



**CAROLINA OCANHA JORGE**

**ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES TRPV1 E TRPA1 NA  
HIPERALGESIA MUSCULAR INDUZIDA PELA CONTRAÇÃO  
ISOMÉTRICA SUSTENTADA NO MÚSCULO GASTROCNÊMIO  
DE RATOS**

**Limeira**

**2015**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS APLICADAS**

**CAROLINA OCANHA JORGE**

**ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES TRPV1 E TRPA1 NA  
HIPERALGESIA MUSCULAR INDUZIDA PELA CONTRAÇÃO  
ISOMÉTRICA SUSTENTADA NO MÚSCULO GASTROCNÊMIO  
DE RATOS**

Dissertação apresentada a Faculdade de Ciências Aplicadas para obtenção do Título de Mestra em Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo, na área de concentração Biodinâmica do Movimento Humano e Esporte.

Orientador(a): Prof(a). Dr(a) Maria Cláudia Gonçalves de Oliveira Fusaro  
Coorientador(a): Prof(a). Dr(a). Andrea Maculano Esteves

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL  
DISSERTAÇÃO/TESE DEFENDIDA PELO ALUNO  
CAROLINA OCANHA JORGE, E ORIENTADA PELO(A)  
PROF(A). DR(A). MARIA CLÁUDIA GONÇALVES DE  
OLIVEIRA FUSARO



**LIMEIRA,  
2015**

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Ciências Aplicadas  
Sueli Ferreira Júlio de Oliveira - CRB 8/2380

J768e Jorge, Carolina Ocanha, 1990-  
Envolvimento dos receptores TRPV1 e TRPA1 na hiperalgesia muscular induzida pela contração isométrica sustentada no músculo gastrocnêmio de ratos / Carolina Ocanha Jorge. – Campinas, SP : [s.n.], 2015.

Orientador: Maria Cláudia Gonçalves de Oliveira Fusaro.  
Coorientador: Andrea Maculano Esteves.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Aplicadas.

1. Mialgia. 2. Hiperalgesia. 3. Contração Isométrica. I. Oliveira-Fusaro, Maria Cláudia Gonçalves. II. Esteves, Andrea Maculano. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Aplicadas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Mechanical muscle hyperalgesia induced by sustained isometric contraction is modulated by TRPV1 and TRPA1 receptors

**Palavras-chave em inglês:**

Myalgia

Hyperalgesia

Isometric Contraction

**Área de concentração:** Biodinâmica do Movimento Humano e Esporte

**Titulação:** Mestra em Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo

**Banca examinadora:**

Maria Cláudia Gonçalves de Oliveira Fusaro [Orientador]

Alcides Guimarães

Juliana Trindade Clemente Napimoga

**Data de defesa:** 26-02-2015

**Programa de Pós-Graduação:** Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo

**Autor(a):** Carolina Ocanha Jorge

**Título:** Envolvimento dos receptores TRPV1 e TRPA1 na hiperalgesia muscular induzida pela contração isométrica sustentada no músculo gastrocnêmio de ratos

**Natureza:** Mestrado

**Instituição:** Faculdade de Ciências Aplicadas, Universidade Estadual de Campinas (FCA/UNICAMP)

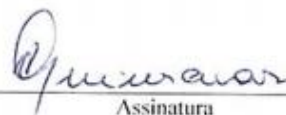
**Data da Defesa:** Limeira, 26 de fevereiro de 2015

**BANCA EXAMINADORA**

Prof(a). Dr(a) Andrea Maculano Esteves (co-orientador(a))

  
Assinatura

Prof(a). Dr(a). Alcides Guimarães

  
Assinatura

Prof(a). Dr(a). Juliana Trindade Clemente Napimoga

  
Assinatura



## RESUMO

A dor musculoesquelética é um importante problema de saúde mundial. Dentre todos os tipos de dor, àquela induzida pela contração isométrica sustentada está relacionada com os movimentos corporais nas atividades da vida diárias e apresenta um alto impacto socioeconômico. Apesar da sua relevância clínica, os mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento da dor muscular induzida pela contração isométrica sustentada são pouco conhecidos. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o envolvimento dos receptores TRPV1 e TRPA1 na hiperalgesia muscular mecânica induzida pela contração isométrica sustentada no músculo gastrocnêmio de ratos machos, da linhagem wistar. O antagonista seletivo do receptor TRPV1, AMG9810, reduziu significativamente a hiperalgesia muscular mecânica induzida pela contração isométrica sustentada quando administrado no músculo gastrocnêmio ipsilateral, mas não no contralateral. A administração intratecal de AMG9810 apresentou a mesma resposta. Similar ao TRPV1, a administração intramuscular e intratecal do antagonista seletivo do receptor TRPA1, HC030031, reduziu significativamente a hiperalgesia muscular induzida pela contração isométrica sustentada. No entanto, não foi observado modificação da expressão proteica dos receptores TRPV1 e TRPA1 no tecido muscular após a contração isométrica sustentada. Os dados sugerem que os receptores TRPV1 e TRPA1 expressos no músculo gastrocnêmio e corno dorsal da medula espinhal estão envolvidos na hiperalgesia muscular mecânica induzida pela contração isométrica sustentada em ratos. Sugerimos, portanto, que os receptores TRPV1 e TRPA1 co-expressos nas fibras aferentes primárias trabalhem juntos para ativar os nociceptores das fibras aferentes durante a contração isométrica sustentada. Além disso, nós sugerimos que os receptores TRPV1 e TRPA1 sejam potenciais alvos para o controle da dor muscular inflamatória.

**Palavras-chave:** Dor muscular, contração isométrica sustentada, receptores TRPV1 e TRPA1.



## ABSTRACT

Musculoskeletal pain is an important health issue in the world. Among the kinds of muscle pain, the one induced by sustained isometric contraction is associated with body movements of the daily life and has a high socio-economic impact. Despite its clinical relevance, the molecular mechanisms involved in the development of muscle pain induced by sustained isometric contraction are poorly understood. Therefore, the aim of this study was to evaluate the involvement of TRPV1 and TRPA1 receptors in the mechanical muscle hyperalgesia induced by sustained isometric contraction of the gastrocnemius muscle of rats. The selective TRPV1 receptor antagonist AMG 9810 reduced the mechanical muscle hyperalgesia induced by sustained isometric contraction when administered in the ipsilateral but not in the contralateral gastrocnemius muscle. Also, the intrathecal administration of AMG9810 reduced the same response. Similar to TRPV1, intramuscular and intrathecal administration of selective TRPA1 receptor antagonist HC030031 reduced the mechanical muscle hyperalgesia induced by sustained isometric contraction. Finally, the sustained isometric contraction did not modify the protein expression of TRPV1 and TRPA1 receptors in muscle tissue. We concluded that TRPV1 and TRPA1 receptors expressed in gastrocnemius muscle and spinal cord dorsal horn are involved with the mechanical muscle hyperalgesia induced by sustained isometric contraction in rats. We suggest that TRPV1 and TRPA1 receptors co-expressed in primary afferent fibers work together to activate nociceptive afferent fibers during sustained isometric contraction. Also, we suggest that TRPV1 and TRPA1 receptors are potential target to control inflammatory muscle pain.

