-BELL, 2021). Além disso, todos os canais TRPs possuem dois domínios de poros localizados entre S1-S4 que formam domínios de detecção periférica e a S5-S6 que formam um tetrâmero criando poro central para a passagem de cátions (KOIVISTO et al., 2022). A maioria dos TRPs são objetos de estudo para a descoberta e desenvolvimento de medicamentos assim como podem exercer papéis complexos no desenvolvimento e progressão de condições e/ou doenças clínicas (KUDSI et al., 2022; KOIVISTO et al., 2022).

A capsaicina é um agonista do TRPV1, primeiro canal TRP descoberto por Caterina e colaboradores em 1997, que ajuda a aliviar a dor quando usada na quantidade e frequência certas (FATTORI et al., 2016; KOIVISTO et al., 2022). Atualmente, há formulações semissólidas (cremes, pomadas e géis) contendo capsaicina são usados há muito tempo para tratar infecções neuralgia pós-herpéticas, neuropatia diabética, dores musculares e artrite reumatoide (MASON et al., 2004; KOIVISTO et al., 2022). Fang e colaboradores observaram que o tratamento tópico com capsaicina reduziu a hiperalgesia muscular (FANG et al., 2020). No entanto, o uso prolongado de capsaicina pode aumentar o risco de carcinogênese da pele,

especialmente quando usado em combinação com promotores tumorais (SERAFINI et al., 2018; KOIVISTO et al., 2022).

Os TRPs representam um sério desafio para o desenvolvimento de medicamentos devido à dificuldade de obter especificidade suficiente para uma intervenção clinicamente útil sem efeitos colaterais inaceitáveis (KUDSI et al., 2022; KOIVISTO et al., 2022). Dessa forma, antagonistas TRPA1 parecem ser um alvo em potencial para o desenvolvimento de fármacos e não há dados que possam causar efeitos adversos graves.

FIGURA 9 – Os receptores de potencial Transitório (TRPs)



Legenda: Os receptores de potencial transitório (TRP) consiste em 6 subfamílias e apresenta uma estrutura complexa e comum entre os membros da superfamília. A estrutura apresenta 6 domínios transmembrana, uma porção amino e carbóxi terminal. Além disso, todos tem a presença de resíduos de aminoácidos como cisteína/lisina e proteínas periféricas ou ligantes como as repetições de

anquirina. Entretanto, o canal TRPA1 possui maiores repetições de anquirina em comparação aos demais TRPs. Fonte: Do autor (2023).

3.11 TRPA1 E SEU PAPEL NA DOR MUSCULOESQUELÉTICA

O receptor de potencial transitório, TRPA1, ou conhecido antigamente como proteína com domínio transmembrana semelhante a anquirina 1 (ANKTM1, do inglês, *Ankyrin-Like With Transmembrane Domains 1*) (JORDT et al., 2004; LANDINI et al., 2022). O receptor foi encontrado em fibroblastos de pulmão fetal em 1999 por Jaquemar e colaboradores (JAQUEMAR et al., 1999; LANDINI et al., 2022). O nome “anquirina” se deve pelo receptor possuir entre 14 a 18 repetições de anquirina ao longo da sua terminação amino terminal, embora a maioria dos canais TRPs possuem 3 a 4 repetições de anquirina em sua estrutura, e o algarismo 1 se deve pelo canal ser o único encontrado em mamíferos (PAULSEN et al., 2015; WEI et al., 2022).

O canal TRPA1 é um canal não seletivo a cátions, porém tem maior preferência a íons cálcio e outros íons monovalentes e divalentes. Esse receptor compreende uma estrutura tetramérica complexa onde cada subunidade do TRPA1 tem 1119 resíduos de aminoácidos e possui uma longa porção amino terminal intracelular com 719 aminoácidos caracterizados por múltiplos domínios de anquirina e conforme a semelhança com outros membros TRPs possui seis domínios transmembranas (S1-S6), uma porção C-terminal intracelular curta e uma porção N-terminal intracelular longa (VIANA, 2016; TALAVERA et al., 2020).

A expressão de TRPA1 ocorre a nível neuronal e não neuronal. Em nível neuronal, o TRPA1 é expresso no GRD e GT (DE LOGU et al., 2019; TIAN et al., 2020; TAKIZAWA et al., 2018). Em nível não neuronal, tem expressão em mastócitos, queratinócitos, células dendríticas, células endoteliais vasculares, melanócitos, sinoviócitos, células ciliadas da orelha interna, células de Schwann, oligodendrócitos e astrócitos. Além disso, em vários estudos se relata a coexpressão de TRPA1 com TRPV1 em neurônios sensoriais primários peptidérgicos (BAUTISTA et al., 2006; LANDINI et al., 2022). A ativação do TRPA1 nesses neurônios promove a liberação de neuropeptídeos vasoativos e pró-inflamatórios, substância P (SP) e o peptídeo relacionado ao gene de calcitonina (CGRP) dos terminais centrais e periféricos,

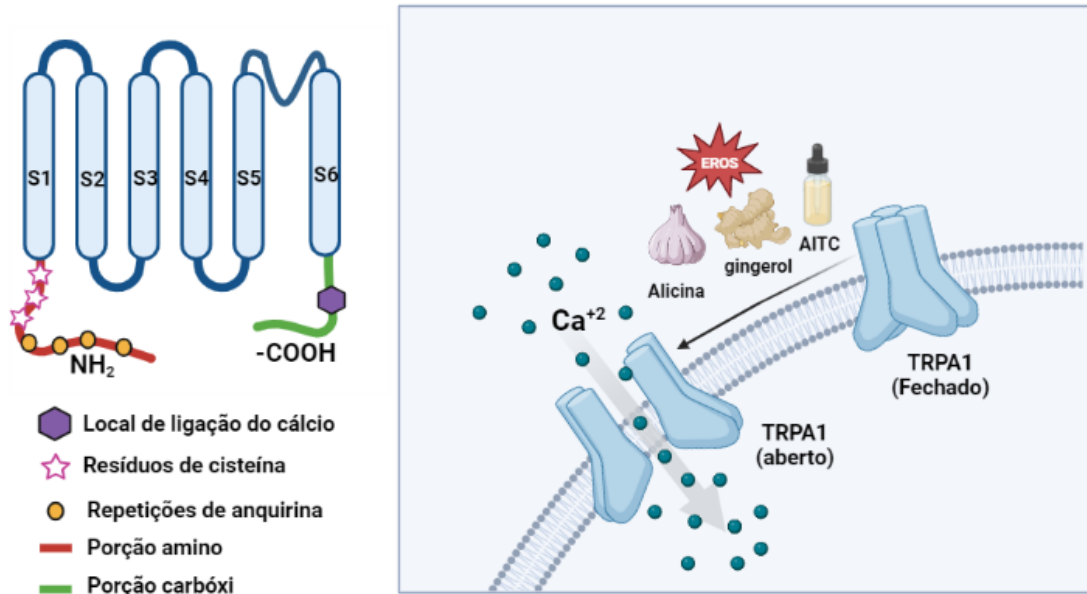
promovendo assim inflamação neurogênica (TREVISAN et al., 2016; DE LOGU et al., 2019; LANDINI et al., 2022).

O TRPA1 pode ser ativado por irritantes químicos, como cinamaldeído (encontrado na canela), alicina (encontrado no alho e/ou cebola), alil isotiocianato (AITC, encontrado no óleo de mostarda), carvacrol (encontrado no orégano), gingerol (encontrado gengibre) e timol (encontrado no tomilho e/ou orégano). Além disso, pode ser ativado por subprodutos do estresse oxidativo, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), produtos de peroxidação lipídica (4-HNE) e fosfolípidios (OXPAFC) (OEHLER et al., 2017; WEI et al., 2022). Alguns derivados do ácido araquidônico, como prostaglandinas também podem ativar diretamente o TRPA1 (MATERAZZI et al., 2008; LANDINI et al., 2022).

Vários estudos demonstraram que o TRPA1 está associado a processos dolorosos em várias patologias como na esclerose múltipla (DALENOGARE et al., 2022), no câncer (ANTONIAZZI et al., 2019), fibromialgia (GARCIA MENDES et al., 2021) e entre outros. Em publicações anteriores, foi sugerido que o TRPA1 poderia desempenhar papéis fisiológicos como na nocicepção térmica aguda (STORY et al. 2003), mecanotransdução de células ciliadas (COREY et al. 2004) e nocicepção química (BANDELL et al., 2004; JORDT et al., 2004). Estudos anteriores mostraram que o TRPA1 está envolvido na nocicepção em processos inflamatórios e neuropáticos (NASSINI et al., 2014; LANDINI et al., 2022; KUDSI et al., 2022).

FIGURA 10 – O Receptor de Potencial Transitório Anquirina 1 (TRPA1).

Receptor de Potencial Transitório de Anquirina 1 (TRPA1)



Legenda: Estrutura do receptor de potencial transitório (TRPA1). O TRPA1 é ativado por substâncias como gingerol (presente no gengibre), Isotiocianato de alila (AITC, presente no óleo de mostarda), alicina (presente no alho), espécies reativas de oxigênio (EROS) e entre outros. A ativação do canal TRPA1 leva ao influxo de cálcio. Fonte: Do autor (2023).

A expressão do receptor TRPA1 em tecido muscular já foi avaliada em diferentes modelos de hiperalgesia muscular como modelo de incisão do tecido profundo, administração de substâncias nocivas ou algogênicas intramusculares, em estudos *in vitro* e estudos *ex vivo* (SUGIYAMA et al., 2017a; SUGIYAMA et al., 2017b; OSTERLOH et al., 2016; XING; LI, 2017; RO; LEE; ZHANG, 2009). Em modelos de incisão de tecido profundo, observou-se que a administração de H₂O₂, um agonista TRPA1, no músculo gastrocnêmio causou comportamento nociceptivo que foi bloqueado por antagonismo TRPA1 intramuscular em ratos e camundongos (AP18 ou HC-030031) ou por deleção genética TRPA1 em camundongos (SUGIYAMA; KANG; BRENNAN, 2017; SUGIYAMA et al., 2017). O comportamento de guarda após a incisão de pele e do tecido profundo foi reduzida após a administração intraperitoneal de HC-030031. No entanto, o tratamento com HC-030031 não afetou as respostas mecânicas ou térmicas após a incisão. As EROs aumentaram após incisão de pele e do tecido profundo tanto no músculo incisado quanto na pele. Os níveis de H₂O₂ tecidual também aumentou tanto na pele quanto no músculo após a incisão (SUGIYAMA; KANG; BRENNAN, 2017).

Em modelos de administração de ACF (Adjuvante Completo de Freud) em músculo masseter, Wang e colaboradores (2018) investigaram o papel do TRPA1 na nocicepção espontânea de camundongos C57BL/6 ou em camundongos com deleção gênica para TRPA1. Após a administração de ACF, foi aplicado AP-18, antagonista TRPA1, e este composto reduziu o escore facial. Além disso, foi observado efeito similar em camundongos com deleção gênica para TRPA1 após a administração de ACF (WANG et al., 2018). Além disso, Ro e colaboradores (2009) observaram por imunohistoquímica a expressão de TRPA1 e TRPV1 em aferentes musculares do músculo masseter (RO; ZHANG; LEE, 2009).

Lee e colaboradores (2012) administraram N-metil-D-aspartato (NMDA), um agonista dos receptores de glutamato, no músculo masseter de ratos levemente anestesiados para indução da nocicepção mecânica. A nocicepção mecânica induzida pela administração de NMDA foi prevenida pelo pré-tratamento local com o antagonista NMDAR (AP5), com o inibidor da CaMKII KN93, com o inibidor da PKC GF109203X e com o inibidor da PKA KT5720. O pré-tratamento do músculo masseter com o antagonista do TRPV1 AMG9810 (100 nmol/sítio) também reduziu a nocicepção induzida por NMDA, mas não bloqueou a hipersensibilidade mecânica causada pelo óleo de mostarda (agonista do TRPA1). O TRPV1 também é expresso em 32% dos aferentes do gânglio trigeminal no músculo masseter. Através de técnicas de co-immunoprecipitação, o NMDA causa a intensificação do influxo de cálcio mediado por capsaicina, mostrando a interação funcional entre esses receptores (LEE et al., 2012).

Em modelos de administração intramuscular de α - β -meATP, metabólito produzido pela contração muscular, Asgar e colaboradores (2015) descreveram que a administração de α - β -meATP no músculo masseter induziu nocicepção em ratos levemente anestesiados, que foi prevenida pelo pré-tratamento com antagonistas TRPA1 (AP18 - 200 nmol/sítio ou HC-030031 - 50 nmol/sítio). De forma similar, a administração de AP18 (1 μ mol/sítio) ou HC-030031 (50 nmol/sítio) reduziram a nocicepção do músculo masseter induzida por NMDA. Os autores também demonstraram que a administração de ACF no músculo masseter induziu hipersensibilidade mecânica, respostas nociceptivas espontâneas e regulação positiva significativa da expressão do TRPA1 em gânglios trigeminiais. Esses comportamentos nociceptivos foram revertidos pelo pós-tratamento intramuscular com AP18 (2 μ mol) (ASGAR et al., 2015).

Em estudos *in vitro*, Osterloh e colaboradores (2016) observaram que o TRPA1 pode regular os processos de reparo muscular em mioblastos humanos e que seus níveis de mRNA para TRPA1 diminuem após a diferenciação. Além disso, o influxo transitório de Ca^{2+} é essencial para iniciar a diferenciação, e os níveis constantemente elevados de Ca^{2+} devido à ativação do TRPA1 podem interromper a sinalização intracelular eficiente (OSTERLOH et al., 2016).

Em estudos *ex vivo*, Mallin e colaboradores (2011) demonstraram que a expressão funcional de TRPA1 é significativamente maior nos neurônios dos gânglios da raiz dorsal que inervam o músculo esquelético do que nos neurônios dos GDR que inervam a pele (MALLIN et al., 2011). Além disso, estudos anteriores registraram correntes induzidas por AITC, agonista TRPA1, com ativação de TRPA1 em neurônios DRG de ratos inervando a porção branca dos músculos gastrocnêmio identificados por marcação retrógrada com o corante fluorescente Dil (XING; LI, 2017).

A partir desses dados, há grandes indicativos que TRPA1 pode participar na hiperalgesia muscular, dessa forma, nosso trabalho tem o objetivo de avaliar se a aplicação tópica do antagonista TRPA1 (HC-030031) poderia reduzir a nocicepção, inflamação e produção de compostos oxidantes em um modelo de lesão muscular traumática em ratos. Até o momento os antagonistas do canal TRPA1 não conseguiram passar para etapas finais de estudos clínicos devido a problemas relacionados a sua biodisponibilidade e baixa absorção por via oral. Por outro lado, a aplicação tópica de antagonistas do receptor TRPA1 poderia ter efeito local causando analgesia em diferentes tipos de dor restrita ao local da lesão (KOIVISTO et al., 2022). Dessa forma, estudos anteriores descrevem que a administração tópica na pele com o composto HC-030031 (um antagonista seletivo do TRPA1) causou efeito antinociceptivo, anti-inflamatório e antioxidante em modelos de lesão por queimadura solar e térmica (ANTONIAZZI et al., 2018; FIALHO et al., 2020). Neste sentido, como a lesão traumática muscular causa dor e inflamação seria interessante testar o efeito de um antagonista deste receptor neste modelo (HAUPENTHAL et al., 2020; KUDSI et al., 2020).

4 DESENVOLVIMENTO

4.1 MANUSCRITO CIENTÍFICO

Os resultados inseridos nesse trabalho de dissertação de mestrado apresentam-se sob a forma de manuscrito científico, o qual se encontra submetido no periódico intitulado *Inflammopharmacology*. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências encontram-se no próprio manuscrito.

Topical application of a TRPA1 antagonist reduced nociception and inflammation in a model of traumatic muscle injury in rats

Sabrina Qader Kudsi¹, Caren Tatiane de David Antoniazzi¹, Camila Camponogara², Graziela Moro Meira¹, Marcella de Amorim Ferreira⁵, Ana Merian da Silva⁵, Diéssica Padilha Dalenogare¹, Rubya Zaccaron⁴, Carolina dos Santos Stein³, Paulo Cesar Lock Silveira⁴, Rafael Noal Moresco³, Sara Marchesan Oliveira², Juliano Ferreira⁵, Gabriela Trevisan^{1,*}.

¹Graduate Program in Pharmacology, Federal University of Santa Maria (UFSM), 97105-900 Santa Maria (RS), Brazil.

²Graduate Program in Biological Sciences: Toxicological Biochemistry, Federal University of Santa Maria (UFSM), 97105-900 Santa Maria (RS), Brazil.

³Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Maria (UFSM), 97105-900 Santa Maria (RS), Brazil.

⁴Graduate Program in Health Science, University of the Extreme South of Santa Catarina (Unesc), 88806-000 Criciúma (SC), Brazil.

⁵Graduate Program in Pharmacology, Federal University of Santa Catarina (UFSC), 88037-000 Florianópolis (SC), Brazil.

*Corresponding author: Gabriela Trevisan, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Avenida Roraima, 1000, building 21, room 5207, Zip code: 97105-900 Santa Maria (RS), Brazil, Phone: +55 55 32208976, Email: gabrielatrevisansantos@gmail.com or gabriela.trevisan-santos@ufsm.br

Abstract

Musculoskeletal pain is a widely experienced public healthcare issue, especially after traumatic muscle injury. Besides, it is a common cause of disability, but this pain remains poorly managed. However, the pathophysiology of traumatic muscle injury-associated pain and inflammation has not been fully elucidated. In this regard, the transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) has been studied in inflammatory and painful conditions. Thus, this study aimed to evaluate the antinociceptive and anti-inflammatory effect of the topical application of a TRPA1 antagonist in a model of traumatic muscle injury in rats. The mechanical trauma model was developed by a single blunt trauma impact on the right gastrocnemius muscle of *Wistar* male rats (250–350 g). The animals were divided into four groups (Sham/vehicle; sham/HC-030031 0.05%; injury/vehicle, and injury/HC-030031 0.05%) and topically treated with a Lanette® N cream base containing a TRPA1 antagonist (HC-030031, 0.05%; 200 mg/muscle) or vehicle (Lanette® N cream base; 200 mg/muscle) was applied at 2, 6, 12, 24, and 46 h after muscle injury. Furthermore, we evaluated the contribution of the TRPA1 channel on nociceptive, inflammatory, and oxidative parameters. The topical application of TRPA1 antagonist reduced biomarkers of muscle injury (lactate/glucose ratio), spontaneous nociception (rat grimace scale), inflammatory (inflammatory cells infiltration, cytokine levels, myeloperoxidase, and N-acetyl- β -D-glucosaminidase activities), oxidative (nitrite levels and dichlorofluorescein fluorescence) parameters, and mRNA *Trpa1* levels in the muscle tissue. Thus, these results demonstrate that TRPA1 may be a promising anti-inflammatory and antinociceptive target in treating muscle pain after traumatic muscle injury.

Perspective: This article presents the topical application of a TRPA1 antagonist to reduce nociception and inflammation in a model of traumatic muscle injury in rats. Our findings suggest new therapeutic strategies for the treatment of inflammatory muscle pain by using TRPA1 antagonists by topical application.

Keywords: Muscle pain. HC-030031. TRP channels. Myalgia. Inflammation.

Chemical compound studied in this article: HC-030031 (PubChem CID: 1150897).

Abbreviations list: ANOVA, Analysis of Variance. BL, Baseline. CK, Creatine Kinase. DCF, Dichlorofluorescein. DCFH-DA, 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate. Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase, GAPDH. Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyltransferase, HPRT. Interleukin-1 beta, IL-1 β . IL-6, Interleukin-6. MPO, Myeloperoxidase. NAGase, N-acetyl- β -D-glucosaminidase. NSAIDs, Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs. NO, Nitric Oxide. OD, optical density. SEM, Standard Error of the Mean. TRP, Transient receptor potential. TRPA1, Transient Receptor Potential Ankyrin 1. TRPV1, Transient Receptor Potential Vanilloid 1. RGS, Rats Grimace Scale.

1 INTRODUCTION

Musculoskeletal pain is the most prevalent type of inflammatory pain and the second leading reported cause of disability worldwide (Ruela et al. 2022; Seminowicz et al. 2022). According to the World Health Organization (WHO), about 1.71 billion people have musculoskeletal disorders, causing a significant limitation in the execution of movements and ability, reflecting the reduction of the individual's well-being (Ruela et al. 2022). In addition, its treatment is complex and difficult in the clinic. Musculoskeletal pain can be present in various diseases such as fibromyalgia (Brum et al. 2020), multiple sclerosis, osteoporosis, cancer, and Parkinson's disease (Perrot et al. 2019). Besides, muscle pain can be caused by injuries from indirect (ischemia or neurological damage) and direct trauma (sprains, contusions, sprains, and lacerations). Accounting for 90% of cases, the most common muscle injuries are sprains, sprains, and contusions (Fernandes et al. 2011; Gane et al. 2018).

After mechanical trauma, skeletal muscle can regenerate and remodel, and this process involves repair, inflammation, pain, regeneration, and fibrosis (Liu et al. 2018; Yang and Hu 2018). In repair, the activation of the complement system is important for inflammatory response considered the first sensor of muscle damage (Yang and Hu 2018). Thus, from activation of the complement system, it promotes the infiltration of inflammatory cells, therefore releasing inflammatory cytokines closely related to the overproduction of oxidative compounds (Liu et al. 2018). Then, the inflammatory and oxidative process caused by muscle injury may directly activate or increase the sensitivity of receptors by enhanced protein expression, including the transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) (Camponogara et al. 2020; Landini et al. 2022).

TRPA1 is a nonselective cation channel member of the TRP superfamily, and it is mainly found in sensory neurons that coexpressed the TRP vanilloid 1 (TRPV1, the capsaicin receptor) (Landini et al. 2022, Parenti et al. 2016). This channel is activated by endogenous inflammatory mediators such as hydrogen peroxide (H₂O₂), 4-hydroxynonenal (4-HNE), and nitric oxide (NO) (Parenti et al. 2016, Talavera et al. 2019). Besides, this channel can be a

sensor and regulator of diverse inflammatory and painful processes (Camponogara et al., 2020; Koivisto et al. 2022). However, until now no TRPA1 antagonists have completed phase III clinical trials because of bioavailability/pharmacokinetics issues. Thus, topical administration with these compounds could be an interesting alternative for the treatment of local pain (Koivisto et al. 2022). Recently, it was shown that the topical treatment with a TRPA1 antagonist (HC-030031) reduced nociceptive, inflammatory, and oxidative parameters in models of thermal lesions or sunburn (Antoniazzi et al., 2018; Fialho et al. 2020). Thus, as traumatic muscle injury often causes local pain and inflammation it would be interesting to investigate the relevance of this channel in this type of pain (Dos Santos Haupenthal et al. 2020, Kudsi et al. 2020).