**Keywords:** Muscle pain, sustained isometric contraction, TRPV1 and TRPA1 receptors



## **SUMÁRIO**

|                                   |           |
|-----------------------------------|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b>              | <b>1</b>  |
| <b>2. OBJETIVOS</b>               | <b>5</b>  |
| <b>3. CAPÍTULO – ARTIGO</b>       | <b>6</b>  |
| <b>4. DISCUSSÃO</b>               | <b>34</b> |
| <b>5. CONCLUSÃO</b>               | <b>38</b> |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> | <b>39</b> |
| <b>ANEXOS</b>                     | <b>49</b> |



## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos meus pais, Maria Paula e Sérgio, pelo amor incondicional dedicado a mim desde o primeiro minuto de minha existência e por me ensinarem o verdadeiro valor do saber. Ao meu irmão, Mateus, pela irmandade e exemplo de determinação.*



## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pelo dom da vida e por iluminar meus dias, alimentando sempre a minha fé.

Agradeço aos meus amados pais, minha Nita e meu Daddy, por ser meu porto seguro, por terem me proporcionado chegar até aqui e nunca desistir do objetivo traçado. Pelo amor sem limites e os conselhos certos. Não há palavras que descrevam minha gratidão e amor por vocês. Aprendi que podem nos tirar tudo, menos o nosso conhecimento. Eu os amo mais que tudo nessa vida.

Agradeço ao meu irmão, Teus, por ser meu amigo fiel, nunca me deixando esquecer que tenho com quem contar. Obrigada por ser meu Doutor, não só com tratamentos de doenças, mas sim por cultivar o amor de irmão. Você sempre será um exemplo para mim. Te amo sem limites, melhor irmão do mundo!

Agradeço ao Anderson, por ter vivenciado comigo este momento tão importante de minha vida.

Agradeço à dona Diva, seu Juvenil e a Sheila pela convivência gostosa que tivemos durante todos este tempo.

Agradeço à Laurinha, que chegou a pouco em nossa família, mas eu já gostei muito! Espero que permaneça nela por muito tempo! Obrigada pela alegria que trouxe.

Agradeço à Pontifícia Universidade Católica de Campinas pela ótima formação, onde pude conhecer bons mestres e aprender com eles.

Agradeço em especial a professora Maria Valéria Campomori (Valzinha) pelo incentivo desde cedo para seguir meu sonho de ser professora.

Agradeço muito a professora Maria Cláudia Gonçalves de Oliveira Fusaro, por ter aberto as portas de seu laboratório de pesquisa e me aceitado como sua aluna de mestrado. Obrigada pela confiança depositada em mim e por me ensinar tantas coisas científicas e pessoais. Agradeço ainda pelo amparo na finalização desse trabalho, mesmo que de tão longe, você ainda parecia perto.

Ao Professor Cláudio Fusaro, que sempre nos nossos encontros depositava um ânimo a mais para continuar a construir essa jornada. Antes disso, por ser aquele guia do caminho a seguir.

Agradeço à Faculdade de Ciências Aplicadas da UNICAMP de Limeira, juntamente ao programa de pós-graduação em Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo, por me proporcionar aprender com grandes docentes e, enfim me tornar mestre. Ainda, pela oportunidade de continuar.

Agradeço aos professores do programa de pós-graduação da FCA, pelos ensinamentos oferecidos e parcerias concedidas.

Agradeço ao Wagner, secretário da pós-graduação, pelo suporte oferecido nas burocracias impostas.

Agradeço a todos os funcionários da FCA pela manutenção de um ótimo ambiente de trabalho e pela companhia do dia-a-dia, finais de semana e feriados.

Agradeço a Jalile Garcia, por ter me ensinado os primeiros passos dentro de um laboratório.

Agradeço aos alunos de doutorado, Bruna e Diogo, por me receberem tão bem no laboratório da FCA, por fazerem parte da realização deste trabalho, em momentos bons e ruins.

Agradeço a todos os labedianos que sempre estiveram presentes nesta jornada de muito trabalho: Bruna, Diogo, Thaísa, Aline, Graciana, Gabriela, Mariana e Gabriel. Vocês, com certeza, serão lembrados sempre, ou melhor, ainda trabalharão muito comigo.

Agradeço, em especial, não só minha colega de laboratório, Bruna, mas também a minha amiga e companheira, Bru Bru, pela parceria de todas as horas, não só as de laboratório. Por todas as vezes que ofereceu seu tempo e conselhos para os meus surtos de desespero. Você é especial!

Agradeço ao Diogo, o Di, pela disposição em ajudar nos momentos mais difíceis. Obrigada também pelo incentivo.

Agradecimentos especiais também à aluna e amiga Graciana (Gra Gra) pelo companheirismo de sempre. Você é um sucesso!

Agradeço a aluna de doutorado, Simone, pela paciência, competência e carinho com que sempre me ajudou.

Agradeço a aluna da pós-graduação da FCA, Thaís, pela ajuda que me ofereceu, competência com que realizou e paciência que me ensinou. Sou muito grata por todo carinho e dedicação ao meu trabalho.

Agradeço, em especial, a profa. Dra. Adriana Torsoni pelo suporte oferecido na reta final do meu mestrado. Aprendi muito em seu laboratório. Obrigada pelo carinho.

Agradeço a Profa. Dra. Juliana Clemente Napimoga, pela parceria concedida, por sempre estar disposta a ajudar. Principalmente, pela paciência que levou todas as tentativas de realização dos meus experimentos. Aprendi muito em seu laboratório.

Agradeço ao professor Guimarães, por compartilhar sua sabedoria comigo e ao Tio Guima por sempre ter torcido por mim, desde pequenina. Junto a ele, meus agradecimentos à Tia Marília, André, Maca e Gui.

Agradeço aos alunos da FOP UNICAMP, Cristina, Fabiana, Patrícia, Andreia, Henrique, Ricardo e Luiz, pelo carinho oferecido no momento mais delicado para realização dos meus experimentos. Em especial, à Cris, pela persistência e paciência perante inúmeras tentativas. Agradeço todo conhecimento que me ofereceu.

Agradeço a nossa bioterista, Josiane, por cuidar muito bem dos nossos animais, bem como ao Leandro que assumiu seu lugar ao final do meu mestrado.

Agradeço aos meus amigos de kitnet, Gabi, Ruthinha, Rodrigo, Jun, Japa, Sérgio, Gabriel, Léo, Vampeta, Vivi, Milena, Onze e Ulisses, pela compreensão nos momentos de estresse exagerado e pela ótima convivência do cotidiano. Vocês tornam meus dias mais felizes!

Agradeço à Rosanne de Vitória, por ser uma super amiga e companheira desde o primeiro dia que mudei para Limeira. Por me tratar como se fosse sua filha. Muito obrigada, Rô Rô!

Agradeço a minha companheira de quarto, Gabi Bonita, por termos aprendido juntas como é difícil conviver com uma pessoa tão diferente em um espaço tão pequeno. Obrigada por todas as conversas, brigas e principalmente risadas.

Agradeço, em especial, minha amiga, minha florzinha, a Ruthinha, por se tornar uma pessoa tão amável e confiável em tão pouco tempo. Pelas longas conversas que acalmaram meu coraçãozinho. Obrigada pela parceria! Desejo que você tenha muito sucesso e não fique sem dar notícias, sentirei saudades!

Agradeço aos meus amigos de Faculdade, Bruna, Thiago e Douglas, pela convivência durante árduos 5 anos. Tenham certeza que fizeram a diferença para mim. Desejo muito sucesso a vocês.

Agradeço a minha melhor amiga de toda vida, Giovana, por nunca deixar que quilômetros de distância abalassem nossa amizade. Desde pequenina soubemos respeitar e apoiar uma a outra. Quero você sempre presente na minha vida, minha amiga-irmã, amo você!

Ao meu melhor amigo, Douglas, o Doug, por ser meu companheiro de estudos na faculdade, nunca se importando com meu jeito autoritário de ser. Obrigada pelo incentivo a minha caminhada. Desejo que você alcance todo sucesso!.

Agradeço a Ruth (amiga de são José), por sempre estar feliz e cuidar de nós com carinho.

Agradeço aos meus avós, Alcides Ocanha e José Jorge, meu vô Cide e meu vô Zé, por seus corações enormes, por terem me ensinado que saudades sentimos apenas de quem realmente marcou a nossa vida. Deste lugar aí de cima, meus avós amados, sintam meu agradecimento por tudo, eu amo vocês!

Agradeço às minhas avós lindas, Maria Aparecida e Therezinha, vó Cidinha e vó Thereza, por serem tão doces e terem feito parte de toda minha vida. Espero que possam assistir a realização de mais um sonho, o qual vocês, com certeza, ajudaram a construir.

Agradeço à minha Tia Rita e ao Tio Ricardo (em memória), por sempre torcerem por mim. Junto a eles, meus primos amados, Gi, Popó e Zé!

Agradeço aos meus padrinhos, Tia Andréia e Tio Marco, pelo carinho oferecido. Aos meus primos Marcão e Bruno também.

Agradeço também ao Tio Zé, Tia Márcia, Gabriela e Nathan por fazerem parte da minha família!

Agradeço ao Jú (em memória) e a Má de Amparo, por serem meus avós postiços e pelo amor sempre dedicado a mim.

Agradeço também ao tio Percio, Tia Tereza (em memória) e Carla por serem parte da minha família de vida!

Agradeço ao Tio Ruy e Vi pelo exemplo de grandes pessoas e profissionais. Agradeço também pelo incentivo desde sempre.

Agradeço a todos os familiares e amigos que, de alguma forma, torceram por mim e me ajudaram a chegar até aqui.



## EPÍGRAFE

*O amor é paciente, o amor é bondoso. Não tem inveja. O amor não é orgulhoso. Não é arrogante. Nem escandaloso. Não busca os seus próprios interesses, não se irrita, não guarda rancor. Não se alegra com a injustiça, mas se rejubila com a verdade. Tudo desculpa, tudo crê, tudo espera, tudo suporta. (I Cor 13: 4-7)*



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg – micrograma

µL – microlitro

ANOVA – Análise de variância

ATP – Adenosina trifosfato

Aδ – Fibra A delta

CFA – Complete Freund's adjuvante (Adjuvante Completo de Freund)

DRG – Dorsal root ganglia

g – gramas

GRD – Gânglio da raiz dorsal

Hz - Hertz

IASP – International Association for Study of Pain (Associação Internacional para Estudo da Dor)

L4 – vértebra lombar 4

L5 – vértebra lombar 5

min – minutos

mm – millimeters (milímetros)

ms – milissegundos

NaCl – Cloreto de Sódio

s – seconds (segundos)

SNC – Sistema nervoso central

TRP – Receptor de potencial transitório

TRPA1 – Receptor ionotrópico de potencial transitório A1

TRPV1 – Receptor vanilóide de potencial transitório 1

## LISTA DE SÍMBOLOS

° - Graus

< - menor

± - more or less (mais ou menos)

½ - half (meia)

δ - Delta

μ - micro



## 1. INTRODUÇÃO

Define-se dor como sendo uma “experiência sensorial e emocional desagradável associada a dano tecidual real ou potencial, ou descrita em termos desse potencial dano” (Associação Internacional para o Estudo da Dor – IASP). É uma experiência multidimensional, na qual estão envolvidos vários componentes: motivacional, emocional, sensório-discriminativo, afetivo e cognitivo (Mersky, 1986). Contém ainda influências de fatores como a idade (Riley et al. 2013), sexo (Amandusson e Blomqvist, 2013) e etnia (Palit et al. 2013; Matsudaira et al. 2013). Além disso, apesar do seu caráter desagradável, a dor é uma alerta de proteção ao indivíduo quando pensamos em estímulos danosos externos ou provenientes do próprio organismo.

A definição de dor abrange dois conceitos: o de percepção e o de nocicepção. A percepção é uma função integrativa do estímulo realizada a nível central e resultante de componentes cognitivo-motivacionais (Mersky, 1986) e a nocicepção é resultante da ativação de uma população de neurônios específicos que fazem a transmissão de um estímulo nocivo para as áreas centrais (Millan, 1999; Julius e Bausbaum, 2001). Partindo do princípio de que um estímulo nocivo é doloroso, ocorre a ativação de receptores específicos denominados nociceptores, ou seja, terminações nervosas livres presentes na maioria dos tecidos corporais, ativadas por estímulos de alto limiar, de natureza térmica, química ou mecânica (Mense, 2009).

A dor é um importante problema de saúde mundial. Em todo o mundo, estima-se que 1 em cada 5 adultos sofram de dor; além disso, 1 em cada 10 adultos é diagnosticado com dor crônica todo ano (Gureje et al., 1998; Breivik et al., 2006; Reid et al., 2011). Anualmente, os problemas decorrentes de condições dolorosas, custam aos Estados Unidos meio trilhão de dólares, medido em termos de utilização de cuidados de saúde, custo de um trabalhador afastado por motivos de saúde e o impacto sobre a qualidade de vida (Gaskin and Richard, 2012).