In previous studies, it was observed that the administration of H₂O₂, a TRPA1 agonist, in the gastrocnemius muscle caused nociceptive behavior that was blocked by intramuscular TRPA1 antagonism in rats and mice (AP18 or H-030031) or TRPA1 genetic deletion in mice (Sugiyama et al. 2017a, b). Besides, our research group showed that a model of traumatic muscle injury in rats caused nociceptive and inflammatory parameters in rats (Kudsi et al. 2020). In this model, after muscle damage, there is also an increase in the production of oxidative compounds, which could cause TRPA1 activation (Dos Santos Haupenthal et al. 2020; Kudsi et al. 2020). In this view, the goal of this study was to evaluate if the topical application of HC-030031 reduces nociception and inflammation in a model of traumatic muscle injury in rats.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Drugs

The TRPA1 antagonist, HC-030031 0.05%, and dimethyl sulfoxide (DMSO) 5% were acquired from Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). The Lanette® N cream base was purchased from Farmácia Escola (Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Brazil). Isoflurane (Baxter, Sao Paulo, Brazil), xylazine (Syntecvet, Sao Paulo, Brazil), and ketamine (Syntecvet, Sao Paulo, Brazil) were used. The enzyme-linked immunoassay kits for Interleukin-1 beta (IL-1 β) and Interleukin-6 (IL-6) were purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) and Invitrogen (Carlsbad, CA, USA), respectively. The primers were purchased for *Trpa1* and *housekeeping genes* such as *Hprt* and *Gapdh* from BioRAD® (Belo Horizonte, Brazil). The DNase I from Invitrogen®, High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit from Applied Biosystems®, and GoTaq® qPCR Master Mix from Promega®.

2.2 Animals

Adult male *Wistar* rats (250–350 g) were kept at 22 ± 2 °C under a 12 h/light-dark cycle and standard laboratory food and water *ad libitum*. All experiments were approved by the Ethics Committee on the Use of laboratory Animals of the Federal University of Santa Maria (CEUA, protocol #6579280218 and #8028131120) and conducted following Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments (ARRIVE) and the International Association for the Study of Pain (IASP) guidelines (McGrath and Lilley 2015). The animals were habituated in the experimental room for at least 1 h before behavioral assessments. Animals were randomly assigned to different treatment groups, and all experimental protocols were performed blindly concerning drug administration. Also, the experiments were performed and analyzed by operators blinded to the experimental groups and drug administration. The protocol for the traumatic muscle injury model in this study was performed in two experimental sets of animals

on separate days. After *in vivo* experiments, all the animals were anesthetized with 4% isoflurane solution and euthanized by exsanguination and blood, the right gastrocnemius muscle and dorsal root ganglia samples were removed to further biochemical, inflammatory, and oxidative analyses. The schematic figure of general experimental protocols is represented in Fig.1.

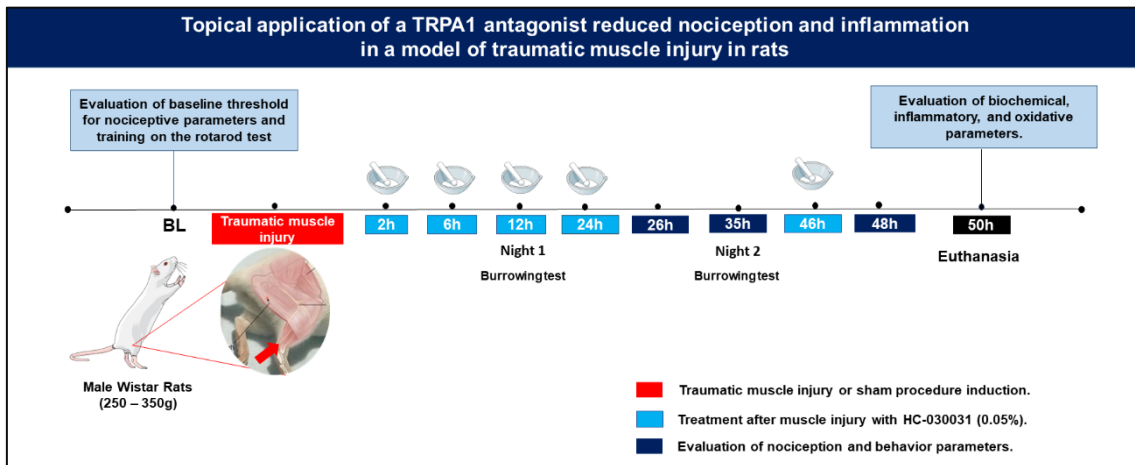


Fig. 1 Representative figure of the experimental protocol used in this study. The traumatic muscle injury model used a single blunt trauma impact on the right gastrocnemius muscle of *Wistar* male rats. The animals were topically treated with a Lanette® N cream base containing a TRPA1 antagonist (HC-030031 0.05% or vehicle), which was applied at 2, 6, 12, 24, and 46 h after muscle injury (200 mg/muscle). The nociceptive and behavior parameters were evaluated at 26 and 48h after muscle injury. The burrowing test was evaluated at night 1 (12 after muscle injury) and night 2 (35h after muscle injury). After 50 h, the animals were euthanized and samples of gastrocnemius muscle and dorsal root ganglion were removed for analysis.

2.3 Induction of traumatic muscle injury model

During a previous study (Kudsi et al., 2020), we established a non-invasive blunt injury model using a custom device based on an approach described by Rizzi et al. (2006) and by Dos Santos Haupenthal et al. (2020), which has been widely used in other research projects

(Dos Santos Haupenthal et al. 2020; Rizzi et al. 2006). This study confirmed that this approach caused substantial muscle injury without puncturing the skin or fracturing hindlimb bones. The animals were anesthetized with a 4% isoflurane solution, and then the procedure involved placing the animal with its right hind limb in a locked position on a platform. The platform was a press developed by the Industrial Center for Teaching and Research Equipment (CIDEPE/RS, BRAZIL). A 0.459 kg cylindrical weight was placed on a metal column 18 cm above the platform and temporarily held in place with a metal pin. The weight was released by pulling the column pin. The weight then fell on the rat's hind limb, specifically on the region of the gastrocnemius muscle. The kinetic energy of impact delivered was 0.811 J. Thus, the lesion was located in a specific area of interest, and Lanette cream containing 0.05% HC-30031 or vehicle (cream Lanette without HC-30031 0.05%) was applied throughout the affected region within 2, 6, 12, 24, and 46h after muscle injury in the quantity of 200 mg. Before muscle injury, the animals were previously shaved with the help of a hair trimmer machine. Then, a skinny layer of depilatory cream was applied and quickly removed to avoid allergic reactions in the animals. A sham procedure was also performed, only anesthetizing and shaving the animals without performing the muscle lesion. The nociceptive and behavioral parameters were measured at 26 and 48 h after traumatic muscle injury or sham procedure. Then, we used the same group of animals to perform all the analyses as described before, at 50h after muscle injury, and we still detected nociception, biochemical, inflammatory, and oxidative alterations (Kudsi et al. 2020).

2.4 Treatments

The animals were divided into four groups: sham/vehicle (no traumatic muscle injury plus Lanette[®] N cream base); sham/HC-030031 0.05% (no traumatic muscle injury plus Lanette[®] N cream base containing HC-030031 0.05%); injury/vehicle (traumatic muscle injury plus Lanette[®] N cream base), and injury/HC-030031 0.05% (traumatic muscle injury plus Lanette[®] N cream base containing HC-030031 0.05%). The treatment was topically applied

directly upon the lesion site on the gastrocnemius muscle in the quantity of 200 mg each day at 2, 6, 12, 24, and 46 h after the traumatic muscle injury model. The TRPA1 antagonist, HC-030031, was dissolved in 5% DMSO and incorporated into the Lanette® N cream base. The Lanette® Base cream was used as a vehicle and considered an acceptable standard cosmetically active emollient. A topical application does not cause pruritus and itching due to the release of pruritogenic mediators (Camponogara et al., 2020; Sakai et al. 2016).

2.5 Forced Locomotor activity and spontaneous nociception assessment

The forced locomotor activity was assessed by rotarod test and spontaneous nociception, by RGS score at 26 and 48 h after the traumatic muscle injury, as previously described in Kudsi et al. (2020). In addition, the Spontaneous nociception was also evaluated by the burrowing test, performed on night 1 (12h after muscle injury) and night 2 (35h after muscle injury) after the traumatic muscle injury (Deacon 2006; Rossato et al. 2018).

2.5.1 Rotarod test

The animals were trained in the apparatus on the day before the muscle injury induction or sham procedure. For the test, the animals were put to walk in the apparatus (520 × 525 × 580 mm) at a velocity of 26 rpm. This test evaluated the latency (for the first fall) and the number of falls 26 and 48 h after muscle injury. The latency was recorded for up to 60 s, and the number of falls was 60 s. The total test duration for each animal was 120 s (Kudsi et al. 2020).

2.5.2 Evaluation of rat grimacing pain behavior

We evaluated spontaneous nociception using the RGS method (Sotocinal et al. 2011). We assessed the animals' facial expressions at baseline and 26 and 48h after traumatic muscle injury. Using cameras to capture the facial image of the animals, we took screenshots of each rat's face for 1 minute. Three images were taken per camera approximately 20 seconds apart. A clear view of the front and side profile of the face was captured for each rat. After that, the images were placed in presentation software (Microsoft PowerPoint, version 15.0, Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA), and the order of the slides was randomized ([http://www.tusharmehta.com/powerpoint/randomslideshow/index .htm](http://www.tusharmehta.com/powerpoint/randomslideshow/index.htm)). Four action units were evaluated (orbital pinching, ear changes, nose/cheek flattening, and whiskers changes), and they were scored as '0' if not present, '1' if moderately present, or '2' if present (Sotocinal et al. 2011).

2.5.3 Burrowing test

Spontaneous pain behavior was also evaluated using the burrowing test (Deacon 2006; Rossato et al. 2018). The burrows apparatus were made from a white PVC tube (20 cm long and 100 mm in diameter), and one end of the tube was closed with a PVC plug. The open end of the tube was raised 30 mm by screwing two levelers through it, each 10 mm from the end, and spaced just under one quadrant of the tube. The following substrates were sequentially presented as food pellets (Nuvilab®) 800 g per tube for rats. The amount of burrowing activity was calculated and expressed as a percentage of basal burrowing. The animals were trained over four consecutive days (07:00 p.m. to 07:00 a.m.), and on the fifth day, the baseline measurement was acquired. On the first night, rats were placed in pairs in empty cages, and an empty burrow was inserted in the cage for habituation. On the second night, they were placed in cages in pairs and a burrow was inserted filled with 800 g of food pellets, and the rats were allowed to burrow overnight. On the third and fourth nights, the

animals were placed individually in cages, and a burrow was inserted, filled with 800 g of food pellets. After four days, the animals were individually placed in the cages to determine their baseline burrow level. All evaluation of burrowing behavior was conducted during the dark phase (07:00 p.m. to 07:00 a.m.). The baseline value was determined before muscle injury (24 h before injury), and new measurements were evaluated on night 1 (12h after muscle injury) and night 2 (35 h after muscle injury). The animals burrowing < 150 g of food pellets were excluded, and only one animal was removed because of this parameter (Deacon 2006; Rossato et al. 2018).

2.6 Biochemical, inflammatory, and oxidative parameters assessment

Fifty hours after the induction of traumatic muscle injury, the animals were anesthetized with 4% isoflurane solution and euthanized by exsanguination (Dos Santos Haupenthal et al. 2020). After the transcardial puncture, whole blood was collected and placed in tubes for serum and plasma collection. Blood samples were centrifuged at 1000 X g for 10 min. Gastrocnemius muscle (ipsilateral to injury) and dorsal root ganglia (ipsilateral and contralateral to injury) samples were removed to evaluate biochemical, inflammatory, and oxidative parameters and were processed separately for each analysis.

2.6.1 Determination of biomarkers of muscle injury using blood samples

Blood samples were collected by transcardiac puncture and transferred to clot activator and sodium fluoride tubes. Glucose and lactate levels were measured in plasma samples (Bioclin®, Belo Horizonte, Brazil), and creatine kinase (CK) activity was measured in serum samples (Wierner®, Rosario, Argentina). According to the manufacturer's instructions, all measurements were performed on the BS 380 automated system (Mindray®, Shenzhen, China). Data were presented as the ratio of glucose (mg/dL) per lactate (mg/dL) levels, or CK activity per international unit per liter (U/L).

2.6.2 *Inflammatory cells infiltration markers*

The gastrocnemius muscle samples were collected to measure the myeloperoxidase (MPO) and N-acetyl β -D-glucosaminidase (NAGase) activities (Camponogara et al. 2020). Gastrocnemius muscle samples were obtained and homogenized with a motor-driven homogenizer in sodium acetate buffer (80 mM, pH 5.4) containing 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB) and centrifuged at 16.000 \times g for 20 min, then the supernatant was collected. For the MPO activity assay, the supernatant was incubated with acetate buffer (80 mM, pH 5.4) and 3,3',5,5'-tetramethyl-benzidine (18.4 nM) at 37 °C for 10 min. The enzyme activity was assessed colorimetrically at 630 nm (Camponogara et al. 2019). For the NAGase activity measurement, the supernatant was incubated with 4-nitrophenyl N-acetyl- β -D-glucosaminide (2.25 nM) and citrate buffer (50 mM, pH 4.5) at 37 °C for 1 h. The reaction was read colorimetrically at 405 nm (Camponogara et al. 2020). The absorbance of all responses was measured in a Fisher Biotech Microkinetics Reader Bt 2000 microplate reader. The data are expressed as optical density (OD) per mL of sample.

2.6.3 *Histology*

Gastrocnemius muscle samples were placed in a conical tube with alfac solution (16:2:1 mixture of ethanol 80%, formaldehyde 40%, and acetic acid) for 14 – 16 h (Kudsi et al., 2020). Samples were embedded in paraffin wax, sectioned at 4 μ m, and stained with hematoxylin-eosin (H&E). We duplicated muscle tissue slides for each animal per group. After that, with the help of a camera attached to the microscope, we captured images of a representative histological field for counting inflammatory cells. After that, we chose one of the captures of one of the histological fields as a representative image of each group. A representative area was selected for qualitative analysis with a 200 x objective under an optical microscope (Eclipse 50i, Nikon, Melville, NY). The images were recorded with the Nikon (Sight DS-5 ML1, Melville, NY, USA). For the inflammatory cells count, random fields from H&E-

stained slides of 5 animals/groups were observed to quantify the presence of inflammatory cells in the connective tissue surrounding the gastrocnemius muscle vascular network, using NIH Image J 13.6 software (NIH, Bethesda, MD, USA) at a magnification of 200 ×. The data were expressed as the number of inflammatory cells per field (Camponogara et al. 2020; Kudsi et al. 2020).

2.6.4 Measurement of IL-1 β and IL-6 levels

The gastrocnemius muscle samples were homogenized and prepared according to Camponogara et al. (2019). The IL-1 β and IL-6 levels in the obtained supernatant were measured using a commercially available ELISA Kit from R&D Systems (Minneapolis, MN). The results were expressed in pg/mg of protein.

2.6.5 Nitrite levels

Nitrite levels were evaluated using the Griess nitrite test and estimated as the formed nitrite (NO₂⁻). Gastrocnemius muscle samples were incubated with Griess reagent for 20 min (18 - 22 °C), and the final absorbance was measured at 540 nm using a microplate reader. NO levels were expressed in mg/mL from the standard curve with different NaNO₂ concentrations (Dos Santos Haupenthal et al. 2020).

2.6.6 Measurement of DCF fluorescence

The assessment of intracellular reactive intermediate species in the gastrocnemius muscle was determined by measuring DCF fluorescence. Gastrocnemius muscle tissue samples were homogenized in Tris/HCl buffer (50 mM, pH 7.4) and centrifuged (1000 xg) at 4 °C for 10 min. The supernatant was incubated with Tris/HCl buffer (10 mM, pH 7.4) and 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) addition (1.87 mM) at 25 °C for 30 min in the dark

starting the reaction. The fluorescence spectrophotometer performed the DCF fluorescence measurement at 488 nm (excitation) and 525 nm (emission). The standard curve was performed from different DCF concentrations, and the results were expressed as mg DCF/mL sample (Dos Santos Hauptenthal et al. 2020).

2.6.7 Determination of TRPA1 mRNA levels after muscle injury

Total RNA samples from muscle gastrocnemius and dorsal root ganglion was isolated using PureLink™ RNA Mini kit (Invitrogen) and quantified using a Nanodrop ND-1000. cDNA was synthesized from 100 a 300 ng (muscle gastrocnemius) and 50 a 150 ng (dorsal root ganglion) of RNA, treated with DNase (RNase-free, Invitrogen) using High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Quantification of specific products was done using GoTaq® qPCR Master Mix (Promega) and double-stranded products were amplified using specific primers (Table 1) in StepOne™ equipment (Applied Bio-systems) with the following protocol: 10 min 95 °C, (15 s 95 °C, 1 min 60 °C) x 40 cycles. A final step was included to obtain the dissociation curve (15 s 95 °C, 1 min 60 °C, 15 s 95 °C). Threshold cycles (Ct) calculated by StepOne Software v 2.3 were normalized to the expression of the gene and were calculated by normalization with HPRT (hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase) and GAPDH (Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase). Relative amounts were calculated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Primer specificity in all samples was confirmed by single peak performances of PCR products in melt curve analysis (Livak and Schmittgen 2001). We analyzed the following RNA expression levels, and their specific primer sequences were described in table 1.

Table 1 Forward and reverse primers used on RT - qPCR assays and their respective sequences:

Gene	Sequence forward (5' - 3')	Sequence Reverse (5' - 3')	Accession number
<i>Trpa1</i>	TCCTATACTGGAAGCAGCGA	CTCCTGATTGCCATCGACT	NM_207608
<i>Gapdh</i>	TGCCACTCAGAAGACTGTGG	TTCAGCTCTGGGATGACCTT	NM_001394060.1
<i>Hprt</i>	CTCATGGACTGATTATGGACAGGAC	GCAGGTCAGCAAAGAACTTATAGCC	NM_012583.2

2.7 Statistical analysis

Results were expressed as mean + standard error of the mean (S.E.M.). We calculated the maximum inhibitory effect based on the treatment's capability to reduce the Injury/Vehicle group's evaluated parameters, which we considered 100% of the effect. In addition, one-way or two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's *post hoc* test was used to compare the statistical difference among groups. P values lower than 0.05 ($P < 0.05$) denote significant differences among groups. The statistical software GraphPad® Prism version 9.0 (San Diego, California, U.S.A.) was used. For inflammatory cell count in histology, we used Image J® software.

3 RESULTS

3.1 TRPA1 antagonism decreases the glucose/lactate ratio after induction of traumatic muscle injury

We observed that the traumatic muscle injury increased the activity of CK and glucose/lactate levels compared to the sham groups. However, topical treatment with HC-030031 antagonist 0.05% completely reduced the glucose/lactate levels (100%) but did not reduce CK activity after muscle injury (Fig. 2A e B).

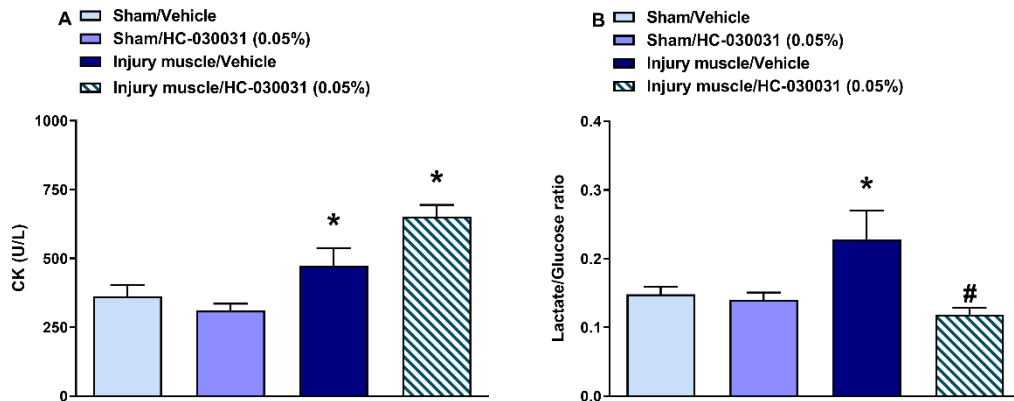


Fig. 2 TRPA1 antagonism decreased the glucose/lactate ratio after induction of traumatic muscle injury but does not reduce the levels of creatine kinase (CK). (A) CK activity and (B) glucose/lactate ratio were observed in the muscle tissue 50 h after the muscle injury. The rats were divided into the following groups: Sham/Vehicle (no traumatic muscle injury plus Lanette® N cream base, n = 5); Sham/HC-030031 (0.05%) (no traumatic muscle injury plus base cream containing 0.05 % HC-030031, n = 6); Injury/Vehicle (traumatic muscle injury plus Lanette® N cream base, n = 5); Injury/HC-030031 (0.05%) (traumatic muscle injury plus Lanette® N cream base containing 0.05% HC-030031, n = 8). Data were expressed as mean + S.E.M. * P < 0.05 when compared to the Sham/Vehicle or Sham/HC-030031 (0.05%) groups. # P < 0.05 compared to the Injury/Vehicle group (One-way ANOVA followed by Bonferroni's test).

3.2 TRPA1 antagonism reduced spontaneous nociception without altering the locomotor activity after induction of traumatic muscle injury

The traumatic muscle injury model and topical treatment with HC-030031 antagonist 0.05% did not alter the locomotor and exploratory activity (rotarod, fig. 3A, and 3B) and burrowing behaviour (Fig. 3C). The injury model increased the RGS score, while the topical treatment with HC-030031 antagonist 0.05% reduced the RGS score by 100% at 26 h and 45 ± 11% at 48 h after muscle injury (Fig. 3D).

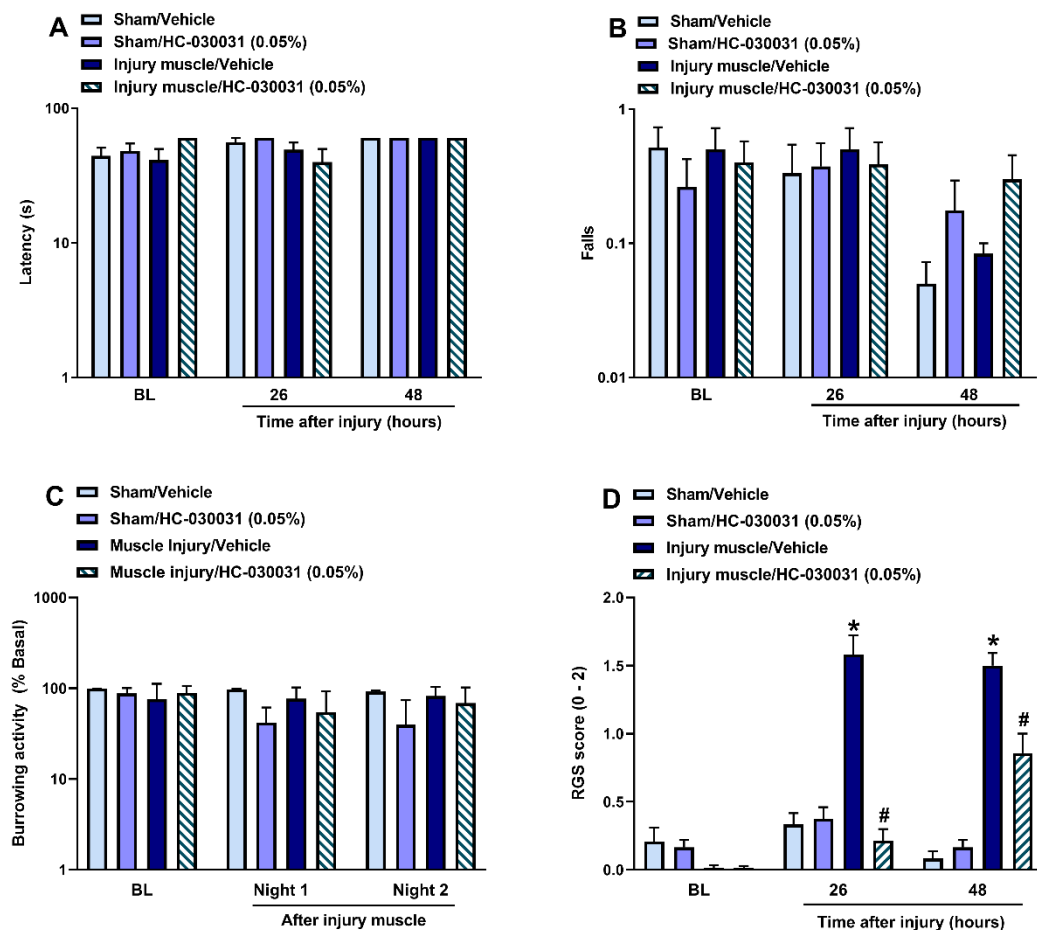


Fig. 3 Topical treatment with a TRPA1 antagonist reduced spontaneous nociception without altering locomotor activity after induction of traumatic muscle injury in rats. (A) Latency to the first fall and (B) number of falls in the rotarod test, (C) burrowing activity (night 1: 12 h after muscle injury and night 2: 35 h after muscle injury), and (D) rat grimace score (RGS) for spontaneous nociception. The rats were divided into the following groups: Sham/Vehicle (no

traumatic muscle injury plus Lanette[®] N cream base containing); Sham/HC-030031 (0.05%) (no traumatic muscle injury plus Lanette[®] N cream base containing 0.05% HC-030031); Injury/Vehicle (traumatic muscle injury plus Lanette[®] N cream base containing); Injury/HC-030031 (0.05%) (traumatic muscle injury plus Lanette[®] N cream base containing 0.05% HC-030031). Data were expressed as mean + S.E.M. Rotarod: Sham/Vehicle, n = 8; Sham/HC-030031 0.05%, n = 8; Injury/Vehicle, n = 8; Injury/HC-030031 0.05%, n = 8; burrowing activity evaluation and RGS score: Sham/Vehicle, n = 6; Sham/HC-030031 0.05%, n = 6; Injury/Vehicle, n = 6; Injury/HC-030031 0.05%, n = 7). * P < 0.05 when compared to the Sham/Vehicle and Sham/HC-030031 0.05% groups. # P < 0.05 compared to the Injury/Vehicle group (Two-way ANOVA followed by Bonferroni's test).

3.3 TRPA1 antagonism reduces the inflammatory cells infiltration after induction of traumatic muscle injury

Fifty hours after the muscle injury, the infiltration of inflammatory cells was measured through the activities of the MPO and NAGase enzymes and confirmed by histological sections of the gastrocnemius muscle of rats. Topical treatment with 0.05% HC-030031 antagonist reduced MPO activity by 100% and NAGase activity by $60 \pm 9\%$ (Fig. 4A and B). For the inflammatory cell count, random histological fields from H&E-stained slides (5 animals per group) were observed to quantify the number of inflammatory cells. The traumatic muscle injury promoted inflammatory cells infiltration (34 ± 6 inflammatory cells/field in the injury muscle/Vehicle group) when compared with sham groups (25 ± 6 and 20 ± 6 inflammatory cells/field for Sham/Vehicle and Sham/HC-030031 0.05% groups, respectively), while the topical treatment with HC-030031 antagonist 0.05% reduced by $85 \pm 6\%$ (6 inflammatory cells/field) in comparison with Injury/Vehicle treated group this parameter (Fig. 4C).

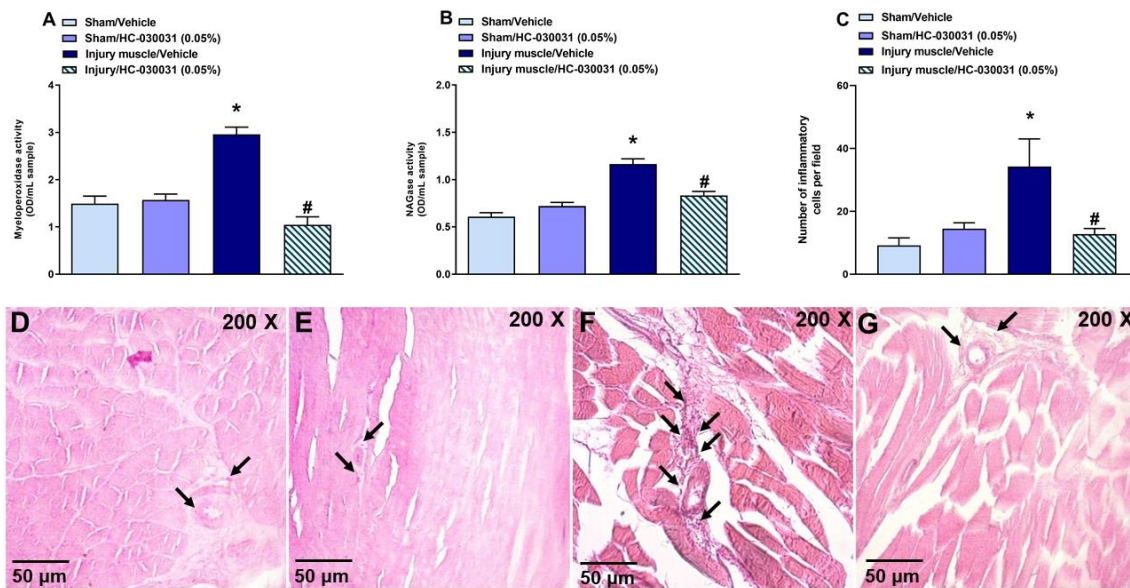


Fig. 4 TRPA1 antagonism decreased the myeloperoxidase (MPO) and N-acetyl- β D-glucosaminidase (NAGase) activities, and the number of inflammatory cells in gastrocnemius muscle. (A) MPO activity (OD/mL sample, $n = 5$), (B) NAGase activity (OD/mL sample, $n = 5$), and (C) number of inflammatory cells per field were observed 50 h after traumatic muscle injury. Histological changes (hematoxylin-eosin; 200x) (D-G) were measured at 50 h after the traumatic muscle injury. The arrows indicate the presence of inflammatory cells in the muscle tissue. Scale bar, 50 μ m. Each bar stands for the mean + S.E.M. (the number of inflammatory cells). The following figure captions represent (D) Sham/Vehicle (no traumatic muscle injury plus Lanette® N cream base; $n = 6$); (E) Sham/HC-30031 0.05% (no traumatic muscle injury plus base cream containing 0.05% HC-030031; $n = 6$); (F) Injury/Vehicle (traumatic muscle injury plus Lanette® N cream base; $n = 6$) and (G) injury/HC-030031 0.05% (traumatic muscle injury plus Lanette® N cream base containing 0.05% HC-030031; $n = 6$). * $P < 0.05$ when compared with the Sham/Vehicle or Sham/HC-30031 0.05% groups. # $P < 0.05$ when compared with the Injury/Vehicle group (One-way ANOVA followed by Bonferroni's test).

3.4 *TRPA1* antagonism reduces the oxidative and inflammatory mediators after induction of traumatic muscle injury

The traumatic muscle injury increased the DCF fluorescence, nitrite, and cytokines (IL-1 β and IL-6) levels compared to the sham groups (Fig. 5A–D). Moreover, the injured group topically treated with HC-030031 0.05% reduced the IL-1 β , IL-6, nitrite levels, and DCF fluorescence by $70 \pm 14\%$ (Fig. 5A), $71 \pm 4\%$ (Fig. 5B), 100% (Fig. 5C), and 100% (Fig. 5D), respectively.

Besides, the traumatic muscle injury increased the mRNA levels of *Trpa1* compared to the sham groups in gastrocnemius muscle (Fig. 5E) and dorsal root ganglia (Fig. 5F) samples. Moreover, the injured group topically treated with HC-030031 0.05% reduced the mRNA levels of *Trpa1* by 100% and $88 \pm 5\%$ in the gastrocnemius muscle and dorsal root ganglion, respectively.

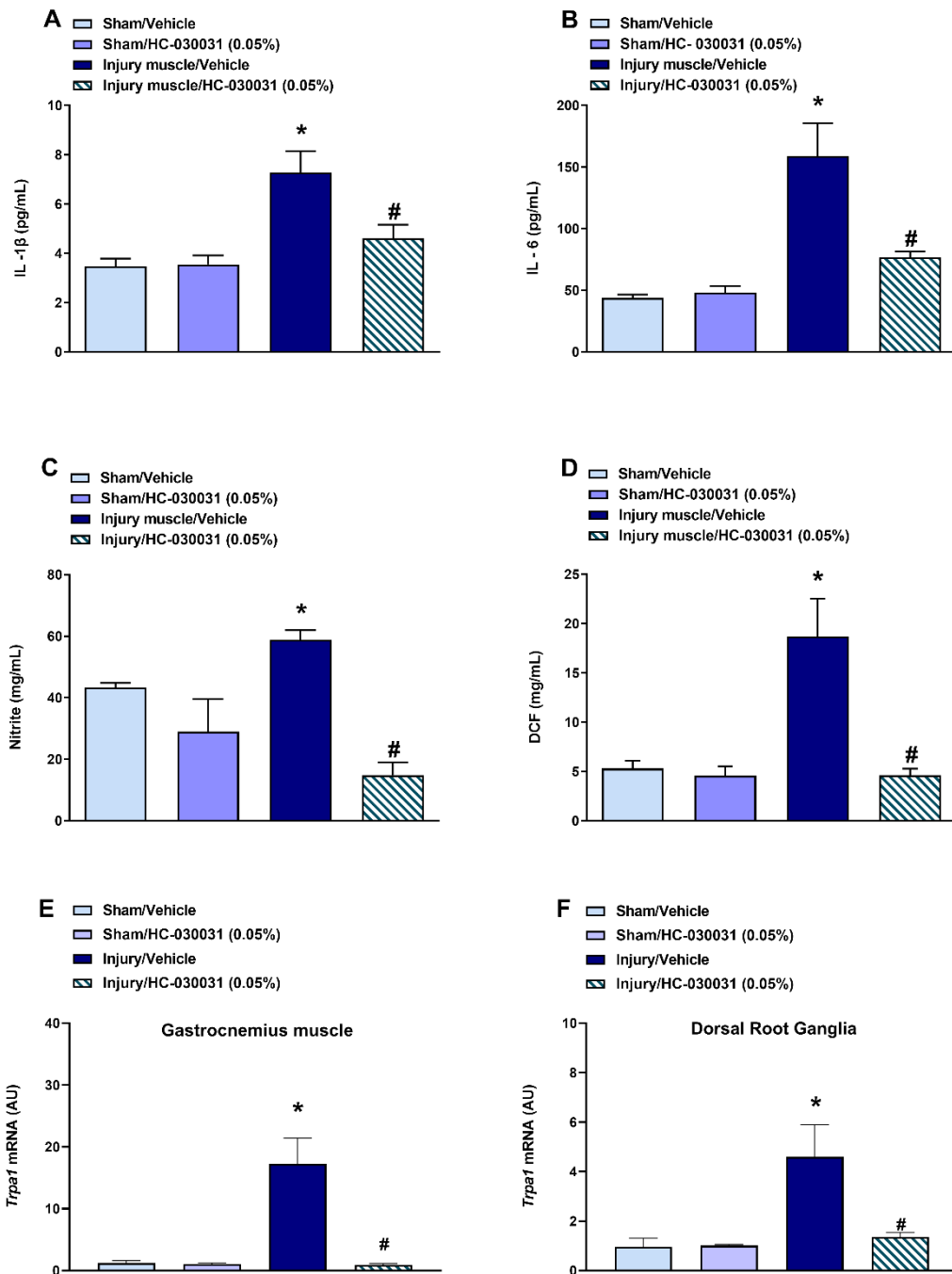


Fig. 5 TRPA1 antagonism reduced tissue oxidation and the levels of nitrite, inflammatory cytokines, and *Trpa1* mRNA. (A) IL-1 β (pg/mL), (B) IL-6 (pg/mL), (C) Nitrite (mg/mL) levels, and (D) dichlorofluorescein (DCF) fluorescence (mg/mL), (E) *Trpa1* mRNA in gastrocnemius muscle, (F) *Trpa1* mRNA in dorsal root ganglia. The rats were divided into the following groups: Sham/Vehicle (no traumatic muscle injury plus Lanette[®] N cream base containing); Sham/HC-030031 (0.05%) (no traumatic muscle injury plus Lanette[®] N cream base containing 0.05%

HC-030031); Injury/Vehicle (traumatic muscle injury plus Lanette® N cream base containing); Injury/HC-30031 (0.05%) (traumatic muscle injury plus Lanette® N cream base containing 0.05% HC-030031). Data were expressed as mean + S.E.M. (Sham/Vehicle n = 5; Sham/HC-030031 0.05% n = 7; Injury/Vehicle n = 5; Injury/HC-030031 0.05% n = 7). The graphic symbols denote the significance levels when compared with the Sham/Vehicle, Sham/HC-030031 0.05%, or Injury/Vehicle groups. *P < 0.05 when compared to the Sham/Vehicle or Sham/HC-030031 0.05 % groups. #P < 0.05 when compared to the Injury/Vehicle group (One-way ANOVA followed by Bonferroni's test).

4 DISCUSSION

Musculoskeletal pain is a type of pain diagnosed worldwide, and it is usually provoked by mechanical trauma (Ruela et al. 2022; Seminowicz et al. 2022). This type of pain compromises the quality of life of patients and leads to the chronic use of pain medications, such as non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and opioids, which may induce several adverse effects and consequently cause higher healthcare costs (Derry et al. 2016; Gonçalves et al. 2021). NSAIDs have only modest effects on moderate to severe pain and cause a combination of gastrointestinal and cardiovascular side effects limiting their use. They are the most commonly used drugs in the treatment of muscle pain, especially topically, to avoid side effects (Derry et al. 2016). In a recent study with this model of traumatic muscle injury in rats, we tested diclofenac monosodium (an NSAID) because this drug is widely used clinically in semisolid formulations for muscle pain management. The topical treatment with 1% monosodium diclofenac reduced inflammatory cell infiltration, DCF fluorescence, and lactate/glucose levels in this model (Kudsi et al. 2020). Hence, there is a critical need for new analgesics that are effective and safe for the control of muscle pain. Therefore, in the present study, we showed the antinociceptive and anti-inflammatory effect of the topical application of a TRPA1 antagonist in a model of traumatic muscle injury in rats.

Previously, our research group showed the antinociceptive and anti-inflammatory effect of the topical application of HC-030031 (0.05%) in models of inflammatory pain (Antoniazzi et al. 2018; Fialho et al. 2020). Traumatic muscle injury also causes local inflammation and nociception (Dos Santos Haupenthal et al. 2020; Kudsi et al. 2020). Then, as TRPA1 antagonists have poor bioavailability/pharmacokinetics by systemic injection we tested this TRPA1 antagonist by topical application (Koivisto et al. 2022). Besides, previously, using a model of trigeminal neuralgia we also showed that the TRPA1 antagonist injected locally (whisker pad) produced an antinociceptive effect, but the contralateral injection (100 µg/10 µL) was not effective (Trevisan et al. 2016). Thus, probably the effect of the topical application of HC-030031 is local on the gastrocnemius muscle, but in future projects, we should improve this point of discussion. On the other hand, the TRPA1 antagonists have not shown any side effects in preclinical and clinical studies (Koivisto et al. 2022).

Moreover, we observed that the model of traumatic muscle injury caused an increase in biomarkers of muscle injury (lactate/glucose ratio and CK activity). The topical treatment with a TRPA1 antagonist, HC-030031 (0.05%), caused a reduction in the lactate/glucose ratio. Besides, the topical application of 1% monosodium diclofenac reduced lactate/glucose levels in this model but did not decrease CK activity (Kudsi et al. 2020). Also, in a model of myocardial ischemia-reperfusion injury in mice, the TRPA1 genetic deletion in mice was not sufficient to reduce CK activity (Conklin et al. 2019). According to Araújo et al. (2017), blocking TRPA1 prevented lactate extravasation in ischemic conditions, corroborating our results (Araújo et al. 2017).

Previous studies have shown that after muscle injury or vigorous exercise, CK leakage occurs from the cytosol of muscle cells into the bloodstream (Brancaccio et al. 2006; Kudsi et al. 2020). In addition, due to the suppression of oxygen concentration, the muscle uses anaerobic metabolism to generate ATP and energy (Manojlović and Erčulj 2019; Theofilidis et al. 2018). In this way, the muscle, through the breakdown of glycogen, generates pyruvate, which is converted into lactate and acetyl-CoA (Thirupathi and Pinho, 2018). The lactate may

cause pH reduction in the muscle by proton accumulation, supporting the production of reactive compounds, including H₂O₂ and NO (De Logu et al. 2019; Riemann et al. 2011; Thirupathi and Pinho 2018). These sub-products could initiate and sustain TRPA1 sensitization/activation as they are endogenous agonists of TRPA1, causing pain and inflammation (De Logu et al. 2019).

As published before by our research group, the traumatic muscle injury model in rats does not alter the forced locomotor activity of the animals as detected by the rotarod test (Kudsi et al. 2020). Besides, this model allowed several other tests for locomotor and exploratory activity, such as open field and grip strength tests, and we have not detected any motor disturbance in rats after injury in these parameters (Materials and Supplementary Figure 1A-C). We also detected the nociceptive parameters using the von Frey test (for mechanical allodynia), acetone test (for cold allodynia), and nociceptive score (for spontaneous nociception (Materials and Supplementary Figure 2A-C). Also, a previous study detected the presence of cold and mechanical allodynia after muscle injury in rats (Dos Santos Haupenthal et al. 2020). Our study was the first to evaluate the RGS score in this model of traumatic muscle injury. However, other pain models in mice or rats observed a grimace score higher than 1.5, and there was no difference in locomotor activity (Berke et al. 2022; Viero et al. 2022). Thus, this model of traumatic muscle injury in rats caused evoked and spontaneous nociception without causing locomotor alterations in the rotarod or open field tests.

A limitation for the nociception detection was caused by the measurement of mechanical and cold allodynia or the nociception score in the hind paw; we were not able to evaluate these parameters directly in the injured gastrocnemius muscle. Thus, we assume that the discrepancy in the results detected for the TRPA1 blockage antinociceptive effect was caused by the difficulty to measure these nociceptive measures parameters at the site of muscle injury. Besides, the topically administered TRPA1 antagonist, HC-030031 0.05%, reduced mechanical and cold allodynia in models of thermal lesions or sunburn (Antoniazzi et al. 2018; Fialho et al. 2020). Thus, it is well known that TRPA1 blockage or genetic deletion of TRPA1 channels in mice reduced mechanical and cold allodynia in diverse models of

inflammatory pain (Sugiyama et al. 2017a, b). Thus, for the muscle injury model, nociceptive parameters should be ameliorated to better explain this inconsistency. In a future project, we should characterize this model in mice and then use the genetic deletion of TRPA1 to further explore if TRPA1 participates in mechanical and cold allodynia. Therefore, in our study, the RGS score (a measure of spontaneous pain) translates this issue for patients with muscle pain better than evoked nociceptive parameters (Nagakura et al. 2019).

Diverse studies described that musculoskeletal pain shows significant sex differences (Queme and Jankowski 2019). Chronic generalized pain conditions are more prevalent in females than in males, and many studies suggest observed differences due to gonadal hormones. Two previous works demonstrated that female mice, compared to males, develop generalized, more severe diseases with longer hyperalgesia in models of muscle pain induced by activity and electrical stimulation (Gregory et al. 2013; Lesnak et al. 2020). However, in a clinical study, it was described that after eccentric exercise (to cause muscle damage), female patients showed a reduced amount of muscle pain than male patients (De Logu et al. 2022). Preclinical models using this type of muscle injury or other types of muscle injury used male Sprague-Dawley and Wistar rats (Dos Santos Haupenthal et al. 2020; Gregory and Sluka 2014; Kudsi et al. 2020; Santos et al. 2017; Silveira et al. 2016; Silveira et al. 2010). In this view, future experiments using this model of inflammatory pain should explore the sex differences for nociception and TRPA1 participation.

In this study, the muscle injury in rats promoted inflammatory cell migration (evaluated by increased MPO and NAGase activity), enhanced cytokines levels, and oxidative compounds products (enhanced NO and DCF levels). These results were confirmed by the histology analysis performed corroborating with previous findings (Dos Santos Haupenthal et al. 2020; Gregory and Sluka 2014; Kudsi et al. 2020; Santos et al. 2017; Silveira et al. 2016; Silveira et al. 2010). Topical treatment with HC-030031 0.05% reduced muscle injury-induced inflammatory and oxidative parameters. The anti-inflammatory results obtained for HC-030031 were similar to that detected for monosodium diclofenac 1% in this model of muscle injury

(Kudsi et al. 2020). There is growing evidence supporting the TRPA1 role in inflammatory cell infiltration in different inflammation models (De Logu et al. 2017; Zhou et al. 2019). Besides, topical TRPA1 administration in models of sunburn and thermal lesions attenuates the inflammatory response (Antoniazzi et al. 2018; Camponogara et al. 2020; Fialho et al. 2020).