Especificamente, a dor muscular é o tipo de dor mais prevalente na população mundial (Andersen et al. 2007; Murray et al. 2013), afetando em torno de 13,5% e 47% da população geral e sendo responsável por 29% de abstinência em dias de trabalho e frequentes resultados no comprometimento das atividades de vida diárias (Cimmino et

al., 2011). Além disso, ela apresenta elevados índices de incapacidade física e laboral (Minson, 2009), perdendo apenas para doenças cardiovasculares em relação aos prejuízos socioeconômicos (Murray et al. 2013; Coogan et al. 2013, Nahit et al. 2013). A dor muscular apresenta ainda uma série de particularidades em relação às estruturas envolvidas no processamento do estímulo doloroso muscular, como os nociceptores, vias de condução, áreas cerebrais envolvidas com a percepção da dor (Mense e Gerwin, 2010), a liberação de citocinas pró-inflamatórias (Loram et al. 2007), formação de campos receptivos (Hoheisel et al. 1993; Mense, 1993; Yu et al. 1993) e a percepção de estímulos de natureza dolorosa (Dubner, 1991).

Sabe-se que fibras musculares não apresentam nociceptores, os quais estão distribuídos no perímio, camada adventícia das arteríolas e no tecido peritendíneo. Ainda que pouco compreendida, a estrutura dos nociceptores em imagens de microscopia eletrônica demonstra a presença de células de Schwann, com uma pequena área não recoberta, local onde há a ativação dos mesmos (Mense e Gerwin, 2010).

As vias aferentes conduzem a informação até o SNC após a ativação dos nociceptores e são classificadas no músculo de forma semelhante as dos órgãos viscerais. A dor aguda é conduzida por fibras tipo III, semelhantes às fibras A $\delta$  e a dor crônica por fibras tipo IV, que se assemelham às fibras C. As informações são conduzidas até o córtex cingulado anterior, córtex somatossensorial primário e secundário, córtex insular, tálamo e córtex pré-frontal, onde serão interpretadas (Apkarian et al. 2005; Lorenz e Casey, 2005; Henderson et al. 2007).

Existem vários mecanismos lesivos que levam a dor muscular, bem como, trauma, alongamento excessivo e contrações extenuantes ou sustentadas. A contração isométrica sustentada, ou seja, atividade muscular na ausência de movimentação articular por um tempo prolongado, é um padrão de contração muscular altamente associada com a dor muscular. Tem sido descrito que dores nos ombros/pescoço e parte superior do corpo associadas ao trabalho, pelo menos em parte, estão relacionadas à contração isométrica desses músculos de modo a estabilizar a cabeça e assegurar um campo visual estável (Dutia, 1991). A dor nas costas associada com trabalhadores que mantêm uma posição fletida por longos períodos de tempo resulta da

contração sustentada e prolongada desses músculos (McGill et al., 2000). Além disso, tem sido sugerido que a contração muscular do tipo isométrica de baixa intensidade é a principal causa de dores nas costas após períodos de descanso (Baum and Essfeld, 1999). Diferentes modelos experimentais desenvolvidos com humanos têm demonstrado que a contração isométrica sustentada do músculo masseter, trapézio ou quadríceps, em diferentes posições, induz dor muscular intensa (Kosek et al., 1996; Boix et al., 2005; Hedenberg-Magnusson et al., 2006). No entanto, apesar de sua relevância clínica, os mecanismos pelos quais a contração isométrica sustentada gera a dor não estão estabelecidos.

Recentemente nosso grupo de pesquisa desenvolveu um novo modelo de hiperalgesia muscular induzida pela contração isométrica sustentada em ratos. Nós demonstramos que a estimulação elétrica do músculo gastrocnêmio para indução da contração isométrica sustentada resulta em hiperalgesia muscular mecânica. Demonstramos também que este modelo está associado a um processo inflamatório, aumento dos níveis de creatina-quinase e não que há evidências histológicas de dano estrutural nas fibras musculares (dados não publicados).

Estudos indicam que vários membros da família do receptor de potencial transitório (TRP), denominados TRPV1 e TRPA1, funcionam tanto como transdutores sensoriais para estímulos mecânicos nocivos quanto desempenham um papel essencial no desenvolvimento da hipersensibilidade mecânica sob várias condições de dor (Levine and Alessandri-Haber, 2007). O receptor TRPV1 é um canal permeável ao cálcio, sendo ativado ou modulado por diversos estímulos nocivos exógenos e pela liberação de moléculas específicas durante um dano tecidual e processo inflamatório. Receptores TRPV1 são expressos em ambos os ramos periféricos e centrais de pequenos e médios (C e A $\delta$ ) neurônios do gânglio da raiz dorsal (GRD) (Caterina et al. 1997; Ji et al., 2002; Toth et al. 2005; Cristino et al. 2006; Fernandes et al. 2012; Vay et al. 2012). Tem sido descrito o envolvimento dos receptores TRPV1 em diferentes condições dolorosas (Caterina et al., 2000; Davis et al., 2000; Gavva et al., 2005; Honore et al., 2005; Rami et al., 2006; Walker et al., 2003; Ghilardi et al., 2005). Especificamente na dor muscular, os receptores TRPV1 modulam a dor muscular generalizada induzida pela acidez tecidual (Chen et al., 2014), hiperalgesia muscular

mecânica e térmica (Walder et al., 2012; Lee et al., 2012; Ro et al. 2009) e hiperalgesia visceral (Jones et al., 2005; Ravnefjord et al., 2009). Além disso, foi descrito que o antagonista seletivo do receptor TRPV1 reduz a hiperalgesia muscular mecânica induzida pela contração excêntrica (Fujii et al., 2008); e a administração de capsaicina, um agonista de TRPV1, no músculo masseter reduz o limiar nociceptivo mecânico em humanos e ratos (Arendt-Nielsen et al., 2008; Ro et al., 2009). O receptor TRPA1 (receptor ionotrópico de potencial transitório A1) é expresso seletivamente por um grupo não mielinizado de nociceptores peptidérgicos (Bautista et al., 2006 e Story et al., 2003), além de serem expressos em células não neuronais, como as queratinócitos, fibroblastos e mastócitos (Atoyan et al., 2009; Jain et al., 2001; Prasad et al., 2008). Recentemente, estudos demonstraram o envolvimento do receptor TRPA1 na hiperalgesia mecânica induzida pela carragenina (Bonet et al., 2013; Perin-Martins et al., 2013) e CFA (Petrus et al. 2007; Eid et al. 2008) no tecido subcutâneo e na dor neuropática (da Costa et al., 2010). Especificamente no tecido muscular, foi descrito que os receptores TRPA1 contribuem para a nocicepção muscular e hiperalgesia do músculo masseter de ratos (Ro et al., 2009).