Moreover, the reduced levels of inflammatory cytokines can be explained by the inhibition of reactive compounds production and inflammatory cell migration in muscle tissue after traumatic muscle injury (Camponogara et al. 2020; Dos Santos Haupenthal et al. 2020; Kudsi et al. 2020; Silveira et al. 2010). According to Camponogara et al. (2020), in a burn model, it was observed that oxidative compounds produced in the skin modulate the expression of inflammatory cytokines through the activation of sensitive transcriptional factors, and consequently also the activation of the TRPA1 channel, such as nuclear factor Kappa B (NF- κ B) (Barbieri and Sestili 2012; Camponogara et al. 2020; Camponogara and Oliveira 2022). Our results agree with previous findings, which show that TRPA1 activation also leads to the production of inflammatory cytokines (Yap et al. 2020). The calcium influx promoted by TRPA1 after oxidant compounds gating could maintain the continuous activation of pro-oxidizing enzymes (as NADPH oxidase), which in turn provoke mitogen-activated protein kinases (MAPKs) or/and NF- κ B signaling (Antoniazzi et al. 2018; Lee et al. 2016; Lin et al. 2015). The TRPA1 antagonism may reduce the production of oxidant compounds impairing the further activation of NF- κ B and/or MAPK, which could cause the increased expression of inflammatory genes and the TRPA1 channels in the injured muscle (Antoniazzi et al. 2018; Hatano et al. 2012; Kondo et al. 2013; Lin et al. 2015; Volpi et al. 2011). Then, interestingly, our muscle injury model caused increased mRNA levels for *Trpa1* in the gastrocnemius muscle and dorsal root ganglia. Furthermore, mRNA levels for TRPA1 were reduced after treatment with the TRPA1 antagonist, HC-030031 0.05%. Previous studies demonstrated functional expression of TRPA1 is significantly higher in dorsal root ganglia neurons innervating muscle than in dorsal root ganglia neurons innervating skin (Mallin et al. 2011). Besides, previous studies recorded AITC-induced currents with TRPA1 activation in rat DRG neurons innervating

the white portion of the gastrocnemius muscles identified by retrograde labeling with the fluorescent dye Dil (Xing and Li 2017).

Furthermore, TRPA1 activation can serve as a physiological mediator for inflammatory signals, enhances important aspects of skeletal muscle repair, such as cell migration and in vitro myoblast fusion, and potentially also satellite cell activation in humans (Osterloh et al. 2016). Interestingly, TRPA1 expression levels and inducible Ca²⁺ transients decrease with continued differentiation of myoblasts. Also, TRPA1 expression and activation in cardiac myocytes were observed to promote Ca²⁺ accumulation and hypercontraction in a model of myocardial ischemia-reperfusion injury and significantly attenuated by the TRPA1 antagonist HC-030031 (Conklin et al. 2011). The increase in intracellular calcium is related to the activation of several underlying signalling pathways associated with the inflammatory and painful process, such as the calmodulin-calcineurin pathway, the calcium-calmodulin-dependent kinase II (CaMKII) pathway, other kinases such as PKA, PKC, MAPK and transcription factors such as AP-1 and NF-κB (Barbieri and Sestili 2012; Camponogara and Oliveira 2022). In addition, the expression of TRPA1 and TRPV1 in muscle afferents of the masseter muscle was observed, and the expression of these channels is enhanced after masseter inflammation (Asgar et al. 2015; Ro et al. 2009; Wang et al. 2018). Then, the increased expression of TRPA1 detected in this study possibly is influenced by dorsal root ganglion gastrocnemius afferents and muscle tissue protein expression. However, this point of discussion should be further elucidated using this model of muscle injury.

Conclusion

In this study, our results showed that the TRPA1 antagonist HC-030031 reduced spontaneous nociception, oxidative/inflammatory parameters, and *Trpa1* expression in the muscular tissue. Our findings suggest new therapeutic strategies for treating inflammatory muscle pain using TRPA1 antagonists by topical administration.

Author contributions

Substantial contributions to conception and design, data acquisition, analysis, and interpretation: S.Q.K., C.T.D.A., C.C., A.M.S., M.A.F., R.P.Z.; C.S.S., G.T. Drafting and critically revising the article's important intellectual content: S.Q.K., C.T.D.A., C.C., G.M.M., D.P.D., A.M.S., M.A.F., R.P.Z.; C.S.S., P.C.L.S., R.N.M., S.M.O., G.T. Final article approval: S.Q.K., C.T.D.A., C.C., G.M.M., D.P.D., A.M.S., M.A.F., R.P.Z.; C.S.S., P.C.L.S., R.N.M., S.M.O., G.T. Acquisition of funding and general supervision of the research group: G.T

Funding

This study was supported by fellowships from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) is also acknowledged. S.Q.K. is the recipient of a fellowship from CAPES [process #23081.080328/2021-87] and G.T. is a recipient of a fellowship from CNPq [process #303531/2020-7]. The experiments of this manuscript comply with the country's current laws in which they were performed. All applicable international, national, and institutional guidelines for the care and use of animals were followed.

Data availability: Data are available upon request.

Conflict of interest: The authors declare no potential conflicts of interest.

REFERENCES

Antoniuzzi CT, De prá SD, Ferro PR, Silva M, Adamante G, Almeida AS, Camponogara C, Silva CR, de Bem G, Silveira PCL, Oliveira SM, Rigo F, De Logu F, Nassini R, Trevisan G: Topical treatment with a transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) antagonist reduced nociception and inflammation in a thermal lesion model in rats. *Eur J Pharm Sci* 125:28-38, 2018.

Araújo DSM, Miya-Coreixas VS, Pandolfo P, Calaza KC: Cannabinoid receptors and TRPA1 on neuroprotection in a model of retinal ischemia. *Exp Eye Res* 154:116-12, 2017.

Asgar J, Zhang Y, Saloman J, Wang S, Chung M, Ro J: The role of TRPA1 in muscle pain and mechanical hypersensitivity under inflammatory conditions in rats. *Neurosci* 310: 206–215, 2015.

Barbieri E, Sestili P: Reactive oxygen species in skeletal muscle signaling. *J signal transduction* 982794, 2012.

Berke MS, Colding-Jørgensen P, Hestehave S, Kalliokoski O, Jensen HE, Sørensen DB, Hau J, Abelson KSP: Effects of buprenorphine on acute pain and inflammation in the adjuvant-induced monoarthritis rat model. *Heliyon* 8: e11554, 2022.

Brancaccio P, Lippi G, Maffulli N, Biochemical markers of muscular damage. *Clin Chem Lab Med* 48:757–767, 2006.

Brum ES, Fialho MFP, Fischer SPM, Hartmann DD, Gonçalves DF, Scussel R, Machado-de-Ávila RA, Dalla Corte CL, Soares FAA, Oliveira SM: Relevance of Mitochondrial Dysfunction in the Reserpine-Induced Experimental Fibromyalgia Model. *Mol Neurobiol* 57:4202–4217, 2020.

Camponogara C, Brum ES, Pegoraro NS, Brusco I, Rocha FG, Brandenburg MM, Cabrini DA, André E, Trevisan G, Oliveira SM: Neuronal and non-neuronal transient receptor potential ankyrin 1 mediates UVB radiation-induced skin inflammation in mice. *Life Sci* 262:118557, 2020.

Camponogara C, Casoti R, Brusco I, Piana M, Boligon AA, Cabrini DA, Trevisan G, Ferreira J, Silva CR, Oliveira SM: *Tabernaemontana catharinensis* leaves effectively reduce the irritant contact dermatitis by glucocorticoid receptor dependent pathway in mice. *Biomed Pharmacother* 109:646–657, 2019.

Camponogara C, Oliveira SM: Are TRPA1 and TRPV1 channel-mediated signalling cascades involved in UVB radiation-induced sunburn? *Environ Toxicol Pharmacol* 92:103836, 2022.

Conklin DJ, Guo Y, Nystoriak MA, Jagatheesan G, Obal D, Kilfoil PJ, Hoetker JD, Guo L, Bolli R, Bhatnagar A: TRPA1 channel contributes to myocardial ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ* 316:889–899, 2019.

Dannecker EA, Liu Y, Rector RS, Thomas TR, Fillingim RB, Robinson ME: Sex differences in exercise-induced muscle pain and muscle damage. *J Pain* 13:1242-9, 2012.

De Logu F, Nassini R, Hegron A, Landini L, Jensen DD, Latorre R, Ding J, Marini M, De Araujo DSM, Ramírez-Garcia P, Whittaker M, Retamal J, Titz M, Innocenti A, Davis TP, Veldhuis N, Schmidt BL, Bunnett NW, Geppetti P: Schwann cell endosome CGRP signals elicit periorbital mechanical allodynia in mice. *Nat Commun* 13:646, 2022.

De Logu F, Nassini, Materazzi S, Gonçalves MC, Nosi D, Degl'Innocenti DR, Marone IM, Ferreira J, Puma SL, Benemei B, Trevisan G, De Araújo DSM, Patacchini R, Bunnett NW, Geppetti P: Schwann cells TRPA1 mediates neuroinflammation that sustains macrophage-dependent neuropathic pain in mice. *Nat Commun* 8:1887, 2017.

De Logu F, Puma S, Landini L, Tuccinardi T, Poli G, Preti D, De siena G, Patacchini R, Tsagareli MG, Geppetti P, Nassini R: The acyl-glucuronide metabolite of ibuprofen has analgesic and anti-inflammatory effects via the TRPA1 channel. *Pharmacol Res* 142:127-139, 2019.

Deacon RM: Burrowing in rodents: a sensitive method for detecting behavioral dysfunction. *Nat Protoc* 1:118-21, 2006.

Derry S, Conaghan P, Da Silva J, Wiffen P, Moore R: Topical NSAIDs for chronic musculoskeletal pain in adults. *The Cochrane database of systematic reviews*. CD007400: 4, 2016.

Dos Santos Haupenthal DP, Zortea D, Zaccaron RP, De Bem Silveira G, Corrêa MEAB, Mendes C, De Roch CL, Duarte MB, Pinho RA, Feuser PE, Machado-de-Ávila RA, Silveira

PCL: Effects of phonophoresis with diclofenac linked gold nanoparticles in model of traumatic muscle injury. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 110: 110681, 2020.

Fernandes T, Pedrinelli A, Hernandez A: Lesão muscular – fisiopatologia, diagnóstico e Tratamento. *Revista Brasileira de Ortopedia* 46:247–255, 2011.

Fialho MFP, Brum ES, Pegoraro NS, Gontijo AC, Trevisan G, Cruz L, Oliveira SM: Topical transient receptor potential ankyrin 1 antagonist treatment attenuates nociception and inflammation in an ultraviolet B radiation-induced burn model in mice. *J Dermatol Sci* 97:135-142, 2020.

Gane EM, Brakenridge CL, Smits EJ, Johnston V: The impact of musculoskeletal injuries sustained in road traffic crashes on work-related outcomes: a protocol for a systematic review. *Syst Rev* 7:202, 2018.

Gonçalves WA, Ferreira RCM, Rezende BM, Mahecha GAB, Gualdron M, de Macedo FHP, Duarte IDG, Perez AC, Machado FS, Cruz JS, Romero TRL: Endogenous opioid and cannabinoid systems modulate the muscle pain: A pharmacological study into the peripheral site. *Eur J Pharmacol* 901:174089, 2021.

Gregory NS, Gibson-Corley K, Frey-Law L, Sluka KA: Fatigue-enhanced hyperalgesia in response to muscle insult: induction and development occur in a sex-dependent manner. *Pain* 154:2668-2676, 2013.

Gregory NS, Sluka KA: Anatomical and physiological factors contributing to chronic muscle pain. *Curr Top Behav Neurosci* 20:327-348, 2014.

Hatano N, Itoh Y, Suzuki H, Muraki Y, Hayashi H, Onozaki K, Wood IC, Beech DJ, Muraki K: Hypoxia-inducible factor-1 α (HIF1 α) 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* 287:31962–31972, 2012.

Koivisto P, Belvisi M, Gaudet R, Szallasi A: Advances in TRP channel drug discovery: from target validation to clinical studies. *Nat rev Drug Discovery* 21:41–59, 2022.

Kondo T, Sakurai J, Miwa H, Noguchi K. Activation of p38 MAPK through transient receptor potential A1 in a rat model of gastric distension-induced visceral pain. *Neuroreport* 24:68–72, 2013.

Kudsi SQ, Antoniazzi CT, Camponogara C, Brum ES, Brusco I, Peres, DS, Fischer S, Dalenogare DP, Stein C, Zaccaron RP, Silveira PCL, Moresco RN, Oliveira SM, Trevisan G: Characterisation of nociception and inflammation observed in a traumatic muscle injury model in rats. *Eur J Pharmacol* 883:173284, 2020.

Landini L, De Araujo DSM, Titiz M, Geppetti P, Nassini R, De Logu F: TRPA1 Role in Inflammatory Disorders: What Is Known So Far? *Int J Mol Sci* 23:4529, 2022.

Lee KI, Lee HT, Lin HC, Tsay HJ, Tsai FC, Shyue SK, Lee TS: Role of transient receptor potential ankyrin 1 channels in Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation* 13: 92, 2016.

Lesnak JB, Inoue S, Lima L, Rasmussen L, Sluka KA: Testosterone protects against the development of widespread muscle pain in mice. *Pain* 161:2898-2908, 2020.

Lin AH, Liu MH, Ko HK, Perng DW, Lee TS, Kou YR: Lung epithelial TRPA1 transduces the extracellular ROS into transcriptional regulation of lung inflammation induced by cigarette smoke: the role of Influxed Ca²⁺. *Mediat Inflamm* 148367, 2015.

Liu J, Saul D, Böker KO, Ernst J, Lehman W, Schilling AF: Current Methods for Skeletal Muscle Tissue Repair and Regeneration. *BioMed Res Int* 1984879, 2018.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* 25:402-408, 2001.

Malin S, Molliver D, Christianson JA, Schwartz ES, Cornuet P, Albers KM, Davis BM: TRPV1 and TRPA1 function and modulation are target tissue dependent. *J Neurosci* 31:10516–10528, 2011.

Manojlović V, Erčulj F: Using blood lactate concentration to predict muscle damage and jump performance response to maximal stretch-shortening cycle exercise. *J Sports Med Phys Fit* 59:581–586, 2019.

McGrath JC, Lilley E: implementing guidelines on reporting research using animals (ARRIVE etc.): new requirements for publication in BJP. *Br J Pharmacol* 172:3189–3193, 2015.

Nagakura Y, Miwa M, Yoshida M, Miura R, Tanei S, Tsuji M, Takeda H: Spontaneous pain-associated facial expression and efficacy of clinically used drugs in the reserpine-induced rat model of fibromyalgia. *Eur J Pharmacol* 864:172716, 2019.

Osterloh M, Böhm M, Kalbe B, Osterloh S, Hatt H. Identification and functional characterization of TRPA1 in human myoblasts. *Pflugers Arch* 468: 321-333, 2016.

Parenti A, De Logu F, Geppetti P, Benemei S: What is the evidence for the role of TRP channels in inflammatory and immune cells? *Brit J Pharmacol* 173:953-969, 2016.

Perrot S, Cohen M, Barke A, Korwisi B, Rief W, Treede RD: The IASP classification of chronic pain for ICD-11: Chronic secondary musculoskeletal pain. *Pain* 160:77–82, 2019.

Queme LF, Jankowski MP: Sex differences and mechanisms of muscle pain. *Curr Opin Physiol* 11:1-6, 2019.

Riemann A, Schneider B, Ihling A, Nowak M, Sauvant C, Thews O, Gekle M: Acidic environment leads to ROS-Induced MAPK signaling in cancer cells. *PLoS One* 6: e22445, 2011.

Rizzi CF, Mauriz JL, Freitas Corrêa DS, Moreira AJ, Zettler CG, Filippin LI, Marroni NP, González-Gallego J: Effects of low-level laser therapy (LLLT) on the nuclear factor (NF)-kappaB signaling pathway in traumatized muscle. *Lasers Surg Med* 38:704–713, 2006.

Ro JY, Lee JS, Zhang Y: Activation of TRPV1 and TRPA1 leads to muscle nociception and mechanical hyperalgesia. *Pain* 144:270-277, 2009.

Rossato MF, Rigo FK, Oliveira SM, Guerra GP, Silva CR, Cunha TM, Gomez MV, Ferreira J, Trevisan G: Participation of transient receptor potential vanilloid 1 in paclitaxel-induced acute visceral and peripheral nociception in rodents. *Eur J Pharmacol* 828:42-51, 2018.

Ruela G, Barreto SM, Griep RH, Benseñor IM, Telles RW, Camelo LV: Job stress and chronic and widespread musculoskeletal pain: a cross-sectional analysis from the Brazilian Longitudinal Study of Adult Health Musculoskeletal. *Pain*. 163:2044–2051, 2022.

Sakai K, Sanders KM, Youssef MR, Yanushefski KM, Jensen L, Yosipovitch G, Akiyama T: Mouse model of imiquimod-induced psoriatic itch. *Pain*. 157:2536-2543, 2016.

Santos DFDSD, Melo BA, Jorge CO, Azambuja G, Schiavuzzo JG, Krímon S, Neves JDS, Parada CA, Oliveira-Fusaro MCG: Muscle pain induced by static contraction in rats is modulated by peripheral inflammatory mechanisms. *Neurosci* 358:58-69, 2017.

Seminowicz DA, de Martino E, Schabrun SM, Graven-Nielsen T: Left dorsolateral prefrontal cortex repetitive transcranial magnetic stimulation reduces the development of long-term muscle pain. *Pain* 159:2486-2492, 2018.

Silveira PCL, Scheffer D, Glaser V, Remor A, Pinho R, Aguiar Junior A, Latini A: Low-level laser therapy attenuates the acute inflammatory response induced by muscle traumatic injury. *Free Radic Res* 50:503–513, 2016.

Silveira PCL, Victor E, Schefer D, Silva L, Streck E, Paula M, Pinho R: Effects of therapeutic pulsed ultrasound and dimethylsulfoxide (DMSO) phonophoresis on parameters of oxidative stress in traumatized muscle. *Ultrasound Med Biol* 36:44–50, 2010.

Sotocinal S, Sorge R, Zaloum A, Tuttle A, Martin L, Wieskopf J, Mapplebeck J, Wei P, Zhan S, Zhang S, McDougall J, King O, Mogil J: The Rat Grimace Scale: a partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions. *Mol Pain* 7:55, 2011.

Sugiyama D, Kang S, Arpey N, Arunakul P, Usachev YM, Brennan TJ: Hydrogen Peroxide Induces Muscle Nociception via Transient Receptor Potential Ankyrin 1 Receptors. *Anesthesiol* 127, 695–708, 2017a.

Sugiyama D, Kang S, Brennan TJ: Muscle Reactive Oxygen Species (ROS) Contribute to Post-Incisional Guarding via the TRPA1 Receptor. *PloS one* 12: e0170410, 2017b.

Talavera K, Startek JB, Alvarez-Collazo J, Boonen B, Alpizar Y, Sanchez A, Naert R, Nilius B: Mammalian Transient Receptor Potential TRPA1 Channels: From Structure to Disease. *Physiol Rev* 100:725–803, 2019.

Theofilidis G, Bogdanis G, Koutedakis Y, Karatzaferi C: Monitoring exercise induced muscle fatigue and adaptations: making sense of popular or emerging indices and biomarkers. *Sports* 6:53, 2018.

Thirupathi A, Pinho R: Effects of reactive oxygen species and interplay of antioxidants during physical exercise in skeletal muscles. *J Physiol Biochem* 74:359-367, 2018.

Trevisan G, Benemei S, Materazzi S, De Logu F, De Siena S, Fusi C, Rossato M, Coppi E, Marone IM, Ferreira J, Geppetti P, Nassini R. TRPA1 mediates trigeminal neuropathic pain in mice downstream of monocytes/macrophages and oxidative stress. *Brain* 139:1361–1377, 2016.

Viero FT, Rodrigues P, Frare JM, Da Silva NAR, Ferreira MA, Da Silva AM, Pereira GC, Ferreira J, Pillat MM, Bochi GV, Nassini R, Geppetti P, Trevisan G: Unpredictable Sound Stress Model Causes Migraine-Like Behaviors in Mice With Sexual Dimorphism. *Front Pharmacol* 13:911105, 2022.

Volpi G, Facchinetti F, Moretto N, Civelli M, Patacchini R: Cigarette smoke and α , β -unsaturated aldehydes elicit VEGF release through the p38 MAPK pathway in human airway smooth muscle cells and lung fibroblasts. *Br J Pharmacol* 163:649–661, 2011.

Wang S, Brigoli B, Lim J, Karley A, Chung M: Roles of TRPV1 and TRPA1 in Spontaneous Pain from Inflamed Masseter Muscle. *Neurosci* 384:290-299, 2018.

Xing J, Li j: TRPA1 Function in Skeletal Muscle Sensory Neurons Following Femoral Artery Occlusion. *Cell Physiol Biochem* 42:2307-2317, 2017.

Yang W, Hu P: Hierarchical signaling transduction of the immune and muscle cell crosstalk in muscle regeneration. *Cell Immunol* 326: 2–7, 2018.

Yap JMG, Ueda T, Takeda N, Fukumitsu K, Fukuda S, Uemura T, Tajiri T, Ohkubo H, Maeno K, Ito Y, Kanemitsu Y, Nijmi A: An inflammatory stimulus sensitizes TRPA1 channel to increase cytokine release in human lung fibroblasts. *Cytokine* 129:155027, 2020.

Zhou Y, Han D, Follansbee T, Wu X, Yu S, Wang B, Shi Z, Domocos DT, Carstens M, Carstens E, Hwang ST: Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) positively regulates imiquimod-induced, psoriasiform dermal inflammation in mice. *J Cell Mol Med* 23:4819–4828, 2019.

Supplementary material

Methods

1 Forced locomotor activity and grip force assessment

The open field test was performed at nociceptive peaks (26 and 48h after traumatic muscle injury or sham procedure). The rats were placed into individual activity chambers (50 × 50 × 25 cm), without previous exposure. The locomotor activity was manually analyzed according to the number of crossing (horizontal movements) and rearing (vertical movements), during 30 min [1].

The muscle strength of rats was assessed using a grip strength meter (Grip Strength meter EFF 305 – Insight, Ribeirão Preto, SP, Brazil). The test consists of the experimenter holding the rat gently by the base of the tail, allowing the animal to grab the metal bar with the forelimbs and hindlimbs before being gently pulled until it releases its grip. Maximum muscle strength was recorded before (baseline measurement) and 26 and 48h after the muscle injury or sham procedure. Muscle strength, expressed in grams (g), was measured in triplicate with at least 1 min between measurements [2].

2 Nociception assessment

The nociceptive parameters were evaluated before (baseline responses) and at 26 and 48 h after traumatic muscle injury or sham procedure. Briefly, the animals were placed individually inside a plexiglass chamber with a wire mesh platform floor for 30 min of habituation. After this period, the nociceptive parameters were assessed, including the nociception score, and mechanical and cold allodynia [3].

2.2 Nociception score assessment

The nociception score of the hind paw was observed in this model immediately before starting the measurements of the hind paw mechanical threshold as described before [3]. The animals remained in the Plexiglas boxes on an elevated wire mesh platform to allow

observation of the plantar surface of the right hind paw. The amount of weight that the animals were willing to put on their paw after being submitted to an injury was estimated by qualitative visual analysis using the following scale: score 0, normal paw pressure, with equal weight distribution on both hind paws; score 1, slightly reduced paw pressure, with the hind paw completely on the floor, but the toes are not spread; score 2, moderately reduced hind paw pressure, with only some parts of the paw slightly touching the floor; score 3, severely reduced hind paw pressure, with the hind paw completely removed from the floor [3].

2.4 Paw mechanical threshold determination

We evaluated the hind paw mechanical threshold using von Frey test at baseline, and 26 and 48 h after the traumatic muscle injury or control group. The paw withdrawal threshold was assessed by the up-and-down method using seven distinct von Frey filaments (1, 2, 4, 6, 8, 10, or 15 g). The mechanical sensitivity of animals was evaluated using a series of von Frey filaments of increasing stiffness in each animal's right hind paw plantar surface [3, 4]. No paw-lifting response led to the use of the filament with increasing stiffness, while a paw-lifting reaction led to the use of the lower-stiffness filament. Compared to the baseline response, a decrease of 50% in the hind paw withdrawal threshold (expressed in g) was considered mechanical allodynia.

2.5 Evaluation of the cold allodynia response to the acetone test

We evaluated the cold allodynia response to the acetone drop test at baseline, 26 and 48 h after the traumatic muscle injury or in the control group. Briefly, the acetone drop (50 μ l) was placed on the plantar surface of the animal's hind paw skin. The behavioral responses to acetone drop were estimated by qualitative visual analysis, using the following scale scored from 0 to 3: score 0, if animals did not react within 20 s of acetone application; score 1, quick withdrawal, flick, or stamp of the paw the animal; score 2, prolonged withdrawal or repeated flicking; score 3, repeated flicking together with licking at the ventral side of the paw [3]. An

increase in nociceptive response to acetone compared to baseline was considered cold allodynia.

Data analysis

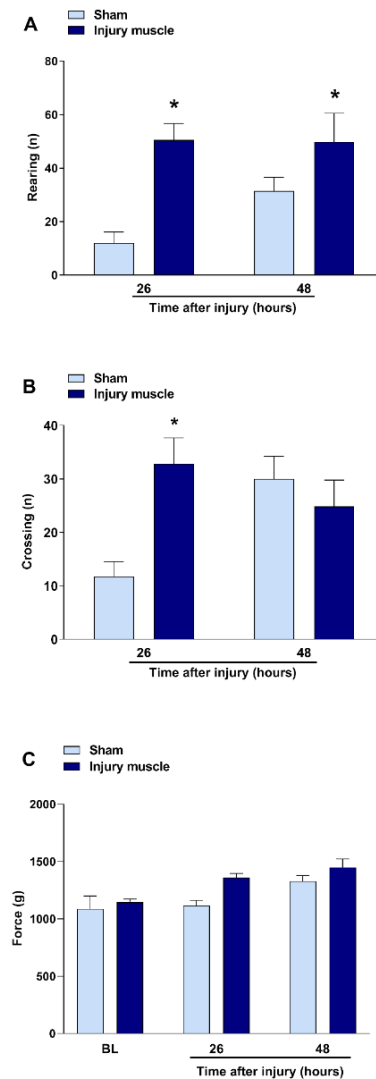
The data were expressed as mean + standard error of the mean (S.E.M.). Statistical difference among groups was assessed by one-way or two-way analysis of variance (ANOVA), followed by Bonferroni *post hoc* test. P values lower than 0.05 ($P < 0.05$) denote significant differences among groups. The statistical software GraphPad® Prism version 9.0 (San Diego, California, U.S.A.) was used.

3 Results

3.1 Traumatic muscle injury-induced no changes alteration on locomotor activity and force grip in rats.

The traumatic muscle injury model not alter the locomotor and grip force at 26 and 48 h after injury muscle compared with sham groups (supplementary Fig. 1A, B, and C).

FIGURA SUPLEMENTAR 1 – *Traumatic muscle injury-induced no changes alteration on locomotor activity and force grip in rats*



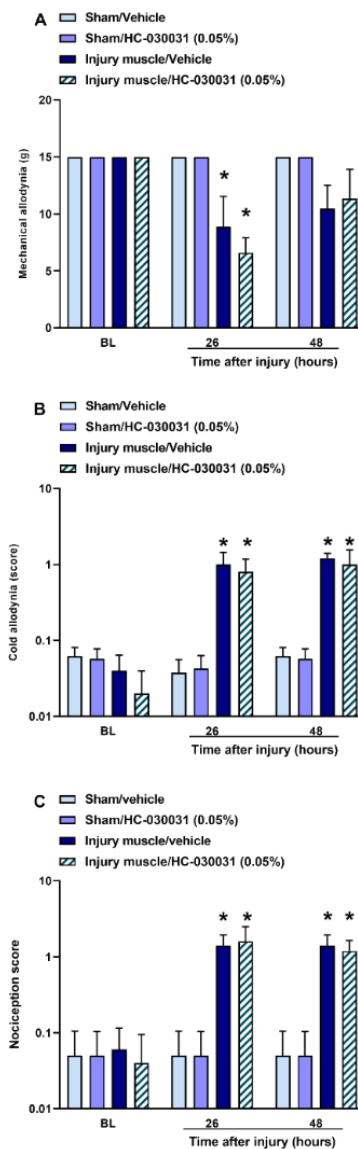
Supplementary Fig. 1. Traumatic muscle injury model in rats did not change the forced locomotor activity assessment and grip test. (A) rearing and (B) crossing number in the open field test, and (C) grip force (in g) after traumatic muscle injury model in rats. The animals were divided into the following groups: Sham/Vehicle (no traumatic muscle injury plus Lanette® N cream base, n = 8); Sham/HC-030031 0.05% (no traumatic muscle injury plus base cream containing 0.05% HC-030031, n = 8); Injury/Vehicle (traumatic muscle injury plus Lanette® N cream base, n = 8); Injury/HC-30031 0.05% (traumatic muscle injury plus Lanette® N cream base containing 0.05% HC-030031, n = 8). Nociception was measured before (BL, baseline values) and at 26 and 48 h after the muscle injury or sham procedure. * P < 0.05 when compared to the Sham/Vehicle and Sham/HC-030031 0.05% groups (Two-way ANOVA followed by Bonferroni's test).

3.2 TRPA1 antagonism not reduce score nociception, mechanical and cold allodynia after induction of traumatic injury muscle

The injury muscle model caused mechanical and cold allodynia and score nociception at 26 and 48 h after injury muscle compared with sham groups

(supplementary Fig. 2A, B, and C). However, topical treatment with HC-030031 antagonist 0.05% not reduce mechanical and cold allodynia and score nociception (supplementary Fig. 2A–C).

FIGURA SUPLEMENTAR 2 – *TRPA1* antagonism not reduce score nociception, mechanical and cold allodynia after induction of traumatic injury muscle.



Supplementary Fig. 2. TRPA1 antagonism (HC-030031) does not reduce score nociception, mechanical and cold allodynia. Time course of (A) Mechanical allodynia, (B) Cold allodynia, and (C) nociception score in a traumatic muscle injury model in rats. The animals were divided into the following groups: Sham/Vehicle (no traumatic muscle injury plus Lanette® N cream

base, n= 7); Sham/HC-030031 0.05% (no traumatic muscle injury plus base cream containing 0.05% HC-030031, n = 7); Injury/Vehicle (traumatic muscle injury plus Lanette® N cream base, n = 7); Injury/HC-30031 0.05% (traumatic muscle injury plus Lanette® N cream base containing 0.05% HC-030031, n = 7). Nociception was measured before (BL, baseline values) and at 26 and 48 h after the muscle injury or sham procedure. * P < 0.05 when compared to the Sham/Vehicle and Sham/HC-030031 0.05% groups (Two-way ANOVA followed by Bonferroni's test).

Supplementary references

- [1] Santos, D. Melo, B. Jorge, C. Azambuja, G. Schiavuzzo, J. Krimon, S. Neves, J. Parada, C. Oliveira-Fusaro, M. Muscle pain induced by static contraction in rats is modulated by peripheral inflammatory mechanisms. *Neurosci.* 358 (2017), 58-69. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.06.041>
- [2] Hori, K. Ozaki, N. Suzuki, S. Sugiura, Y. Upregulations of P2X(3) and ASIC3 involve in hyperalgesia induced by cisplatin administration in rats. *Pain.* 149 (2010), 393-405. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2010.03.005>
- [3] Kudsi, S. Antoniazzi, C. Camponogara, E. Brum, I. Brusco, D. Peres, S. Fischer, D.P. Dalenogare, C. Stein, R.P. Zaccaron, P. Silveira, R.N. Moresco, S.M. Oliveira, G. Trevisan, G. Characterisation of nociception and inflammation observed in a traumatic muscle injury model in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 883 (2020) 173284. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173284>
- [4] Chaplan, S. Bach, F. Pogrel, J. Chung, J. & Yaksh, T. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J. Neurosci. Methods.* 53 (1994), 55–63. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(94\)90144-9](https://doi.org/10.1016/0165-0270(94)90144-9)

A dor musculoesquelética é o tipo de dor mais comum diagnosticada no mundo, e é geralmente provocada por lesões contusivas como o trauma mecânico (MANTHY, 2014; SINGH et al., 2017; ROSA et al., 2019; RUELA et al., 2022). Além disso, a dor musculoesquelética pode estar presente em doenças como osteoartrite, osteoporose, lombalgia, procedimentos ortopédicos, doença celíaca, doença falciforme, câncer, esclerose múltipla, fibromialgia, doença de Parkinson e em lesões musculares como fraturas, lacerações e contusões (MANTHY, 2014; SINGH et al., 2017; ROSA et al., 2019; RUELA et al., 2022). Este tipo de dor compromete a qualidade de vida dos doentes e leva ao uso crônico de medicamentos para a dor, como anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), analgésicos não opióides, opióides e relaxantes musculares (BARBARINDE et al., 2017) que podem induzir vários efeitos adversos e conseqüentemente acarretar custos de saúde mais elevados (MANTHY, 2014; DERRY et al., 2016). No entanto, o uso prolongado desses fármacos implica não só na perda de eficácia, mas também desenvolvimento dos efeitos adversos, dessa forma, limitando seu uso (ANTONIAZZI et al., 2018). Além disso, o uso de opióides como a morfina que tem uma potente propriedade analgésica, carecem de efeitos anti-inflamatórios (ANTONIAZZI et al., 2018). Os AINES são as drogas mais utilizadas no tratamento de dores musculares, principalmente de forma tópica, para evitar efeitos colaterais (DERRY et al., 2016).

Em um estudo recente com esse modelo de lesão muscular traumática em ratos, o diclofenaco monossódico foi testado pois esse medicamento é amplamente utilizado clinicamente em formulações semissólidas devido a biodisponibilidade relativa ao tecido esquelético (tecido esquelético) ser maior após a administração tópica (324%) do que a administração oral (29%). Além disso, a biodisponibilidade plasmática foi 50 vezes menor após aplicação tópica, evitando danos aos órgãos responsáveis pelo metabolismo sistêmico (KUDSI et al., 2020). Em nosso estudo anterior, o tratamento tópico com diclofenaco monossódico a 1% reduziu a infiltração de células inflamatórias, a fluorescência do diclorofluoresceína (DCF) e os níveis de lactato/glicose neste modelo (KUDSI et al., 2020). Assim, há uma necessidade crítica de novos analgésicos que sejam eficazes e seguros para o controle da dor musculoesquelética. Portanto, no presente estudo, mostramos o efeito antinociceptivo e anti-inflamatório da aplicação tópica de um antagonista TRPA1 em um modelo de lesão muscular traumática em ratos.

Anteriormente, nosso grupo de pesquisa mostrou o efeito antinociceptivo e anti-inflamatório da aplicação tópica de HC-030031 (0,05%) em modelos de dor inflamatória como modelos de queimadura (FIALHO et al., 2020; ANTONIAZZI et al., 2018). Nesse sentido, o modelo de lesão muscular traumática também causa aumento dos parâmetros nociceptivos e inflamatórios (KUDSI et al., 2020; HAUPENTHAL et al., 2020). Então, como os antagonistas de TRPA1 têm baixa biodisponibilidade/farmacocinética por administração sistêmica, testou-se esse antagonista de TRPA1 por aplicação tópica (KOIVISTO et al., 2022). Além disso, anteriormente, usando um modelo de neuralgia do trigêmeo, também foi demonstrado que o antagonista TRPA1 administrado localmente onde se encontram as vibrissas dos roedores (do inglês, *whisker pad*) produziu um efeito antinociceptivo, mas a administração contralateral (100 µg/10 µL) não foi eficaz (TREVISAN et al., 2014). Assim, o efeito da aplicação tópica do HC-030031 provavelmente seja local no músculo gastrocnêmio, mas em trabalhos futuros deve-se aprimorar testes de biodisponibilidade dos antagonistas. Por outro lado, os antagonistas do TRPA1 não mostraram nenhum efeito colateral em estudos pré-clínicos e clínicos (KOIVISTO et al., 2022).

Além disso, observou-se que o modelo de lesão muscular traumática causou aumento de biomarcadores de lesão muscular (relação lactato/glicose e atividade de CK). Estudos anteriores mostraram que após lesão muscular ou exercício vigoroso, ocorre vazamento de CK do citosol das células musculares para a corrente sanguínea (BRANCACCIO: LIPPI; MAFFULLI, 2006; THIRUPATHI: PINHO, 2018). Além disso, devido à supressão da concentração de oxigênio, o músculo utiliza o metabolismo anaeróbico para gerar ATP e energia (MANOJLOVIC; ERCULJ, 2018). Desta forma, o músculo, através da quebra do glicogênio, gera piruvato, que é convertido em lactato e acetil-CoA (THEOFILIDIS et al., 2018).

O tratamento tópico com um antagonista TRPA1, HC-030031 (0,05%), causou uma redução na relação lactato/glicose. Semelhante aos nossos resultados, em nosso estudo anterior, a aplicação tópica de diclofenaco monossódico a 1% também reduziu os níveis de lactato/glicose neste modelo, mas não diminuiu a atividade da CK (KUDSI et al., 2020). Além disso, em um modelo de lesão de isquemia-reperfusão miocárdica em camundongos, a deleção genética TRPA1 em camundongos não foi suficiente para reduzir a atividade da CK (CONKLIN et al., 2019). Já o bloqueio do TRPA1

impediu o extravasamento de lactato em condições isquêmicas, corroborando nossos resultados (ARAÚJO et al., 2017).

Através da formação de lactato causando a redução do pH no músculo por acúmulo de prótons, favorecendo um microambiente para produção e liberação de compostos reativos, incluindo H_2O_2 e NO (DE LOGU et al., 2019; RIEMANN et al., 2011; THEOFILIDIS et al., 2018). Por sua vez, esses subprodutos são agonistas endógenos podem iniciar e manter a sensibilização/ativação do TRPA1 causando dor e inflamação (DE LOGU et al., 2020). A ativação de TRPA1 causa o influxo de cálcio e conseqüentemente pode ativar outras vias de sinalização de processos inflamatórios e dolorosos envolvendo a ativação de proteínas quinases (PKA, PKC, PLC, CAMKII), proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) e fatores de transcrição como fator nuclear Kappa B (NF- κ B), proteína adaptadora (AP-1) e PGC-1 α (LEE et al., 2016; CAMPONOGARA; OLIVEIRA, 2022). A ativação desses fatores de transcrição leva o aumento da expressão de alguns genes como JUN, FOS, ERK, NRF1/2, ERK1/2 que são importantes nas etapas de dano e reparo da lesão muscular (TAYLOR; BISHOP, 2022).

Conforme publicado anteriormente por nosso grupo de pesquisa, o modelo de lesão muscular traumática em ratos não altera a atividade locomotora forçada dos animais detectada pelo teste do cilindro giratório (KUDSI et al., 2020). Além disso, este modelo permitiu vários outros testes de atividade locomotora e exploratória, como testes de campo aberto e força de preensão, e não detectamos nenhum distúrbio motor em ratos após lesão nesses parâmetros (Figura 2 complementar). Também detectamos os parâmetros nociceptivos usando o teste de von Frey (para alodinia mecânica), teste da acetona (para alodinia fria) e escore nociceptivo (para nocicepção espontânea (Figura complementar 1). Além disso, um estudo anterior detectou a presença de frio e mecânica alodinia após lesão muscular em ratos (SANTOS et al., 2017). Nosso estudo foi o primeiro a avaliar o escore de caretas (RGS, do inglês, *Rats Grimace Scale*) neste modelo de lesão muscular traumática. No entanto, outros modelos de dor em camundongos ou ratos observaram um escore de careta maior que 1.5, e não houve diferença na atividade locomotora (VIERO et al., 2022). Assim, este modelo de lesão muscular traumática em ratos causou nocicepção evocada e espontânea sem causar alterações locomotoras nos testes do cilindro giratório ou do campo aberto.

A lesão muscular gera um processo inflamatório pela liberação de mediadores inflamatórios, como citocinas e compostos oxidantes, de células residentes nos tecidos e infiltração de células inflamatórias (KUDSI et al., 2020; HAUPENTHAL et al., 2020; SILVEIRA et al., 2016). Os neutrófilos são considerados as primeiras células defensivas a se infiltrar no tecido danificado. Essas células podem contribuir para o dano precoce à membrana muscular após lesão por meio da produção de espécies reativas de oxigênio acompanhadas de ação de protease (MPO) e liberação de mediadores inflamatórios. Essa célula inflamatória também pode desencadear a amplificação do processo inflamatório associado a uma lesão muscular, pois participa ativamente da quimiotaxia dos macrófagos (TIDBALL, 2005; KAWANISHI et al., 2016; SUZUKI et al., 2022). Nesse sentido, observou-se que o tratamento tópico com o antagonista TRPA1, HC-030031 (0,05%) diminuiu a infiltração de células inflamatórias induzida pela lesão muscular traumática, corroborando com achados anteriores (KUDSI et al., 2020; HAUPENTHAL et al., 2020). Nosso estudo avaliou marcadores indiretos de infiltração de neutrófilos (MPO) e macrófagos (NAGase), pois essas células inflamatórias desempenham um papel essencial nos mecanismos subjacentes à lesão muscular (KAWANISHI et al., 2016; SUZUKI et al., 2022). O tratamento com o antagonista TRPA1, HC-030031 (0,05%) reduziu a atividade de MPO e NAGase após lesão muscular, e esses resultados foram confirmados pela histologia realizada. Há evidências crescentes que apoiam o papel do TRPA1 na infiltração de células inflamatórias em diferentes modelos de inflamação (FIALHO et al., 2020; ANTONIAZZI et al., 2020). Além disso, a administração tópica de TRPA1 em modelos de queimaduras por UVB e lesões térmicas atenua a resposta inflamatória (CAMPONOGARA et al., 2019; FIALHO et al., 2020; ANTONIAZZI et al., 2020). Estudos anteriores, por imunohistoquímica da fáscia e do tecido muscular, detectaram a infiltração de células imunes, principalmente neutrófilos e macrófagos e demonstraram que os neutrófilos liberando DNA extracelular eram predominantemente recrutados mais nos tecidos miofasciais, ou seja, na fáscia, do que nas fibras musculares (SUZUKI et al., 2022).

Além disso, essas células também suportam a infiltração de células inflamatórias no tecido danificado por meio da secreção de mediadores inflamatórios (TIDBALL, 2011; SUZUKI et al., 2022). Nesse sentido, avaliou-se os níveis das citocinas IL-1 β e IL-6 e detectou-se que o dano muscular aumentou os níveis de ambas as citocinas inflamatórias. Estudos anteriores usando o mesmo modelo animal

demonstraram um aumento nos níveis de citocinas inflamatórias no músculo gastrocnêmio (SILVEIRA et al., 2016; HAUPENTHAL et al., 2020; KUDSI et al., 2020). Notavelmente, o tratamento tópico com o antagonista TRPA1, HC-030031 0,05% reduziu os níveis de IL-1 β e IL-6 induzidos por lesão muscular. Além disso, os níveis reduzidos de citocinas inflamatórias podem ser explicados pela inibição da produção de compostos reativos e migração de células inflamatórias no tecido muscular após lesão muscular traumática (CAMPONOGARA et al., 2020; KUDSI et al., 2020; HAUPENTHAL et al., 2020; SILVEIRA et al., 2016). Segundo Camponogara et al. (2020), em modelo de queimadura, observou-se que compostos oxidativos produzidos na pele modulam a expressão de citocinas inflamatórias por meio da ativação de fatores transcricionais sensíveis, como o fator nuclear Kappa B (NF- κ B) e conseqüentemente também a ativação do canal TRPA1 (CAMPONOGARA et al., 2020; SILVEIRA et al., 2016; BARBIERI et al., 2012). Nossos resultados concordam com achados anteriores, que mostram que a ativação do TRPA1 também leva à produção de citocinas inflamatórias (KUDSI et al., 2020; HAUPENTHAL et al., 2020; SILVEIRA et al., 2016).

A infiltração de macrófagos é importante na promoção de dano muscular, inicialmente devido à toxicidade mediada por NO (TIDBALL, 2011; KAWANISHI et al., 2016; SUSUKI et al., 2022). O NO é um potente vasodilatador que contribui para a resposta inflamatória após lesão muscular, promovendo a quimiotaxia de neutrófilos e macrófagos, tendo papel crucial na ativação de células satélites para reparo muscular (SILVEIRA et al., 2016). Anteriormente, o mesmo modelo de dano muscular foi descrito para aumentar a produção de NO (KUDSI et al., 2020). Descobriu-se que o tratamento tópico com o antagonista TRPA1 HC-030031 (0,05%) também reduziu os níveis de nitrito neste modelo de lesão muscular traumática. Foi relatado que o envolvimento do NO na dor musculoesquelética tardia (DOMS) diminui a força muscular, a sensação de dor e a regeneração (SONKODI; BERKES; KOLTAI, 2020; RADAK et al., 2012). Além disso, o NO tem um efeito vasodilatador protetor, mas seu radical pode danificar proteínas, lipídios e células, provavelmente resultando em falha energética e apoptose. O resultado desses distúrbios inclui aumento da nocicepção, bem como degeneração das fibras nervosas (SONKODI; BERKES; KOLTAI, 2020; RADAK et al., 2012). Ao mesmo tempo, o NO é conhecido por ativar o canal TRPA1 e é considerado um canal pró-algésico e um sensor de estresse oxidativo (TALAVERA et al., 2019; DE LOGU et al., 2022).