Considerando as evidências do envolvimento dos receptores TRPV1 e TRPA1 na dor muscular e as relevâncias clínicas da dor muscular induzida pela contração isométrica sustentada, o objetivo deste estudo foi investigar como os receptores TRPV1 e TRPA1 periféricos e centrais contribuem para a hiperalgesia muscular mecânica induzida pela contração isométrica sustentada em ratos.

## 2. OBJETIVOS

Apesar da relevância clínica das dores musculares, os mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento da dor muscular induzida pela contração isométrica sustentada não foram totalmente esclarecidos. Portanto, o objetivo desse estudo foi verificar o envolvimento dos receptores TRPV1 e TRPA1 na hiperalgesia muscular induzida pela contração isométrica sustentada no músculo gastrocnêmio de ratos.

Os objetivos específicos foram:

1. Estudar o envolvimento dos receptores TRPV1 e TRPA1 expressos nos nociceptores aferentes primários na hiperalgesia muscular induzida pela contração isométrica sustentada no músculo gastrocnêmio de ratos. Para isso, testamos a habilidade dos antagonistas seletivos desses receptores em reduzir a hiperalgesia muscular induzida por contração isométrica sustentada.
2. Estudar o envolvimento dos receptores TRPV1 e TRPA1 expressos no gânglio da raiz dorsal na hiperalgesia muscular induzida pela contração isométrica sustentada do músculo gastrocnêmio de ratos. Para isso, testamos a habilidade dos antagonistas seletivos desses receptores em reduzir a hiperalgesia muscular induzida por contração isométrica sustentada quando administrados via intratecal.
3. Estudar a expressão dos receptores TRPV1 e TRPA1 no músculo gastrocnêmio de ratos.

### **3. CAPÍTULO**

Versão do artigo “Mechanical muscle hyperalgesia induced by sustained isometric contraction is modulated by TRPV1 and TRPA1 receptors” que foi submetido ao periódico “Life Sciences” (ANEXO 1)

## **Mechanical muscle hyperalgesia induced by sustained isometric contraction is modulated by TRPV1 and TRPA1 receptors**

Carolina Ocanha Jorge<sup>1</sup>

Bruna de Melo<sup>1</sup>

Diogo Francisco da Silva dos Santos<sup>1</sup>

Maria Cláudia Gonçalves de Oliveira-Fusaro<sup>\*1</sup>

1- Laboratory of Studies of Pain and Inflammation, School of Applied Sciences-  
UNICAMP – Limeira, SP, Brazil

\*Corresponding author:

School of Applied Sciences – State University of Campinas – UNICAMP

Pedro Zaccaria, 1300, Jd. Santa Luzia, Zip Code: 13484-350, Limeira, São Paulo –  
Brazil

Tel: + 55 – 19 – 37016726 Fax: + 55 – 19 – 37016680

E-mail address: maria.fusaro@fca.unicamp.br (Oliveira-Fusaro MCG)

## ABSTRACT

Musculoskeletal pain is an important health issue in the world. Among the kinds of muscle pain, the one induced by sustained isometric contraction is associated with body movements of the daily life and has a high socio-economic impact. Despite its clinical relevance, the molecular mechanisms involved in the development of muscle pain induced by sustained isometric contraction are poorly understood. Therefore, the aim of this study was to evaluate the involvement of TRPV1 and TRPA1 receptors in the mechanical muscle hyperalgesia induced by sustained isometric contraction of the gastrocnemius muscle of rats. The selective TRPV1 receptor antagonist AMG 9810 reduced the mechanical muscle hyperalgesia induced by sustained isometric contraction when administered in the ipsilateral but not in the contralateral gastrocnemius muscle. Also, the intrathecal administration of AMG9810 reduced the same response. Similar to TRPV1, intramuscular and intrathecal administration of selective TRPA1 receptor antagonist HC030031 reduced the mechanical muscle hyperalgesia induced by sustained isometric contraction. Finally, the sustained isometric contraction did not modify the protein expression of TRPV1 and TRPA1 receptors in muscle tissue. We concluded that TRPV1 and TRPA1 receptors expressed in gastrocnemius muscle and spinal cord dorsal horn are involved with the mechanical muscle hyperalgesia induced by sustained isometric contraction in rats. We suggest that TRPV1 and TRPA1 receptors co-expressed in primary afferent fibers work together to activate nociceptive afferent fibers during sustained isometric contraction. Also, we suggest that TRPV1 and TRPA1 receptors are potential target to control inflammatory muscle pain.

**Keywords:** Muscle pain, sustained isometric contraction, TRPV1 and TRPA1 receptors.

## INTRODUCTION

The sustained isometric contraction is a pattern of muscle contraction highly associated with muscle pain. It has been described that work-related pain on the shoulders/neck and upper body results from the sustained isometric contraction of these muscles in order to stabilize the head and to ensure a stable visual field (Dutia, 1991). The low back pain associated with workers who sit in a slightly flexed forward position for hours results from the sustained and prolonged isometric contractions of the low back muscles (McGill et al., 2000). Isometric low intensity muscle contractions are a primary cause of back pain during bed rest (Baum and Essfeld, 1999). Also, human studies demonstrated that sustained isometric contraction of the masseter, trapezius or quadriceps muscle induces intense muscle pain (Kosek et al., 1996; Boix et al., 2005; Hedenberg-Magnusson et al., 2006).

Studies indicate that members of the transient receptor potential (TRP) family, namely TRPV1 and TRPA1, function as either sensory transducers for noxious mechanical stimuli or play an essential role in the development of mechanical hypersensitivity (Levine and Alessandri-Haber, 2007). The TRP vanilloid 1 (TRPV1) is a calcium-permeable channel which are activated by diverse exogenous noxious stimuli and by selected molecules released during tissue damage and inflammatory processes. TRPV1 receptors are expressed in both the peripheral and central branches of small and medium sized (C and A $\delta$ ) dorsal root ganglia (DRG) neurons (Fernandes *et al.* 2012; Vay et al. 2012). It has been described the involvement of TRPV1 receptors in different painful conditions. Specifically on muscle pain, TRPV1 receptors modulate the acid-induced widespread muscle pain (Chen et al., 2014), the mechanical and heat muscle hyperalgesia (Walder et al., 2012; Lee et al., 2012; Ro et al. 2009) and visceral

hyperalgesia (Jones et al., 2005). Also, TRPV1 receptor antagonists reduce the mechanical muscle hyperalgesia induced by eccentric contraction (Fujii et al., 2008); and the administration of an agonist of TRPV1, into masseter muscle decrease the mechanical nociceptive threshold of humans and rats (Arendt-Nielsen et al., 2008; Ro et al., 2009). TRPA1 (formerly ANKTM1) is selectively expressed by a subset of unmyelinated, peptidergic nociceptors that also express TRPV1 (Bautista et al., 2006 and Story et al., 2003) and is also expressed in non neuronal cells (Atoyan et al., 2009; Jain et al., 2011; Prasad et al., 2008). Recently studies demonstrate the involvement of TRPA1 in mechanical hyperalgesia induced by carrageenan (Bonet et al., 2013; Perin-Martins et al., 2013) and CFA (Petrus et al. 2007; Eid et al. 2008) in subcutaneous tissue and by neuropathic injury (da Costa et al., 2010). In muscle tissue, TRPA1 receptors contributes to muscle nociception and hyperalgesia of masseter muscle of rats (Ro et al., 2009).