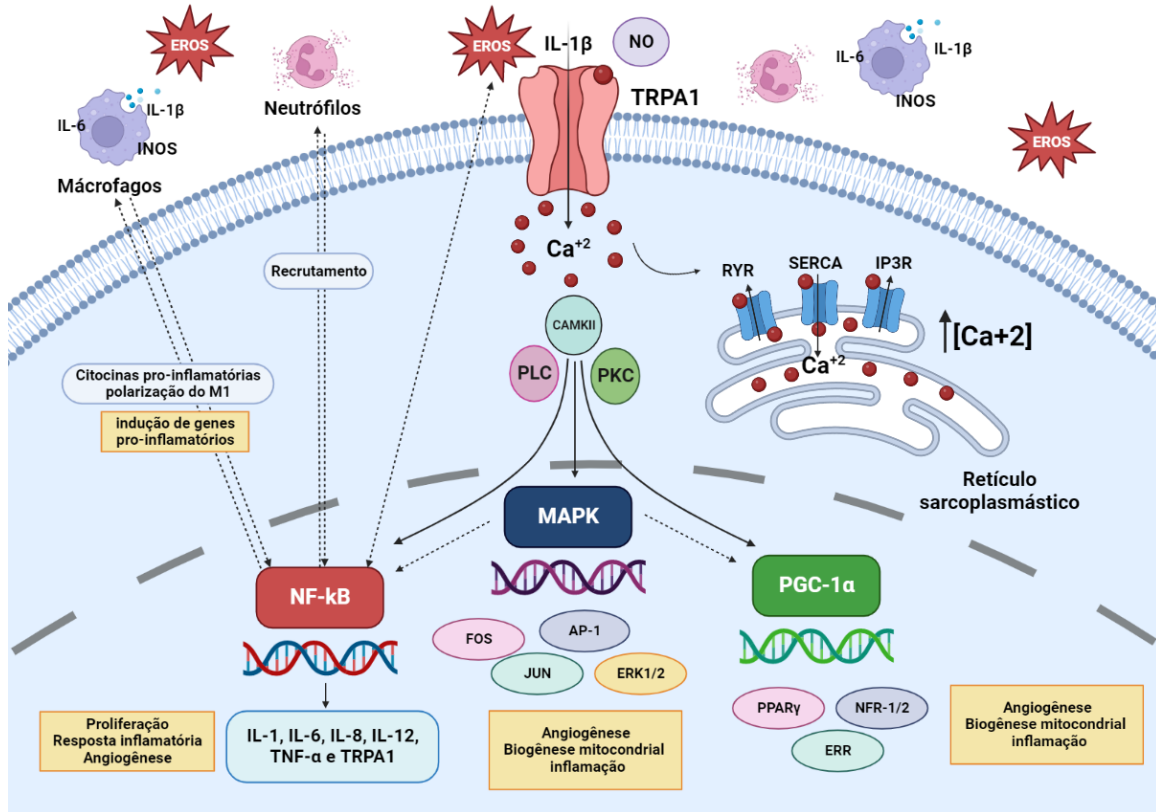
Nesse sentido, o modelo de lesão muscular traumática também promoveu a produção de espécies reativas de oxigênio, detectadas pelo ensaio de fluorescência DCF, que indica a capacidade de oxidação do tecido (SILVEIRA et al., 2016). Utilizando o mesmo modelo de lesão, Silveira et al. (2010) demonstraram que vários indicadores de estresse oxidativo foram aumentados após a lesão muscular. Nossos achados também concordam com resultados anteriores, que indicaram que a fluorescência do DCF foi aumentada no músculo gastrocnêmio a partir de um modelo de lesão muscular traumática (KUDSI et al., 2020; HAUPENTHAL et al., 2020). Evidenciou-se que o bloqueio farmacológico do TRPA1 reduziu a produção de compostos oxidativos após lesão muscular traumática avaliada por DCF e níveis de nitrito. Assim, as fibras nervosas sensoriais contribuem para a inflamação mediada por TRPA1 no músculo, que pode estar associada ao estresse oxidativo, pois substâncias reativas e seus subprodutos podem iniciar e manter a sensibilização/ativação neuronal do TRPA1 (CAMPONOVARA et al., 2020).

A ativação de TRPA1 causa influxo de cálcio promovido após a ligação de compostos oxidantes poderia manter a ativação contínua de enzimas pró-oxidantes (como NADPH oxidase), que por sua vez provocam proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) ou/e sinalização de NF- κ B (ANTONIAZZI et al., 2019; LEE et al., 2016; LIN et al., 2015). O antagonismo TRPA1 pode reduzir a produção de compostos oxidantes prejudicando a ativação posterior de NF- κ B e/ou MAPK, o que poderia causar o aumento da expressão de genes inflamatórios e dos canais TRPA1 no músculo lesado (ANTONIAZZI et al., 2019; KONDO et al., 2013; HATANO et al., 2012). Então, curiosamente, este modelo de lesão muscular causou níveis aumentados de mRNA para *Trpa1* no músculo gastrocnêmio e nos GRD. Além disso, os níveis de mRNA para *Trpa1* foram reduzidos após o tratamento com o antagonista de TRPA1, HC-030031 0.05%. Estudos anteriores demonstraram que a expressão funcional de TRPA1 é significativamente maior nos neurônios dos gânglios das raízes dorsais que inervam o músculo esquelético do que nos neurônios dos gânglios das raízes dorsais que inervam a pele (MALLIN et al., 2011). Além disso, estudos anteriores registraram correntes induzidas por AITC com ativação de TRPA1 em neurônios DRG de ratos inervando a porção branca dos músculos gastrocnêmio identificados por marcação retrógrada com o corante fluorescente Dil (XING; LI, 2017).

Além disso, a ativação do TRPA1 pode servir como um mediador fisiológico para sinais inflamatórios, melhora aspectos importantes do reparo do músculo

esquelético, como migração celular e fusão in vitro de mioblastos, e potencialmente também ativação de células satélites em humanos (OSTERLOH et al., 2017). Curiosamente, os níveis de expressão de TRPA1 e os transientes de Ca^{2+} induzíveis diminuem com a diferenciação contínua de mioblastos. Além disso, observou-se que a expressão e ativação de TRPA1 em miócitos cardíacos promovem o acúmulo de Ca^{2+} e o aumento da contração em um modelo de lesão de isquemia-reperfusão miocárdica e significativamente atenuada pelo antagonista de TRPA1 HC-030031 (CONKLIN et al., 2019). O aumento do cálcio intracelular está relacionado com a ativação de várias vias de sinalização subjacentes associadas ao processo inflamatório e doloroso, como a via calmodulina-calcineurina, via quinase dependente de cálcio-calmodulina II (CaMKII), outras proteínas quinases como proteína quinase A (PKA), proteína quinase C (PKC), proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e fatores de transcrição como PGC-1 α , AP-1 e NF- κ B que levam ao aumento da expressão de genes como *Fos*, *Jun*, *Erk1/2*, *PPAR γ* , *Nfr1/2* e *ERR*, os quais são importantes para mecanismos de dano e reparo muscular e atuam em processos como na angiogênese, inflamação e biogênese mitocondrial (LEE et al., 2016; CAMPONOGARA; OLIVEIRA, 2022; TAYLOR; BISHOP, 2022). Além disso, foi observada a expressão de TRPA1 e TRPV1 em aferentes musculares do músculo masseter, e a expressão desses canais é aumentada após a inflamação do masseter (RO et al., 2009; ASGAR et al., 2015; WANG et al., 2018). Então, o aumento da expressão de TRPA1 detectado neste estudo possivelmente é influenciado por aferentes gastrocnêmio do gânglio da raiz dorsal e expressão de proteínas do tecido muscular. No entanto, este ponto de discussão deve ser melhor elucidado usando este modelo de lesão muscular.

FIGURA 11 – Vias de sinalização presentes na dor musculoesquelética envolvendo TRPA1.



Legenda: O Receptor de potencial transitório anquirina 1 (TRPA1) pode ser sensibilizado por citocinas pro-inflamatórias como interleucina -1 β (IL-1 β), e ativado pelo óxido nítrico (NO) e por espécies reativas de oxigênio (EROs) causando influxo de cálcio. Nesse sentido, o influxo de cálcio pode ativar várias vias de sinalização como a ativação de proteínas quinases como PKC, PLC e CAMKII assim como fatores de transcrição como fator nuclear kappa B (NF-kB), proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e coativador 1 alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama (PGC-1 α). Ao mesmo tempo, o cálcio pode se ligar a receptores de cálcio presentes no retículo endoplasmático, que servem como depósito de cálcio, como a bomba de cálcio-ATPase (SERCA) levando o influxo de cálcio e receptores de inositol trifosfato (IP3R) e receptores de rianodina (RyR) que levam o efluxo de cálcio causando o aumento nos níveis de cálcio intracelular contribuindo ainda mais para ativação de mais vias de sinalização. O NF-kB pode ser ativado por EROS, citocinas pro-inflamatórias (IL-1 β e IL-6) e MAPK. Além disso, o NF-kB serve como um fator de transcrição para geração de citocinas pró-inflamatórias e o recrutamento de macrófagos. A ativação desses fatores de transcrição leva a expressão de genes como FOS, JUN, ERK1/2, PPAR γ , NFR1/2 e ERR, os quais são importantes para o reparo dano muscular e atuam na angiogênese, inflamação e biogênese mitocondrial. Essas vias de sinalização poderiam estar envolvidas em diferentes tipos celulares em miócitos, neutrófilos, neurônios sensoriais e macrófagos. Fonte: Do autor (2023).

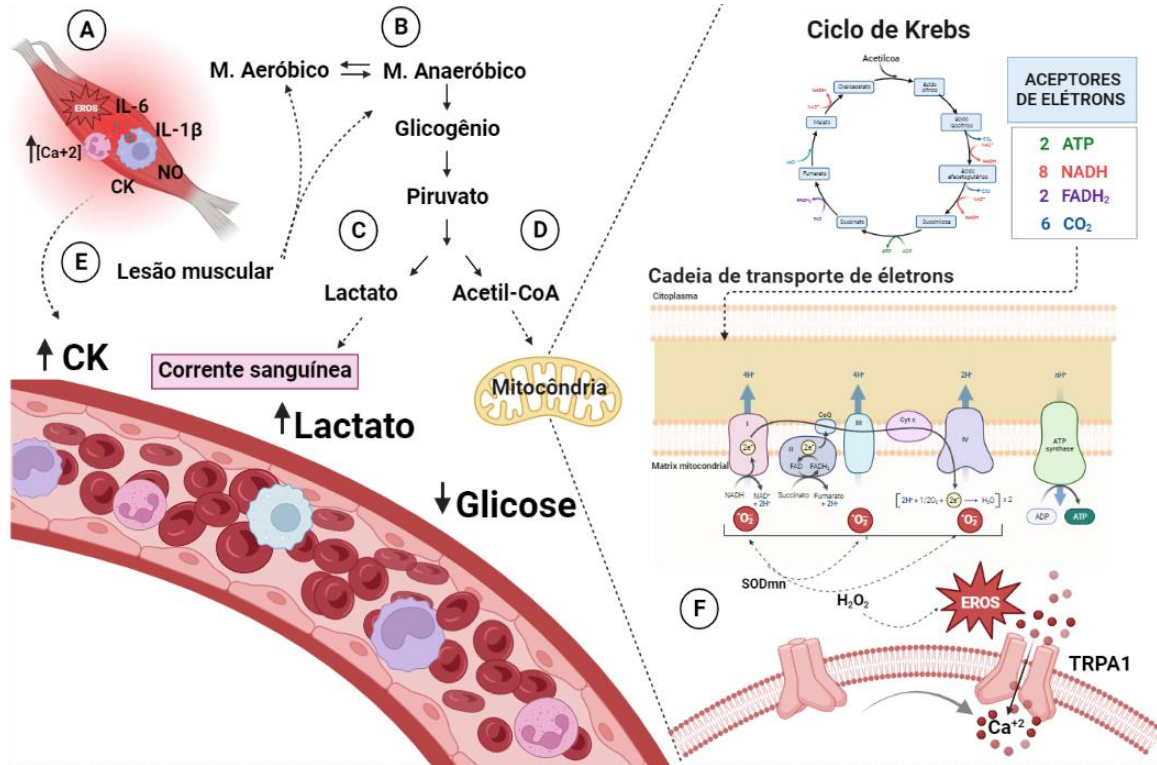
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados apresentados demonstram que o tratamento com antagonista TRPA1 HC-030031 0.05% nesse modelo de lesão muscular traumática em ratos reduziu os parâmetros nociceptivos espontâneos, inflamatórios e oxidativos, sem alterar a atividade locomotora dos animais.

Através dos resultados experimentais obtidos, podemos chegar as seguintes conclusões:

1. O antagonista TRPA1 HC-030031 0.05% tem efeito antinociceptivo nesse modelo de lesão muscular traumática em ratos.
2. O antagonista TRPA1 HC-030031 0.05% não altera a atividade locomotora e exploratória neste modelo de lesão muscular traumática em ratos.
3. O antagonista TRPA1 HC-030031 0.05% reduz parâmetros bioquímicos, inflamatórios e oxidativos neste modelo de lesão muscular traumática em ratos.
4. O antagonista TRPA1 HC-030031 0.05% foi de reduzir a resposta celular inflamatória em cortes histológicos do tecido muscular nesse modelo de lesão muscular traumática em ratos.
5. O antagonista TRPA1 HC-030031 0.05% foi capaz de reduzir o dos níveis de mRNA do receptor *Trpa1* em tecido muscular e GRD nesse modelo de lesão muscular traumática em ratos.

Figura 12 – Principais achados no modelo de lesão muscular traumática.



Legenda: A) O músculo esquelético após sofrer uma lesão muscular ocorre a transição do metabolismo aeróbico para anaeróbico. B) No metabolismo anaeróbico ocorre a quebra de glicogênio em piruvato. C) Por sua vez, o piruvato se transforma em lactato que é carregado por prótons para circulação sanguínea. D) A Acetil-CoA atua via mitocondrial no ciclo do ácido cítrico, mais conhecido como ciclo de Krebs, produzindo aceptores de elétrons que atuam na cadeia de elétrons gerando espécies reativas de oxigênio (EROs). E) O canal TRPA1 pode ser ativado por essas EROS ocorrendo o influxo de cálcio contribuindo para ativação de outras vias de sinalização dolorosas e inflamatórias. F) Além disso, após a lesão muscular, a creatina quinase (CK) é uma enzima de extravasamento que apresenta atividade aumentada e serve como biomarcador de lesões musculares. Fonte: Do autor (2023).

7 PERSPECTIVAS

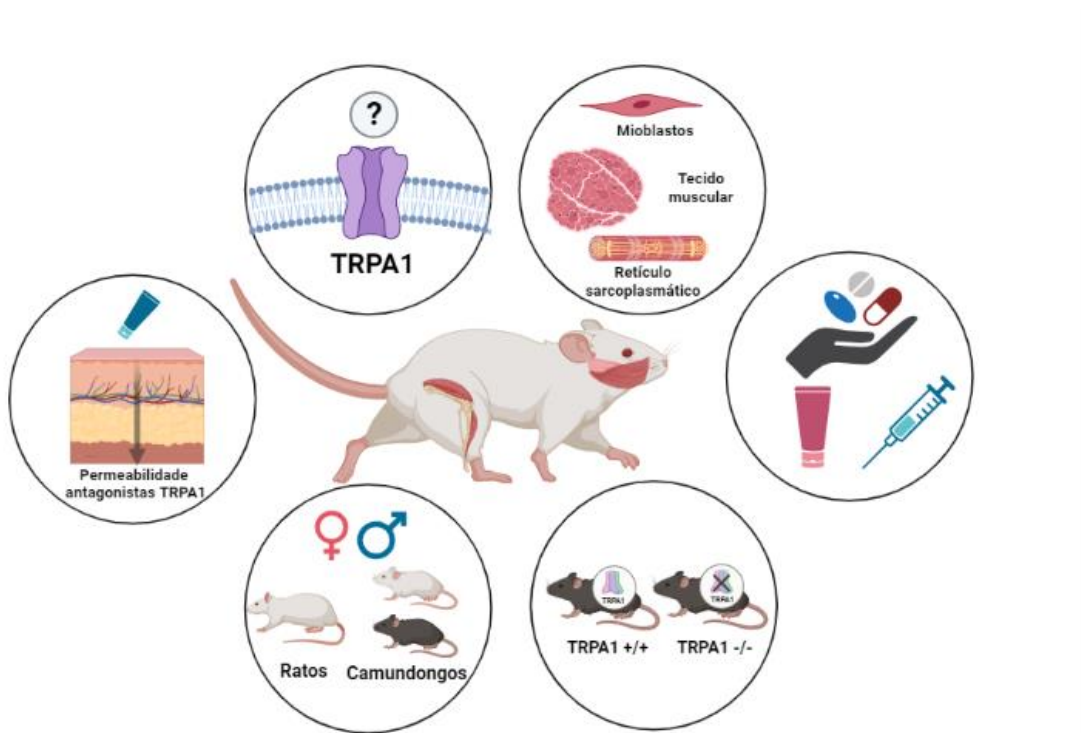
O modelo de lesão muscular traumática em ratos bem como o tratamento com antagonista TRPA1 HC-30031 0.05% foram caracterizados dentro do contexto central de dor musculoesquelética. Entretanto, outros mecanismos envolvidos na patogênese da dor musculoesquelética associada à lesão traumática, bem como alternativas terapêuticas, poderiam ser avaliados a partir deste modelo.

Pretende-se:

- Padronizar o modelo de lesão muscular traumática em ratos machos e fêmeas;
- Padronizar o modelo de lesão muscular traumática em camundongos C57BL/6 machos e fêmeas;
- Padronizar o modelo de lesão muscular traumática em camundongos selvagens (*Trpa1^{+/+}*) e camundongos nocautes (*Trpa1^{-/-}*);
- Observar a permeabilidade em tecido epidérmico e muscular de formulações semissólidas contendo antagonistas TRPA1 bem como controles positivos que serão utilizados nesse modelo de lesão muscular traumática em ratos machos e fêmeas;
- Padronizar controles positivos que possuam efeitos na nocicepção e inflamação observadas em um modelo de lesão muscular traumática em ratos machos e fêmeas;
- Avaliar a participação do receptor de potencial transitório anquirina 1 (TRPA1) na nocicepção e inflamação observadas em um modelo de lesão muscular traumática em ratos machos e fêmeas;
- Avaliar a participação do receptor de potencial transitório anquirina 1 (TRPA1) na nocicepção e inflamação observadas em um modelo de lesão muscular traumática em camundongos C57BL/6 machos e fêmeas;
- Estudar a expressão do receptor TRPA1 em tecidos miofasciais, tecidos musculares e aferentes musculares em um modelo de lesão muscular traumática em ratos machos e fêmeas;
- Estudar a expressão do receptor TRPA1 em tecidos miofasciais, tecidos musculares e aferentes musculares em um modelo de lesão muscular traumática em camundongos C57BL/6 machos e fêmeas;

- Estudar a expressão do receptor TRPA1 em células imunes para HIS8 (macrófagos) e CD68 (neutrófilos) em um modelo de lesão muscular traumática em ratos machos e fêmeas;
- Realizar cortes histológicos bem como técnicas como imunohistoquímica em tecido muscular em um modelo de lesão muscular traumática em ratos;
- Avaliar fatores de transcrição que estão presentes em vias de sinalização inflamatória e dolorosa e são importantes na miogênese.

Figura 13 - Perspectivas para novos estudos em modelo de lesão muscular traumática.



Legenda: Perspectivas de novos estudos pré-clínicos como a utilização de diferentes espécies de roedores dimórficos, animais nocautes para TRPA1, inserção de controles positivos, observação da permeabilidade de antagonistas TRPA1 na epiderme e no tecido muscular e observação da expressão de TRPA1 em diferentes regiões musculares e de fatores de transcrição importantes para sinalização da inflamação e dor. Fonte: Do autor (2023).

REFERÊNCIAS

- ABDEL-DAIM, Mohamed. *et al.* Lycopene Attenuates Tulathromycin and Diclofenac Sodium-Induced Cardiotoxicity in Mice. **International Journal of Molecular Sciences**, [S.l.], v. 19, n. 2, p. 344, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms19020344>.
- AHMED, Ahmady Y.; GAD, Amany M.; EL-RAOUF, Ola M. Abd. Curcumin ameliorates diclofenac sodium-induced nephrotoxicity in male albino rats. **Journal Of Biochemical and Molecular Toxicology**, [S.l.], v. 31, n. 10, p. 21951, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/jbt.21951>.
- ALMEIDA, Patrícia de. *et al.* Low-Level Laser Therapy and Sodium Diclofenac in Acute Inflammatory Response Induced by Skeletal Muscle Trauma: effects in muscle morphology and mrna gene expression of inflammatory markers. **Photochemistry And Photobiology**, [S.l.], v. 89, n. 2, p. 501-507, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1751-1097.2012.01232.x>.
- AMANN, Markus. *et al.* Autonomic responses to exercise: group iii/iv muscle afferents and fatigue. **Autonomic Neuroscience**, [S.l.], v. 188, p. 19-23, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.autneu.2014.10.018>.
- ANDERSEN, Johan H.; HAAHR, Jens P.; FROST, Poul. Risk factors for more severe regional musculoskeletal symptoms: a two-year prospective study of a general working population. **Arthritis & Rheumatism**, [S.l.], v. 56, n. 4, p. 1355-1364, 2007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/art.22513>.
- ANTONIAZZI, Caren T. *et al.* Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) plays a critical role in a mouse model of cancer pain. **International Journal of Cancer**, [S.l.], v. 144, n. 2, p. 355-365, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.31911>.
- APKARIAN, Apkar V. Definitions of nociception, pain, and chronic pain with implications regarding science and society. **Neuroscience Letters**, [S.l.], v. 702, p. 1-2, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2018.11.039>. Acesso em: 14 abr. 2022
- ARNOLD, Ludovic. *et al.* Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. **Journal of Experimental Medicine**, [S.l.], v. 204, n. 5, p. 1057-1069, 2007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20070075>
- ASGAR, J. *et al.* The role of TRPA1 in muscle pain and mechanical hypersensitivity under inflammatory conditions in rats. **Neuroscience**, [S.l.], v. 310, p. 206-215, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.09.042>.
- BAI, Xiaofeng; ZHANG, Xia; ZHOU, Qing. Effect of Testosterone on TRPV1 Expression in a Model of Orofacial Myositis Pain in the Rat. **Journal Of Molecular Neuroscience**, [S.l.], v. 64, n. 1, p. 93-101, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s12031-017-1009-7>.
- BALIKI, Marwan N.; APKARIAN, A. Vania. Nociception, Pain, Negative Moods, and Behavior Selection. **Neuron**, [S.l.], v. 87, n. 3, p. 474-491, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2015.06.005>. Acesso em: 14 abr. 2022

BARCELOS, Rômulo P. *et al.* Functional and biochemical adaptations of elite level futsal players from Brazil along a training season. **Medicina**, [S.l.], v. 53, n. 4, p. 285-293, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.medici.2017.08.001>.

BASBAUM, Allan I. *et al.* Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. **Cell**, [S.l.], v. 139, n. 2, p. 267-284, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2009.09.028>.

BAUTISTA, Diana M. *et al.* TRPA1 Mediates the Inflammatory Actions of Environmental Irritants and Proalgesic Agents. **Cell**, [S.l.], v. 124, n. 6, p. 1269-1282, 2006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.023>.

BENEMEI, Silvia; DUSSOR, Greg. TRP Channels and Migraine: recent developments and new therapeutic opportunities. **Pharmaceuticals**, [S.l.], v. 12, n. 2, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/ph12020054>.

BENNETT, David L H; WOODS, C Geoffrey. Painful and painless channelopathies. **The Lancet Neurology**, [S.L.], v. 13, n. 6, p. 587-599, 2014. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/s1474-4422\(14\)70024-9](http://dx.doi.org/10.1016/s1474-4422(14)70024-9).

BIANCHI, S. *et al.* Sonographic evaluation of tears of the gastrocnemius medial head. **Journal of Ultrasound in Medicine**, [S.l.], v. 17, n. 3, p. 157-162, 1998. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.7863/jum.1998.17.3.157>.

BOOKMAN, A. A.M. Effect of a topical diclofenac solution for relieving symptoms of primary osteoarthritis of the knee: a randomized controlled trial. **Canadian Medical Association Journal**, [S.l.], v. 171, n. 4, p. 333-338, 2004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1503/cmaj.1031793>

BRANCACCIO, Paola; LIPPI, Giuseppe; MAFFULLI, Nicola. Biochemical markers of muscular damage. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, [S.l.], v. 48, n. 6, p. 757-767, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1515/cclm.2010.179>.

BREIVIK, Harald. International Association for the Study of Pain. **Journal Of Pain and Symptom Management**, [S.l.], v. 24, n. 2, p. 97-101, 2002. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/s0885-3924\(02\)00465-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0885-3924(02)00465-7).

BRIGGS, Andrew M. *et al.* Reducing the global burden of musculoskeletal conditions. **Bulletin of the World Health Organization**, [S.l.], v. 96, n. 5, p. 366-368, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2471/blt.17.204891>.

BRIGO, Francesco *et al.* Postictal serum creatine kinase for the differential diagnosis of epileptic seizures and psychogenic non-epileptic seizures: a systematic review. **Journal Of Neurology**, [S.l.], v. 262, n. 2, p. 251-257, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00415-014-7369-9>.

CEAFALAN, Laura C. *et al.* Interstitial Outburst of Angiogenic Factors During Skeletal Muscle Regeneration After Acute Mechanical Trauma. **The Anatomical Record**, [S.l.], v. 298, n. 11, p. 1864-1879, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/ar.23254>.

CHANG, Yu-Wen; WAXMAN, Stephen G. Minocycline Attenuates Mechanical Allodynia and Central Sensitization Following Peripheral Second-Degree Burn Injury. **The Journal of Pain**, [S.l.], v. 11, n. 11, p. 1146-1154, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpain.2010.02.010>.

CHEN, Qiliang; HEINRICHER, Mary M. Descending Control Mechanisms and Chronic Pain. **Current Rheumatology Reports**, [S.l.], v. 21, n. 5, p. 13, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s11926-019-0813-1>. Acesso em: 15 abr. 2022

CHRISTOV, Christo *et al.* Muscle Satellite Cells and Endothelial Cells: close neighbors and privileged partners. **Molecular Biology of The Cell**, [S.l.], v. 18, n. 4, p. 1397-1409, 2007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.e06-08-0693>.

CHUNG, Man-Kyo *et al.* Transcriptome analysis of trigeminal ganglia following masseter muscle inflammation in rats. **Molecular Pain**, [S.l.], v. 12, p. 174480691666852, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1177/1744806916668526>

CIMMINO, Marco A.; FERRONE, Carmela; CUTOLO, Maurizio. Epidemiology of chronic musculoskeletal pain. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, [S.l.], v. 25, n. 2, p. 173-183, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.berh.2010.01.012>.

COELHO, Bertha A. *et al.* N-acetylglucosaminidase, myeloperoxidase and vascular endothelial growth factor serum levels in breast cancer patients. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [S.l.], v. 68, n. 2, p. 185-189, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2013.10.009>.

CONKLIN, Daniel J. *et al.* TRPA1 channel contributes to myocardial ischemia-reperfusion injury. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, [S.l.], v. 316, n. 4, p. 889-899, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.00106.2018>

CORDERO-ERAUSQUIN, Matilde *et al.* Neuronal networks and nociceptive processing in the dorsal horn of the spinal cord. **Neuroscience**, [S.l.], v. 338, p. 230-247, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.08.048>.

COSTIGAN, Michael; SCHOLZ, Joachim; WOOLF, Clifford J.. Neuropathic Pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. **Annual Review of Neuroscience**, [S.l.], v. 32, n. 1, p. 1-32, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.neuro.051508.135531>.

DALENOGARE, Diéssica P. *et al.* Transient receptor potential ankyrin 1 mediates headache-related cephalic allodynia in a mouse model of relapsing–remitting multiple sclerosis. **Pain**, [S.l.], v. 163, n. 7, p. 1346-1355, 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1097/j.pain.0000000000002520>.

DIXON, W J. Efficient Analysis of Experimental Observations. **Annual Review of Pharmacology And Toxicology**, [S.l.], v. 20, n. 1, p. 441-462, 1980. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.pa.20.040180.002301>.

DUBIN, Adrienne E.; PATAPOUTIAN, Ardem. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. **Journal Of Clinical Investigation**, [S.l.], v. 120, n. 11, p. 3760-3772, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1172/jci42843>

DUQUE, Guillermo Arango; DESCOTEAUX, Albert. Macrophage Cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. **Frontiers In Immunology**, [S.l.], v. 5, n. 7, p. 491, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2014.00491>.

EL-BENNA, Jamel *et al.* Priming of the neutrophil respiratory burst: role in host defense and inflammation. **Immunological Reviews**, [S.l.], v. 273, n. 1, p. 180-193, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/imr.12447>.

ENDO, Daiki *et al.* Myeloperoxidase negatively regulates the expression of proinflammatory cytokines and chemokines by zymosan-induced mouse neutrophils. **Inflammation Research**, [S.l.], v. 65, n. 2, p. 151-159, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00011-015-0899-5>

FANG, Yehong *et al.* Inhibition of Muscular Nociceptive Afferents via the Activation of Cutaneous Nociceptors in a Rat Model of Inflammatory Muscle Pain. **Neuroscience Bulletin**, [S.l.], v. 36, n. 1, p. 1-10, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s12264-019-00406-4>.

FATTORI, Victor *et al.* Capsaicin: current understanding of its mechanisms and therapy of pain and other pre-clinical and clinical uses. **Molecules**, [S.l.], v. 21, n. 7, p. 844, 2016 Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules21070844>

FERNANDES, Tiago Lazzaretti; PEDRINELLI, André; HERNANDEZ, Arnaldo José. Lesão muscular: fisiopatologia, diagnóstico, tratamento e apresentação clínica. **Revista Brasileira de Ortopedia**, [S.l.], v. 46, n. 3, p. 247-255, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-36162011000300003>.

FILOSTO, Massimiliano *et al.* Muscle pain in mitochondrial diseases: a picture from the italian network. **Journal Of Neurology**, [S.l.], v. 266, n. 4, p. 953-959, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00415-019-09219-x>.

FINNERUP, Nanna B. *et al.* Neuropathic pain: an updated grading system for research and clinical practice. **Pain**, [S.l.], v. 157, n. 8, p. 1599-1606, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000492>.

FINNERUP, Nanna Brix; KUNER, Rohini; JENSEN, Troels Staehelin. Neuropathic Pain: from mechanisms to treatment. **Physiological Reviews**, [S.l.], v. 101, n. 1, p. 259-301, 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00045.2019>.

FITZCHARLES, Mary-Ann *et al.* Nociceptive pain: towards an understanding of prevalent pain conditions. **The Lancet**, [S.l.], v. 397, n. 10289, p. 2098-2110, 2021. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(21\)00392-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(21)00392-5).

FRANCIO, Vinicius Tieppo *et al.* Oral Versus Topical Diclofenac Sodium in the Treatment of Osteoarthritis. **Journal Of Pain & Palliative Care Pharmacotherapy**, [S.l.], v. 31, n. 2, p. 113-120, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/15360288.2017.1301616>

FUJII, Yuko *et al.* TRP channels and ASICs mediate mechanical hyperalgesia in models of inflammatory muscle pain and delayed onset muscle soreness. **Pain**, [S.I.], v. 140, n. 2, p. 292-304, 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pain.2008.08.013>

GIORGI, Simona *et al.* Is TRPA1 Burning Down TRPV1 as Druggable Target for the Treatment of Chronic Pain? **International Journal of Molecular Sciences**, [S.I.], v. 20, n. 12, p. 2906, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20122906>.

GREGORY, Nicholas S. *et al.* Fatigue-enhanced hyperalgesia in response to muscle insult: induction and development occur in a sex-dependent manner. **Pain**, [S.I.], v. 154, n. 12, p. 2668-2676, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pain.2013.07.047>

GREGORY, Nicholas S.; SLUKA, Kathleen A. Anatomical and Physiological Factors Contributing to Chronic Muscle Pain. **Behavioral Neurobiology of Chronic Pain**, [S.I.], p. 327-348, 2014. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1007/7854_2014_294.

GREGORY, Nicholas S.; WHITLEY, Phillip E.; SLUKA, Kathleen A. Effect of Intramuscular Protons, Lactate, and ATP on Muscle Hyperalgesia in Rats. **Plos One**, [S.I.], v. 10, n. 9, p. 0138576, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0138576>.

GRINBERG, Keren *et al.* A common pronociceptive pain modulation profile typifying subgroups of chronic pelvic pain syndromes is interrelated with enhanced clinical pain. **Pain**, [S.I.], v. 158, n. 6, p. 1021-1029, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000869>

HATANO, Noriyuki *et al.* Hypoxia-inducible Factor-1 α (HIF1 α) Switches on Transient Receptor Potential Ankyrin Repeat 1 (TRPA1) Gene Expression via a Hypoxia Response Element-like Motif to Modulate Cytokine Release. **Journal Of Biological Chemistry**, [S.I.], v. 287, n. 38, p. 31962-31972, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m112.361139>.

HAUPENTHAL, Daniela P.S. *et al.* Effects of phonophoresis with diclofenac linked gold nanoparticles in model of traumatic muscle injury. **Materials Science and Engineering: C**, [S.I.], v. 110, p. 110681, 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2020.110681>

HOŞNUTER, Mübin *et al.* The effect of CAPE on lipid peroxidation and nitric oxide levels in the plasma of rats following thermal injury. **Burns**, [S.I.], v. 30, n. 2, p. 121-125, 2004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.burns.2003.09.022>.

HOWARD, Emily E. *et al.* Divergent Roles of Inflammation in Skeletal Muscle Recovery from Injury. **Frontiers In Physiology**, [S.I.], v. 11, p. 87, 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2020.00087>.

HUANG, Junting *et al.* A neuronal circuit for activating descending modulation of neuropathic pain. **Nature Neuroscience**, [S.I.], v. 22, n. 10, p. 1659-1668, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41593-019-0481-5>.

HUARD, Johnny *et al.* Muscle Injuries and Repair: what's new on the horizon!. **Cells Tissues Organs**, [S.I.], v. 202, n. 3-4, p. 227-236, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1159/000443926>.

HUEY, Kimberly A. *et al.* Skeletal myofiber VEGF is necessary for myogenic and contractile adaptations to functional overload of the plantaris in adult mice. **Journal Of Applied Physiology**, [S.I.], v. 120, n. 2, p. 188-195, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1152/jappphysiol.00638.2015>.

JAQUEMAR, Daniel; SCHENKER, Thomas; TRUEB, Beat. An Ankyrin-like Protein with Transmembrane Domains Is Specifically Lost after Oncogenic Transformation of Human Fibroblasts. **Journal Of Biological Chemistry**, [S.I.], v. 274, n. 11, p. 7325-7333, 1999. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.274.11.7325>.

JÄRVINEN, Tero A. H. *et al.* Muscle Injuries. **The American Journal of Sports Medicine**, [S.I.], v. 33, n. 5, p. 745-764, 2005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1177/0363546505274714>.

JENSEN, L.; BANGSBO, J.; HELLSTEN, Y. Effect of high intensity training on capillarization and presence of angiogenic factors in human skeletal muscle. **The Journal of Physiology**, [S.I.], v. 557, n. 2, p. 571-582, 2004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2003.057711>

JENSEN, Troels S. *et al.* A new definition of neuropathic pain. **Pain**, [S.I.], v. 152, n. 10, p. 2204-2205, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pain.2011.06.017>.

KÄÄRIÄINEN, Minna *et al.* Correlation between biomechanical and structural changes during the regeneration of skeletal muscle after laceration injury. **Journal Of Orthopaedic Research**, [S.I.], v. 16, n. 2, p. 197-206, 1998. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/jor.1100160207>

KATZ, Joel; ROSENBLOOM, Brittany N; FASHLER, Samantha. Chronic Pain, Psychopathology, and DSM-5 Somatic Symptom Disorder. **The Canadian Journal of Psychiatry**, [S.I.], v. 60, n. 4, p. 160-167, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1177/070674371506000402>.

KAWANISHI, Noriaki *et al.* Neutrophil Depletion Attenuates Muscle Injury after Exhaustive Exercise. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, [S.I.], v. 48, n. 10, p. 1917-1924, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1249/mss.0000000000000980>.

KHARRAZ, Yacine *et al.* Macrophage Plasticity and the Role of Inflammation in Skeletal Muscle Repair. **Mediators Of Inflammation**, [S.I.], v. 2013, p. 1-9, 2013. Hindawi Limited. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/491497>

KISHIDA, Tomoyuki *et al.* Increase in covalent binding of 5-hydroxydiclofenac to hepatic tissues in rats co-treated with lipopolysaccharide and diclofenac: involvement in the onset of diclofenac-induced idiosyncratic hepatotoxicity. **The Journal of Toxicological Sciences**, [S.I.], v. 37, n. 6, p. 1143-1156, 2012. Japanese Society of Toxicology. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2131/jts.37.1143>

KLEBANOFF, Seymour J. *et al.* Myeloperoxidase: a front-line defender against phagocytosed microorganisms. **Journal Of Leukocyte Biology**, [S.l.], v. 93, n. 2, p. 185-198, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1189/jlb.0712349>.

KNIGHTS, Chancie Bayer; GENTRY, Clive; BEVAN, Stuart. Partial medial meniscectomy produces osteoarthritis pain-related behaviour in female C57BL/6 mice. **Pain**, [S.l.], v. 153, n. 2, p. 281-292, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pain.2011.09.007>

KONDO, Takashi *et al.* Activation of p38 MAPK through transient receptor potential A1 in a rat model of gastric distension-induced visceral pain. **Neuroreport**, [S.l.], v. 24, n. 2, p. 68-72, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1097/wnr.0b013e32835c7df2>.

KOSEK, Eva *et al.* Evidence of different mediators of central inflammation in dysfunctional and inflammatory pain — Interleukin-8 in fibromyalgia and interleukin-1 β in rheumatoid arthritis. **Journal Of Neuroimmunology**, [S.l.], v. 280, p. 49-55, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jneuroim.2015.02.002>.

KRAEMER, William J. *et al.* Endogenous opioid peptide responses to opioid and anti-inflammatory medications following eccentric exercise-induced muscle damage. **Peptides**, [S.l.], v. 31, n. 1, p. 88-93, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2009.09.031>.

KREMERS, Mélanie *et al.* A Dual Noradrenergic Mechanism for the Relief of Neuropathic Allodynia by the Antidepressant Drugs Duloxetine and Amitriptyline. **The Journal of Neuroscience**, [S.l.], v. 38, n. 46, p. 9934-9954, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.1004-18.2018>.

KUDSI, Sabrina Qader *et al.* Transcriptional landscape of TRPV1, TRPA1, TRPV4, and TRPM8 channels throughout human tissues. **Life Sciences**, [S.l.], v. 308, p. 120977, 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2022.120977>

KUDSI, Sabrina Qader *et al.* Characterisation of nociception and inflammation observed in a traumatic muscle injury model in rats. **European Journal of Pharmacology**, [S.l.], v. 883, p. 173284, 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173284>.

LANDINI, Lorenzo *et al.* TRPA1 Role in Inflammatory Disorders: what is known so far?. **International Journal of Molecular Sciences**, [S.l.], v. 23, n. 9, p. 4529, 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms23094529>.

LAURIN, J. *et al.* Group III and IV muscle afferents: role on central motor drive and clinical implications. **Neuroscience**, [S.l.], v. 290, p. 543-551, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.01.065>.

LEE, Elaine C. *et al.* Biomarkers in Sports and Exercise: tracking health, performance, and recovery in athletes. **Journal Of Strength and Conditioning Research**, [S.l.], v. 31, n. 10, p. 2920-2937, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1519/jsc.0000000000002122>.

LEE, Jongseok *et al.* Functional interactions between NMDA receptors and TRPV1 in trigeminal sensory neurons mediate mechanical hyperalgesia in the rat masseter muscle. **Pain**, [S.I.], v. 153, n. 7, p. 1514-1524, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pain.2012.04.015>.

LEE, Kuan-I *et al.* Role of transient receptor potential ankyrin 1 channels in Alzheimer's disease. **Journal Of Neuroinflammation**, [S.I.], v. 13, n. 1, p. 92, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s12974-016-0557-z>.

LEVY, Michael *et al.* Prognostic Value of Troponin and Creatine Kinase Muscle and Brain Isoenzyme Measurement after Noncardiac Surgery. **Anesthesiology**, [S.I.], v. 114, n. 4, p. 796-806, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1097/aln.0b013e31820ad503>

LIN, An-Hsuan *et al.* Lung Epithelial TRPA1 Transduces the Extracellular ROS into Transcriptional Regulation of Lung Inflammation Induced by Cigarette Smoke: the role of influxed ca^{2+} . **Mediators Of Inflammation**, [S.I.], v. 2015, p. 1-16, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/148367>.

LOESER, John D.; TREEDE, Rolf-Detlef. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**, [S.I.], v. 137, n. 3, p. 473-477, 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pain.2008.04.025>

LOGU, Francesco *et al.* Schwann cell endosome CGRP signals elicit periorbital mechanical allodynia in mice. **Nature Communications**, [S.I.], v. 13, n. 1, p. 646, 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-022-28204-z>.

LOGU, Francesco *et al.* Schwann cells expressing nociceptive channel TRPA1 orchestrate ethanol-evoked neuropathic pain in mice. **Journal Of Clinical Investigation**, [S.I.], v. 129, n. 12, p. 5424-5441, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1172/jci128022>.

MAFFULLI N. *et al.* Muscle Injuries: A Brief Guide to Classification and Management. **Transl Med UniSa**, [S.I.], v. 12, p.14-18, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26535183/>

MAHDY, Mohamed A. Glycerol-induced injury as a new model of muscle regeneration. **Cell And Tissue Research**, [S.I.], v. 374, n. 2, p. 233-241, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00441-018-2846-6>.

MALIN, S. *et al.* TRPV1 and TRPA1 Function and Modulation Are Target Tissue Dependent. **Journal Of Neuroscience**, [S.I.], v. 31, n. 29, p. 10516-10528, 2011. Society for Neuroscience. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.2992-10.2011>

MANOJLOVIĆ, Vladimir; ERČULJ, Frane. Using blood lactate concentration to predict muscle damage and jump performance response to maximal stretch-shortening cycle exercise. **The Journal of Sports Medicine And Physical Fitness**, [S.I.], v. 59, n. 4, p. 581-586, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.23736/s0022-4707.18.08346-9>.

MANOJLOVIĆ, Vladimir; ERČULJ, Frane. Using blood lactate concentration to predict muscle damage and jump performance response to maximal stretch-shortening cycle

exercise. **The Journal Of Sports Medicine And Physical Fitness**, [S./], v. 59, n. 4, p. 581-586, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.23736/s0022-4707.18.08346-9>

MANTYH, Patrick W. The neurobiology of skeletal pain. **European Journal of Neuroscience**, [S./], v. 39, n. 3, p. 508-519, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/ejn.12462>.

MASON, Lorna *et al.* Systematic review of topical capsaicin for the treatment of chronic pain. **Bmj**, [S./], v. 328, n. 7446, p. 991, 2004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1136/bmj.38042.506748.ee>.

MATERAZZI, Serena *et al.* Cox-dependent fatty acid metabolites cause pain through activation of the irritant receptor TRPA1. **Proceedings of The National Academy Of Sciences**, [S./], v. 105, n. 33, p. 12045-12050, 2008. Disponível em : <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0802354105>.

MCCARBERG, Bill; PEPPIN, John. Pain Pathways and Nervous System Plasticity: learning and memory in pain. **Pain Medicine**, [S./], v. 20, n. 12, p. 2421-2437, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1093/pm/pnz017>.

MCCARSON, Kenneth E.; FEHRENBACHER, Jill C. Models of Inflammation: carrageenan or complete freund's adjuvant (cfa) induced edema and hypersensitivity in the rat. **Current Protocols**, [S./], v. 1, n. 7, p. 202, 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/cpz1.202>

MEACHAM, Kathleen *et al.* **Neuropathic Pain: Central vs. Peripheral Mechanisms**. New York: Springerlink, 2017. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11916-017-0629-5>. Acesso em: 21 abr. 2022

MENDES, Mariana Peluci Garcia *et al.* Effects of intravenous administration of recombinant Ph α 1 β toxin in a mouse model of fibromyalgia. **Toxicon**, [S./], v. 195, p. 104-110, 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2021.03.012>.

MENSE, Siegfried; GERWIN, Robert D. **Muscle Pain: Understanding the Mechanisms**. 13. ed. Berlin: Springer Berlin, Heidelberg, 2010. 323 p. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-3-540-85021-2>

MIRABELLI, Ersilia; ELKABES, Stella. Neuropathic Pain in Multiple Sclerosis and Its Animal Models: focus on mechanisms, knowledge gaps and future directions. **Frontiers In Neurology**, [S./], v. 12, p. 2300, 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fneur.2021.793745>.

MIYAZAKI, Daigo *et al.* Matrix metalloproteinase-2 ablation in dystrophin-deficient mdx muscles reduces angiogenesis resulting in impaired growth of regenerated muscle fibers. **Human Molecular Genetics**, [S./], v. 20, n. 9, p. 1787-1799, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddr062>.

MORAN, Magdalene M; SZALLASI, Arpad. Targeting nociceptive transient receptor potential channels to treat chronic pain: current state of the field. **British Journal of Pharmacology**, [S./], v. 175, n. 12, p. 2185-2203, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/bph.14044>.

MULEY, Milind M.; KRUSTEV, Eugene; MCDOUGALL, Jason J. Preclinical Assessment of Inflammatory Pain. **Cns Neuroscience & Therapeutics**, [S.I.], v. 22, n. 2, p. 88-101, 2015. Wiley. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/cns.12486>.

MURRAY, Sara E. *et al.* Timing of symptom improvement after parathyroidectomy for primary hyperparathyroidism. **Surgery**, [S.I.], v. 154, n. 6, p. 1463-1469, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.surg.2013.09.005>.

NASSINI, Romina *et al.* The TRPA1 Channel in Inflammatory and Neuropathic Pain and Migraine. **Reviews Of Physiology, Biochemistry and Pharmacology**, [S.I.], p. 1-43, 2014. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1007/112_2014_18.