Considering the evidences of involvement of TRPV1 and TRPA1 in muscle pain and the clinical relevance of muscle pain induced by sustained isometric contraction, the aim of this study was to investigate whether peripheral and central TRPV1 and TRPA1 receptors contribute to mechanical muscle hyperalgesia induced by sustained isometric contraction in rats.

## **EXPERIMENTAL PROCEDURES**

### **Animals**

Male albino Wistar rats weighing 200-250g were used. Experiments were conducted in accordance with the guidelines of the IASP guidelines on using laboratory animals (Zimmermann, 1983). All animal experimental procedures and protocols were approved by the Committee on Animal Research of the State of University of Campinas – UNICAMP, protocol number 3277-1. Animal suffering and number of animals per group were kept at a minimum (5 animals/group). The animals were housed in plastic cages with soft bedding (five/cage) on a 12-hour light/dark cycle (lights on at 06:00 AM) with food and water available *ad libitum*. They were maintained on a temperature-controlled room test ( $\pm 23^{\circ}\text{C}$ ) for one hour habituation period prior to the test.

### **Model of Induction of Sustained Isometric Contraction**

In order to induce the sustained isometric contraction, mice were deeply anesthetized with 3–4% isoflurane. The sustained isometric contractions were produced by applying electrical pulses through two sterile needle electrodes inserted into the belly of the gastrocnemius muscle. The electrical pulses were generated by a Grass S88X stimulator (Grass Technologies, West Warwick, RI, USA). The modulation of electrical current was adjusted as follow: monophasic current, repeated pulse, 19 ms of pulse duration, frequency of 50Hz, voltage of 1.6 volts for 1 hour.

## **Drug injections**

### **Intramuscular injections**

Drugs or their vehicles were injected into the belly of the gastrocnemius muscle of rats with a 30-gauge needle, as previously described (Gautam and Benson, 2013). The needle was connected to a polyethylene catheter as well as to a Hamilton syringe (50µl). The animals were briefly restrained, for a period no longer than one minute, by wrapping them in a towel so that gastrocnemius muscle of both paws were available for injection procedures. There was no evidence of stress and the total volume administered was 50µl.

### **Intrathecal injections**

The method for intrathecal injection was based on the technique of Papir-Kricheli and colleagues (1987). Briefly, for each injection rats were anesthetized with 1/3 O<sub>2</sub> – 2/3 N<sub>2</sub>O and halothane at 5 and 1.5%, respectively (Le Bars et al. 1979). A 26-gauge needle was inserted in the subarachnoid space on the midline between L4 and L5 vertebrae. Drugs were injected at 1 µl/s in a volume of 10 µl. The animals regained consciousness approximately 1 min after discontinuing the anesthetic.

### **Drugs and Doses**

The following drugs were used: the selective TRPV1 receptor antagonist AMG9810 (35, 70 and 105µg/muscle or 0.03, 0.3 and 3.0µg, i.t.) and the selective TRPA1 receptor antagonist HC030031 (30, 100 and 300µg/muscle or 1.0, 4.0 and 16 µg, i.t.). AMG9810 and HC030031 were obtained from Sigma-Aldrich (Brazil). The stock

solution of these drugs was diluted in DMSO and after, to work concentration, they were diluted in 0.9% NaCl.

### **Mechanical Nociceptive Threshold Test**

Testing session took place during light phase (between 9:00 a.m. and 5:00 p.m.) in a quiet room maintained at 23°C (Rosland, 1991). The Randall-Selitto nociceptive paw-withdrawal flexion reflex test (Randall and Selitto, 1957) was performed using a Ugo-Basile analgesymeter (Stoelting, Chicago, IL, USA), which applies a linear mechanical force to the belly of the gastrocnemius muscle of rats (Fujii et al., 2008). The probe tip that touches the skin over the gastrocnemius muscle had 2.0 mm of diameter. This size has been described to reflect the pain threshold of deep tissues, such as muscles (Takahashi et al., 2006). The baseline muscle-withdrawal threshold was defined as the mean of three tests performed at five-minute intervals before sustained isometric contraction. Mechanical hyperalgesia was quantified as the change in mechanical nociceptive threshold calculated by subtracting the mean of three mechanical nociceptive threshold measurements taken 1 hour after the end of sustained isometric contraction. Therefore, an increase in y-axis represents an increased behavioral response. All experiments were performed with the tester blinded to treatment.

### **Western blot analysis of TRPV1 and TRPA1 receptor expression**

Four animals in each group were used for immunoblot study. Gastrocnemius muscles were extract 1 hour after the end of sustained isometric contraction and homogenized in cold RIPA buffer (1 % Igepal CA-630, 0.5 % sodium deoxycholate, 0.1%

SDS, 1 mM PMSF, 10 mg/ml aprotinin, 1 mM sodium orthovanadate in PBS buffer, pH 7.4) and stored at -70°C (Oliveira et al., 2009). The protein concentration was measured by BCA assay (Pierce, Rockford, IL, USA). Protein extracts were separated in a 10% sodium dodecylsulfate–polyacrylamide gels, transferred onto polyvinylidene difluoride membranes (Hybond; Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA), and probed for 1 hour with the primary antibodies anti-TRPA1 (Abcam, USA) (1:2000) and anti-TRPV1 (Santa Cruz, USA) (1:1000) diluted in TBST + 5% of low fat milk. After incubation with mouse or rabbit monoclonal secondary antibody (Invitrogen, USA, 1:2000), the reaction was revealed with Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA) Western blotting chemiluminescent detection reagents (Opti-4CN) into x-ray films (GE Healthcare, Fairfield, CT, USA). OD measurements were made with NIH Image 1.37 (National Institutes of Health, Bethesda, MD) for scanned membranes. To compensate any differences in the amount of loaded protein, the intensity of the TRPV1 or TRPA1 receptor band was divided by the intensity of alpha tubulin (Sigma, USA) band for each sample. After stripping, each membrane was incubated with antibody against alpha tubulin antibody that was used as an internal assay control.

### **Statistical Analysis**

For the time course of the withdrawal threshold change, a two-way repeated measure ANOVA, with one between-subject factor (i.e., treatment) and one within-subject factor (i.e., time) were used to determine whether there were significant ( $p < 0.05$ ) differences among the groups. If there was a significant difference between-subjects main effect of treatment group, post hoc contrasts using the Bonferroni test were performed to determine the basis of the significant difference. For data of other

figures, a one-way ANOVA or t-test was performed to determine whether there were significant differences ( $p < 0.05$ ) between the groups. If there was a significant between-subject main effect of treatment group following one-way ANOVA, post hoc contrasts, using the Tukey test, were performed to determine the basis of the significant difference. Data are expressed in the figures by the decrease in paw-withdrawal threshold and are presented as means  $\pm$  SEM.

## RESULTS

### **Involvement of TRPV1 receptors in mechanical muscle hyperalgesia induced by sustained isometric contraction**

To verify whether the mechanical muscle hyperalgesia induced by sustained isometric contraction was modulated by peripheral TRPV1 receptor, the selective antagonist, AMG9810, was administered into the belly of gastrocnemius muscle 5 minutes before the sustained isometric contraction. AMG9810 (70 and 105µg/muscle, but not 35µg) prevented ( $p < 0,05$ , ANOVA, Tukey test, Fig.1A) the mechanical muscle hyperalgesia when administered in the ipsilateral but not in the contralateral gastrocnemius muscle, confirming its local peripheral action. The administration of AMG9810 (105µg/muscle) in sham group (needles inserted into muscle without electrical current) did not affect the mechanical withdrawal threshold ( $p > 0,05$ , Tukey test, Fig.1A).

To verify whether the mechanical muscle hyperalgesia induced by sustained isometric contraction was modulated by TRPV1 receptors expressed in spinal cord, AMG9810 was administered by intrathecal injection, between L4-L5 level, 5 minutes before the sustained isometric contraction. AMG9810 (3.0, but not 0.3µg and 0,03µg) prevented ( $p < 0,05$ , Tukey test, Fig.1B) the mechanical muscle hyperalgesia.

### **Involvement of TRPA1 receptors in mechanical muscle hyperalgesia induced by sustained isometric contraction**

To verify whether the mechanical muscle hyperalgesia induced by sustained isometric contraction was modulated by peripheral TRPA1 receptor, the selective

antagonist, HC030031, was administered into the belly of gastrocnemius muscle 5 minutes before the sustained isometric contraction. HC030031 (100 and 300µg/muscle, but not 30µg) prevented ( $p < 0,05$ , ANOVA, Tukey test, Fig.2A) the mechanical muscle hyperalgesia when administered in the ipsilateral but not in the contralateral gastrocnemius muscle, confirming its local peripheral action. The administration of HC030031 (300µg/muscle) in sham group (needles inserted into muscle without electrical current) did not affect the mechanical withdrawal threshold ( $p > 0,05$ , Tukey test, Fig.2A).

To verify whether the mechanical muscle hyperalgesia induced by sustained isometric contraction was modulated by TRPA1 receptors expressed in spinal cord, HC030031 was administered by intrathecal injection, between L4-L5 level, 5 minutes before the sustained isometric contraction. HC030031 (1, 4 and 16µg) prevented ( $p < 0,05$ , Tukey test, Fig.2B) the mechanical muscle hyperalgesia.

### **Protein expression of TRPV1 and TRPA1 in gastrocnemius muscle after sustained isometric contraction**

To verify whether the sustained isometric contraction of gastrocnemius muscle modified the local protein expression of TRPV1 and TRPA1, muscle tissues were removed 1 hour after the end of sustained isometric contraction. The sustained isometric contraction did not modify the protein expression of both receptors when compared to sham group (Fig. 3A and 3B,  $p > 0.05$ , t-test).

## DISCUSSION

The present study demonstrated, for the first time, that TRPV1 and TRPA1 receptors expressed in gastrocnemius muscle and spinal cord dorsal horn, L4-L5 level, are involved with the mechanical muscle hyperalgesia induced by sustained isometric contraction in rats.

The mechanical muscle hyperalgesia induced by sustained isometric contraction is a model of muscle pain recently developed by our research group. We demonstrated that the sustained isometric contraction of submaximal intensity is able to induce mechanical muscle hyperalgesia ½ and 1 hour after the end of stimulation. Also, it was demonstrated that this mechanical muscle hyperalgesia is associated with an inflammatory process, increased levels of creatine kinase and no histological evidence of structural damage in muscle fibers (data not published). Specifically the involvement of an inflammatory process was demonstrated by the findings that the mechanical muscle hyperalgesia was reduced by pre-treatment with the anti-inflammatory steroidal dexamethasone and by the cyclooxygenase inhibitor indomethacin (data not published). Therefore, the blockade of mechanical muscle hyperalgesia by intramuscular or intrathecal administration of the selective TRPV1 receptor antagonist AMG 9810 suggest that activation of TRPV1 expressed on gastrocnemius muscle and spinal cord dorsal horn is essential to sensitization induced by final inflammatory mediators in primary afferent fibers. Several studies support our data that TRPV1 contributes to mechanical muscle hyperalgesia (Chen et al., 2014; Walder et al., 2012; Lee et al., 2012; Ro et al., 2009; Fujii et al., 2008). The mechanism by which TRPV1 contributes to this response is unknown. It is well know that inflammation is associated with a decrease in tissue pH, and a pH below 6.0 can directly activate the TRPV1 channel (Breese et al.,

2005; Caterina et al., 2000). Also, it has been described that the activity of TRPV1 receptors can be upregulated by lipid metabolites at mild/moderated acidic pH (Habler, 1929; Goldie and Nashemson, 1969; Huang et al., 2006) and that inflammatory mediators such as prostaglandins, bradykinin and ATP can sensitize TRPV1 channels through activation of a variety of G-coupled protein receptors and downstream activation of a number of protein kinases (Vellani et al., 2001; Crandall et al., 2002; Zhang et al., 2005; Huang et al., 2006), including protein kinases C and A. Therefore, considering that the mechanical muscle hyperalgesia induced by sustained isometric contraction is associated with an inflammatory process, it is possible to suggest that sustained isometric contraction induced release of inflammatory mediators associated with a decrease of pH, which in turn induced sensitization of TRPV1 receptors of primary afferent nociceptors and subsequent increasing of the nociceptive input to the spinal cord. It seems clear that substantial majority of TRPV1 receptors in the spinal cord dorsal horn is present presynaptically, on the central branches of primary afferents (Spicarova et al., 2014) and their activation increases glutamate release (Jeffry et al., 2009, Spicarova and Palecek, 2009), which in turn, increases the neural activity of the spinothalamic tract neurons (Kim et al., 2009). Based on these evidences, we suggest that the involvement of TRPV1 receptors expressed on spinal cord dorsal horn in mechanical muscle hyperalgesia induced by sustained isometric contraction is modulated by central release of glutamate.