NIELSEN, Christopher S. *et al.* Individual differences in pain sensitivity: genetic and environmental contributions. **Pain**, [S.I.], v. 136, n. 1, p. 21-29, 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pain.2007.06.008>.

NIJS, Jo *et al.* Nociceptive Pain Criteria or Recognition of Central Sensitization? Pain Phenotyping in the Past, Present and Future. **Journal Of Clinical Medicine**, [S.I.], v. 10, n. 15, p. 3203, 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/jcm10153203>.

NILIUS, Bernd; SZALLASI, Arpad. Transient Receptor Potential Channels as Drug Targets: from the science of basic research to the art of medicine. **Pharmacological Reviews**, [S.I.], v. 66, n. 3, p. 676-814, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1124/pr.113.008268>.

NOVAK, Margaret L. *et al.* Macrophage-Specific Expression of Urokinase-Type Plasminogen Activator Promotes Skeletal Muscle Regeneration. **The Journal of Immunology**, [S.I.], v. 187, n. 3, p. 1448-1457, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1004091>.

OCHOA, Oscar *et al.* Delayed angiogenesis and VEGF production in CCR2^{-/-} mice during impaired skeletal muscle regeneration. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, [S.I.], v. 293, n. 2, p. 651-661, 2007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1152/ajpregu.00069.2007>.

OEHLER, Beatrice *et al.* Inflammatory pain control by blocking oxidized phospholipid-mediated TRP channel activation. **Scientific Reports**, [S.I.], v. 7, n. 1, p. 5447, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-05348-3>.

OGLE, Molly *et al.* Monocytes and macrophages in tissue repair: implications for immunoregenerative biomaterial design. **Experimental Biology and Medicine**, [S.I.], v. 241, n. 10, p. 1084-1097, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1177/1535370216650293>.

ORR, Patty Montgomery; SHANK, Bettina Cobb; BLACK, Amy Conner. The Role of Pain Classification Systems in Pain Management. **Critical Care Nursing Clinics of North America**, [S.I.], v. 29, n. 4, p. 407-418, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cnc.2017.08.002>.

OSSIPOV, Michael H.; DUSSOR, Gregory O.; PORRECA, Frank. Central modulation of pain. **Journal Of Clinical Investigation**, [S.I.], v. 120, n. 11, p. 3779-3787, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1172/jci43766>.

OSTERLOH, Markus *et al.* Identification and functional characterization of TRPA1 in human myoblasts. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, [S.l.], v. 468, n. 2, p. 321-333, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00424-015-1729-x>.

PARIHAR, Arti *et al.* Oxidative stress and anti-oxidative mobilization in burn injury. **Burns**, [S.l.], v. 34, n. 1, p. 6-17, 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.burns.2007.04.009>.

PAULSEN, Candice E. *et al.* Structure of the TRPA1 ion channel suggests regulatory mechanisms. **Nature**, [S.l.], v. 520, n. 7548, p. 511-517, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nature14367>.

PEGORARO, Natháli S. *et al.* Nanoencapsulation of coenzyme Q10 and vitamin E acetate protects against UVB radiation-induced skin injury in mice. **Colloids And Surfaces B: Biointerfaces**, [S.l.], v. 150, p. 32-40, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.11.013>.

PERANDINI, Luiz Augusto *et al.* Chronic inflammation in skeletal muscle impairs satellite cells function during regeneration: can physical exercise restore the satellite cell niche? **The Febs Journal**, [S.l.], v. 285, n. 11, p. 1973-1984, 2018. Disponível em : <http://dx.doi.org/10.1111/febs.14417>.

PERROT, Serge *et al.* The IASP classification of chronic pain for ICD-11: chronic secondary musculoskeletal pain. **Pain**, [S.l.], v. 160, n. 1, p. 77-82, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001389>.

PINHO-RIBEIRO, Felipe A.; VERRI, Waldiceu A.; CHIU, Isaac M. Nociceptor Sensory Neuron–Immune Interactions in Pain and Inflammation. **Trends In Immunology**, [S.l.], v. 38, n. 1, p. 5-19, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2016.10.001>

QUEME, Luis F; JANKOWSKI, Michael P. Sex differences and mechanisms of muscle pain. **Current Opinion in Physiology**, [S.l.], v. 11, p. 1-6, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cophys.2019.03.006>.

RACKE, Michael K.; FROHMAN, Elliot M.; FROHMAN, Teresa. Pain in Multiple Sclerosis: understanding pathophysiology, diagnosis, and management through clinical vignettes. **Frontiers In Neurology**, [S.l.], v. 12, p. 799698, 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fneur.2021.799698>

RADAK, Zsolt *et al.* Nitric oxide: is it the cause of muscle soreness? **Nitric Oxide**, [S.l.], v. 26, n. 2, p. 89-94, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.niox.2011.12.005>

RAJA, Srinivasa N. *et al.* The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. **Pain**, [S.l.], v. 161, n. 9, p. 1976-1982, 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001939>.

RETAMOSO, Leandro T. *et al.* Increased xanthine oxidase-related ROS production and TRPV1 synthesis preceding DOMS post-eccentric exercise in rats. **Life**

Sciences, [S.I.], v. 152, p. 52-59, 2016. Disponível em:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2016.03.029>.

RHOADS, R. P. *et al.* Satellite cell-mediated angiogenesis in vitro coincides with a functional hypoxia-inducible factor pathway. **American Journal Of Physiology-Cell Physiology**, [S.I.], v. 296, n. 6, p. 1321-1328, 2009. Disponível em:
<http://dx.doi.org/10.1152/ajpcell.00391.2008>.

RIEMANN, Anne *et al.* Acidic Environment Leads to ROS-Induced MAPK Signaling in Cancer Cells. **Plos One**, [S.I.], v. 6, n. 7, p. 22445, 2011. Disponível em:
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0022445>.

RIZZI, Carem F. *et al.* Effects of low-level laser therapy (LLLT) on the nuclear factor (NF)- κ B signaling pathway in traumatized muscle. **Lasers In Surgery and Medicine**, [S.I.], v. 38, n. 7, p. 704-713, 2006. Disponível em:
<http://dx.doi.org/10.1002/lsm.20371>.

RO, Jin Y.; LEE, Jong-Seok; ZHANG, Youping. Activation of TRPV1 and TRPA1 leads to muscle nociception and mechanical hyperalgesia. **Pain**, [S.I.], v. 144, n. 3, p. 270-277, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pain.2009.04.02>

ROSA, C.G.S. *et al.* Effect of therapeutic ultrasound on the quadriceps muscle injury in rats - evaluation of oxidative stress and inflammatory process. **Am J Transl Res**, [S.I.], v. 10, n.11, p. 6660-6671, 2019. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31737216/>

RUELA, Guilherme de Andrade *et al.* Job stress and chronic and widespread musculoskeletal pain: a cross-sectional analysis from the brazilian longitudinal study of adult health musculoskeletal. **Pain**, [S.I.], v. 163, n. 10, p. 2044-2051, 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1097/j.pain.0000000000002602>.

SACLIER, Marielle *et al.* Monocyte/macrophage interactions with myogenic precursor cells during skeletal muscle regeneration. **Febs Journal**, [S.I.], v. 280, n. 17, p. 4118-4130, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/febs.12166>.

SALOMAN, J.L.; CHUNG, M.-K.; RO, J.y. P2X3 and TRPV1 functionally interact and mediate sensitization of trigeminal sensory neurons. **Neuroscience**, [S.I.], v. 232, p. 226-238, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.11.015>.

SCHOFIELD, Deborah J. *et al.* Lost productive life years caused by chronic conditions in Australians aged 45–64 years, 2010–2030. **Medical Journal Of Australia**, [S.I.], v. 203, n. 6, p. 260-260, 2015. Disponível em:
<http://dx.doi.org/10.5694/mja15.00132>.

SCHOLZ, Joachim *et al.* The IASP classification of chronic pain for ICD-11: chronic neuropathic pain. **Pain**, [S.I.], v. 160, n. 1, p. 53-59, 2019. Disponível em:
<http://dx.doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001365>.

SCHOU, Wendy Sophie *et al.* Calcitonin gene-related peptide and pain: a systematic review. **The Journal of Headache And Pain**, [S.I.], v. 18, n. 1, p. 34, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s10194-017-0741-2>.

- SERAFINI, Marta *et al.* Targeting Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1) Channel Softly: the discovery of passerini adducts as a topical treatment for inflammatory skin disorders. **Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.l.], v. 61, n. 10, p. 4436-4455, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00109>.
- SIERRA, Ana Paula Rennó *et al.* Angiotensin-Converting Enzyme Related-Polymorphisms on Inflammation, Muscle and Myocardial Damage After a Marathon Race. **Frontiers In Genetics**, [S.l.], v. 10, p. 984, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fgene.2019.00984>.
- SILVEIRA, Paulo C.L. *et al.* Effects of Therapeutic Pulsed Ultrasound and Dimethylsulfoxide (DMSO) Phonophoresis on Parameters of Oxidative Stress in Traumatized Muscle. **Ultrasound In Medicine & Biology**, [S.l.], v. 36, n. 1, p. 44-50, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2009.09.001>.
- SILVEIRA, Paulo Cesar L. *et al.* Low-level laser therapy attenuates the acute inflammatory response induced by muscle traumatic injury. **Free Radical Research**, [S.l.], v. 50, n. 5, p. 503-513, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3109/10715762.2016.1147649>.
- SIMONIC-KOCIJAN, Suncana *et al.* TRPV1 Channel-Mediated Bilateral Allodynia Induced by Unilateral Masseter Muscle Inflammation in Rats. **Molecular Pain**, [S.l.], v. 9, p. 1744-8069, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/1744-8069-9-6>
- SINGH, Daniel P. *et al.* Effects of Topical Icing on Inflammation, Angiogenesis, Revascularization, and Myofiber Regeneration in Skeletal Muscle Following Contusion Injury. **Frontiers In Physiology**, [S.l.], v. 8, n. 7, p. 93, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2017.00093>.
- SOEHNLEIN, Oliver; LINDBOM, Lennart; WEBER, Christian. Mechanisms underlying neutrophil-mediated monocyte recruitment. **Blood**, [S.l.], v. 114, n. 21, p. 4613-4623, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2009-06-221630>.
- SONKODI, Balazs; BERKES, Istvan; KOLTAI, Erika. Have We Looked in the Wrong Direction for More Than 100 Years? Delayed Onset Muscle Soreness Is, in Fact, Neural Microdamage Rather Than Muscle Damage. **Antioxidants**, [S.l.], v. 9, n. 3, p. 212, 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/antiox9030212>.
- SPEKKER, Eleonóra; KÖRTÉSI, Tamás; VÉCSEI, László. TRP Channels: recent development in translational research and potential therapeutic targets in migraine. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.l.], v. 24, n. 1, p. 700, 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms24010700>
- STAUD, Roland; RODRIGUEZ, Miguel e. Mechanisms of Disease: pain in fibromyalgia syndrome. **Nature Clinical Practice Rheumatology**, [S.l.], v. 2, n. 2, p. 90-98, 2006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/ncprheum0091>.
- SUGIYAMA, Daisuke *et al.* Hydrogen Peroxide Induces Muscle Nociception via Transient Receptor Potential Ankyrin 1 Receptors. **Anesthesiology**, [S.l.], v. 127, n. 4, p. 695-708, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1097/aln.0000000000001756>.

SUGIYAMA, Daisuke; KANG, Sinyoung; BRENNAN, Timothy J. Muscle Reactive Oxygen Species (ROS) Contribute to Post-Incisional Guarding via the TRPA1 Receptor. **Plos One**, [S./], v. 12, n. 1, p. 170410, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0170410>.

SUZUKI, Kazuaki *et al.* Tissue accumulation of neutrophil extracellular traps mediates muscle hyperalgesia in a mouse model. **Scientific Reports**, [S./], v. 12, n. 1, p. 4136, 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-022-07916-8>.

TAKIZAWA, Mai *et al.* Transient receptor potential ankyrin 1 channels are involved in spontaneous peptide hormone release from astrocytes. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, [S./], v. 501, n. 4, p. 988-995, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.05.097>.

TALAVERA, Karel *et al.* Mammalian Transient Receptor Potential TRPA1 Channels: from structure to disease. **Physiological Reviews**, [S./], v. 100, n. 2, p. 725-803, 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00005.201>

TALAVERA, Karel *et al.* Mammalian Transient Receptor Potential TRPA1 Channels: from structure to disease. **Physiological Reviews**, [S./], v. 100, n. 2, p. 725-803, 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00005.2019>.

TAYLOR, Dale F.; BISHOP, David J. Transcription Factor Movement and Exercise-Induced Mitochondrial Biogenesis in Human Skeletal Muscle: current knowledge and future perspectives. **International Journal of Molecular Sciences**, [S./], v. 23, n. 3, p. 1517, 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms23031517>.

THEOFILIDIS, George *et al.* Monitoring Exercise-Induced Muscle Fatigue and Adaptations: making sense of popular or emerging indices and biomarkers. **Sports**, [S./], v. 6, n. 4, p. 153, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/sports6040153>.

THIRUPATHI, Anand; PINHO, Ricardo A. Effects of reactive oxygen species and interplay of antioxidants during physical exercise in skeletal muscles. **Journal Of Physiology and Biochemistry**, [S./], v. 74, n. 3, p. 359-367, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s13105-018-0633-1>.

TIAN, Chao *et al.* Transient Receptor Potential Ankyrin 1 Contributes to Lysophosphatidylcholine-Induced Intracellular Calcium Regulation and THP-1-Derived Macrophage Activation. **The Journal of Membrane Biology**, [S./], v. 253, n. 1, p. 43-55, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00232-019-00104-2>.

TIDBALL, James G. Inflammatory processes in muscle injury and repair. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, [S./], v. 288, n. 2, p. 345-353, 2005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1152/ajprequ.00454.2004>.

TIDBALL, James G. Mechanisms of Muscle Injury, Repair, and Regeneration. **Comprehensive Physiology**, [S./], p. 2029-2062, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/cphy.c100092>

TREEDE, Rolf-Detlef *et al.* Chronic pain as a symptom or a disease: the iasp classification of chronic pain for the international classification of diseases (ICD-

11). **Pain**, [S.I.], v. 160, n. 1, p. 19-27, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001384>.

TREVISAN, Gabriela *et al.* TRPA1 mediates trigeminal neuropathic pain in mice downstream of monocytes/macrophages and oxidative stress. **Brain**, [S.I.], v. 139, n. 5, p. 1361-1377, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1093/brain/aww038>.

VAN WALSEM, Anneloes *et al.* Relative benefit-risk comparing diclofenac to other traditional non-steroidal anti-inflammatory drugs and cyclooxygenase-2 inhibitors in patients with osteoarthritis or rheumatoid arthritis: a network meta-analysis. **Arthritis Research & Therapy**, [S.I.], v. 17, n. 1, p. 1-18, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s13075-015-0554-0>.

VIANA, Félix. TRPA1 channels: molecular sentinels of cellular stress and tissue damage. **The Journal Of Physiology**, [S.I.], v. 594, n. 15, p. 4151-4169, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1113/jp270935>.

VIERO, Fernanda T. *et al.* Unpredictable Sound Stress Model Causes Migraine-Like Behaviors in Mice With Sexual Dimorphism. **Frontiers In Pharmacology**, [S.I.], v. 13, n. 1, p. 911105, 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2022.911105>.

VOLPI, Piero *et al.* Muscle strains in soccer: a five-year survey of an italian major league team. **Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy**, [S.I.], v. 12, n. 5, p. 482-485, 2004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00167-003-0478-0>.

VON HEHN, Christian A.; BARON, Ralf; WOOLF, Clifford J. Deconstructing the Neuropathic Pain Phenotype to Reveal Neural Mechanisms. **Neuron**, [S.I.], v. 73, n. 4, p. 638-652, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2012.02.008>.

WAGATSUMA, Akira. Endogenous expression of angiogenesis-related factors in response to muscle injury. **Molecular And Cellular Biochemistry**, [S.I.], v. 298, n. 1-2, p. 151-159, 2006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s11010-006-9361-x>.

WALDER, Roxanne Y. *et al.* TRPV1 is important for mechanical and heat sensitivity in uninjured animals and development of heat hypersensitivity after muscle inflammation. **Pain**, [S.I.], v. 153, n. 8, p. 1664-1672, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pain.2012.04.034>

WANG, Sheng *et al.* Roles of TRPV1 and TRPA1 in Spontaneous Pain from Inflamed Masseter Muscle. **Neuroscience**, [S.I.], v. 384, p. 290-299, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.05.048>.

WANG, Sheng *et al.* Spontaneous and Bite-Evoked Muscle Pain Are Mediated by a Common Nociceptive Pathway With Differential Contribution by TRPV1. **The Journal of Pain**, [S.L.], v. 18, n. 11, p. 1333-1345, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpain.2017.06.005>.

WEI, Yicheng *et al.* Function and therapeutic potential of transient receptor potential ankyrin 1 in fibrosis. **Frontiers in Pharmacology**, [S.I.], v. 13, p. 1014041, 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2022.1014041>.

WINTERBOURN, Christine C.; KETTLE, Anthony J.; HAMPTON, Mark B. Reactive Oxygen Species and Neutrophil Function. **Annual Review of Biochemistry**, [S.l.], v. 85, n. 1, p. 765-792, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014442>.

WONGRAKPANICH, Supakanya *et al.* A Comprehensive Review of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug Use in The Elderly. **Aging And Disease**, [S.l.], v. 9, n. 1, p. 143, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14336/ad.2017.0306>.

WOOLF, Clifford J. What is this thing called pain? **Journal Of Clinical Investigation**, [S.l.], v. 120, n. 11, p. 3742-3744, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1172/jci45178>.

XING, Jihong; LI, Jianhua. TRPA1 Function in Skeletal Muscle Sensory Neurons Following Femoral Artery Occlusion. **Cellular Physiology and Biochemistry**, [S.l.], v. 42, n. 6, p. 2307-2317, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1159/000480003>

YAM, Mun *et al.* General Pathways of Pain Sensation and the Major Neurotransmitters Involved in Pain Regulation. **International Journal of Molecular Sciences**, [S.l.], v. 19, n. 8, p. 2164, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms19082164>.

YANG, Wenjun; HU, Ping. Skeletal muscle regeneration is modulated by inflammation. **Journal Of Orthopaedic Translation**, [S.l.], v. 13, p. 25-32, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jot.2018.01.002>

YIN, Hang; PRICE, Feodor; RUDNICKI, Michael A. Satellite Cells and the Muscle Stem Cell Niche. **Physiological Reviews**, [S.l.], v. 93, n. 1, p. 23-67, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00043.2011>

ZUO, Qun *et al.* Response of macrophages in rat skeletal muscle after eccentric exercise. **Chinese Journal Of Traumatology**, [S.l.], v. 21, n. 2, p. 88-95, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cjtee.2017.12.001>.

ANEXOS

ANEXO A - CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA DE USO DE ANIMAIS



Comissão de Ética no Uso de Animais

da
Universidade Federal de Santa Maria

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação da participação do receptor de potencial transitório anquirina 1 (TRPA1) na nocicepção e inflamação observadas em um modelo de lesão muscular traumática em ratos", protocolada sob o CEUA nº 6579280218 (ID 001256), sob a responsabilidade de **Gabriela Trevisan dos Santos** e equipe; *Sabrina Qader Kudsi; Caren Tatiane de David Antoniazzi; Amanda Spring de Almeida; Camila dos Santos Ritter; Fernando Roberto Antunes Fernando Bellinaso; Diéssica Padilha Dalenogare; Joao Villanova do Amaral; Camila Camponogara Dalla Pozza; Sara Marchesan de Oliveira* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA/UFSM) na reunião de 22/03/2018.

We certify that the proposal "Evaluation of the participation of the transient potential receptor ankyrin 1 (TRPA1) in the nociception and inflammation observed in a model of traumatic muscle injury in rats.", utilizing 64 Heterogenics rats (64 males), protocol number CEUA 6579280218 (ID 001256), under the responsibility of **Gabriela Trevisan dos Santos** and team; *Sabrina Qader Kudsi; Caren Tatiane de David Antoniazzi; Amanda Spring de Almeida; Camila dos Santos Ritter; Fernando Roberto Antunes Fernando Bellinaso; Diéssica Padilha Dalenogare; Joao Villanova do Amaral; Camila Camponogara Dalla Pozza; Sara Marchesan de Oliveira* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Maria (CEUA/UFSM) in the meeting of 03/22/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **03/2018** a **03/2020**

Área: **Bioquímica E Biologia Molecular**

Origem: **Biotério Central UFSM**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **50 a 60 dias**

N: **64**

Linhagem: **Wistar**

Peso: **150 a 200 g**

Local do experimento: Sala 5206 - Laboratório de Fisiopatologia da dor experimental - prédio 21.

Santa Maria, 19 de julho de 2021

Prof. Dra. Patrícia Severo do Nascimento
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Saulo Tadeu Lemos Pinto Filho
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria

ANEXO B - CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA DE USO DE ANIMAIS



Comissão de Ética no Uso de Animais

da
Universidade Federal de Santa Maria

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação da participação do receptor TRPA1 na nocicepção e inflamação em um modelo de lesão muscular traumática em ratos.", protocolada sob o CEUA nº 8028131120 (10 003302), sob a responsabilidade de **Gabriela Trevisan dos Santos** e equipe: *Sabrina Qader Kudsi; Patrícia Rodrigues; Náthaly Andriquetto Ruviano da Silva; Diulle Spat Peres; Maria Carolina Theisen; Diéssica Padilha Dalenogare; Julia Maria Frare* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA/UFSM) na reunião de 19/01/2021.

We certify that the proposal "Evaluation of the participation TRPA1 receptor in the nociception and inflammation in a model of traumatic muscle injury in rats.", utilizing 32 Heterogenics rats (32 males), protocol number CEUA 8028131120 (10 003302), under the responsibility of **Gabriela Trevisan dos Santos** and team: *Sabrina Qader Kudsi; Patrícia Rodrigues; Náthaly Andriquetto Ruviano da Silva; Diulle Spat Peres; Maria Carolina Theisen; Diéssica Padilha Dalenogare; Julia Maria Frare* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Maria (CEUA/UFSM) in the meeting of 01/19/2021.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de 04/2021 a 03/2023

Área: Departamento de Fisiologia E Farmacologia

Origem: **Biotério Central UFSM**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **50 a 60 dias**

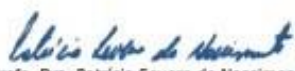
N: **32**

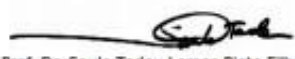
Linhagem: **Wistar**

Peso: **250 a 300 g**

Local do experimento: Laboratório da Fisiopatologia da Dor (sala 5206) - Neuronlab

Santa Maria, 19 de julho de 2021


 Prof. Dra. Patrícia Severo do Nascimento
 Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
 Universidade Federal de Santa Maria


 Prof. Dr. Saulo Tadeu Lemos Pinto Filho
 Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
 Universidade Federal de Santa Maria