The present study also demonstrated that, similar to antagonist of TRPV1 receptors, intramuscular or intrathecal administration of selective TRPA1 receptor antagonist HC030031 reduced the mechanical muscle hyperalgesia induced by sustained isometric contraction. The mechanism by which TRPA1 contributes to this

response is unknown. It has been described that TRPA1-deficient mice exhibit important deficits in bradykinin-evoked nociceptor excitation and pain hypersensitivity (Cesare and McNaughton, 1996; Chaplan et al., 1994). Also, recent studies showed that bradykinin as well as other G-protein coupled receptors enhance inflammatory pain responses by sensitizing TRPA1 via phospholipase C and PKA mediated intracellular signaling pathways (Day et al., 2007; Wang et al., 2008). Taken together, it is possible to suggest that some of the inflammatory mediators released by the sustained isometric contraction have activated both TRPV1 and TRPA1 channels by intracellular pathways and sensitized the primary afferent fibers to contribute to mechanical muscle hyperalgesia (Ro et al., 2009). The evidences that intrathecal administration of antagonist of TRPA1 reduced the mechanical muscle hyperalgesia induced by sustained isometric contraction suggest that central TRPA1 is also involved in this response. It is well known that, similar to TRPV1, TRPA1 is expressed not only on peripheral but also on central terminals of nociceptive primary afferent nerve fibres. On central terminals that are located within the spinal dorsal horn, TRPA1 amplifies glutamate release and thereby transmission of nociceptive signals to spinal interneurons and projection neurons (Arima et al., 2000). Based on these evidences, we also suggest that the involvement of TRPA1 receptors expressed on spinal cord dorsal horn in mechanical muscle hyperalgesia induced by sustained isometric contraction is modulated by central release of glutamate.

Both TRPV1 and TRPA1 play an integral role in pain (Bevan and Andersson, 2009; Fernandes et al., 2011) via sensory nerve activation. In fact, 97% of TRPA1-expressing sensory neurons express TRPV1, while 30% of TRPV1-expressing neurons express TRPA1 (Story et al., 2003). Both TRPV1 and TRPA1 channels are calcium-permeable, and, although their subunits have not been shown to form a heterotetramer

channel, they may form a complex on the plasma membrane of sensory neurons. This enables TRPV1 to influence intrinsic characteristics of the TRPA1 channel, including voltage–current relationships and its open probability at negative holding potentials (Staruschenko et al., 2010). Moreover, both TRPV1 and TRPA1 are integrators of a range of noxious stimuli, and TRPV1 and TRPA1 agonists are able, at least in part, to heterologously desensitize TRPV1 and TRPA1 pathways (Ruparel et al., 2008). Overall, based on evidence such as that described above, it may be suggested that TRPV1 and TRPA1 work together to activate nociceptive afferent fibers during sustained isometric contraction.

Although sensitization of TRPV1 and TRPA1 is one potential mechanism for the enhanced mechanical muscle hyperalgesia, there could also be an increased expression of both receptors after inflammation in muscle tissue. In the present study, we demonstrated that sustained isometric contraction did not modify the local protein expression of both receptors at the same time point of mechanical muscle hyperalgesia. These results are supported by a study that demonstrated that after muscle inflammation induced by eccentric contraction the TRPV1 expression was not changed (Fujii et al., 2008).

## **CONCLUSION**

The present study demonstrated that TRPV1 and TRPA1 receptors expressed in gastrocnemius muscle and spinal cord dorsal horn are involved with the mechanical muscle hyperalgesia induced by sustained isometric contraction in rats. We suggest that TRPV1 and TRPA1 receptors co-expressed in primary afferent fibers work together to activate nociceptive afferent fibers during sustained isometric contraction. Also, we suggest that TRPV1 and TRPA1 receptors are potential target to control inflammatory muscle pain.

## REFERENCES

- Arima T, Svensson P, Arendt-Nielsen L (2000) Capsaicin-induced muscle hyperalgesia in the exercised and non-exercised human masseter muscle. *J Orofac Pain* 14:213–223.
- Atoyan R, Shander D, Botchkareva NV (2009) Non-neuronal expression of transient receptor potential type A1 (TRPA1) in human skin. *Journal of Investigative Dermatology* 129: 2312-2315.
- Basbaum AI, Julius D (2006) TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell* 124:1269-1282.
- Baum K, Essfeld D (1999) Origin of back pain during bedrest: A new hypothesis. *Eur J Med Res* 4:389-393.
- Bautista DM, Jordt SE, Nikai T, Tsuruda PR, Read AJ, Poblete J, Yamoah EN, Bevan S, Andersson DA (2009) TRP channel antagonists for pain opportunities beyond TRPV1. *Curr Opin Investig Drugs* 10:655-663.
- Boix F, Roe C, Rosenborg L, Knardahl S (2005) Kinin peptides in human trapezius muscle during sustained isometric contraction and their relation to pain. *J Appl Physiol* 98:534-540.
- Bonet IJM, Fisher L, Parada CA, Tambeli CH (2013) The role of transient receptor potential A 1 (TRPA1) in the development and maintenance of carrageenan-induced hyperalgesia. *Neuropharmacologic* 65: 206-212.
- Breese NM, George AC, Pauers LE, Stucky CL (2005) Peripheral inflammation selectively increases TRPV1 function in IB4-positive sensory neurons from adult mouse. *Pain* 115:37–49.

Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389: 816-24.

Caterina MJ, Leffler A, et al. (2000) Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 288: 306-13.

Cesare P, McNaughton P (1996) A novel heat-activated current in nociceptive neurons and its sensitization by bradykinin. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:15435-15439.

Chaplan, S.R., Bach, F.W., Pogrel, J.W., Chung, J.M., and Yaksh, T.L (1994) Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J. Neurosci. Methods* 53, 55–63.

Chen WN, Lee CH, Lin SH, Wong CW, Sun WH, Wood JN, Chen CC (2014) Roles of ASIC3, TRPV1, and NaV1.8 in the transition from acute to chronic pain in a mouse model of fibromyalgia. *Mol Pain* 10:40.

Crandall M, Kwash J, Yu W, White G (2002) Activation of protein kinase C sensitizes human VR1 to capsaicin and to moderate decreases in pH at physiological temperatures in *Xenopus* oocytes. *Pain* 98:109–17.

Cristino L, de Petrocellis L, Pryce G, Baker D, Guglielmotti V, Di Marzo V (2006) Immunohistochemical localization of cannabinoid type 1 and vanilloid transient receptor potential vanilloid type 1 receptors in the mouse brain. *Neuroscience* 139:1405-1415.

da Costa DS, Meotti FC, Andrade EL, Leal PC, Motta EM, Calixto JB (2010) The involvement of the transient receptor potential A1 (TRPA1) in the maintenance of mechanical and cold hyperalgesia in persistent inflammation. *Pain* 148:431–437.

Dutia MB (1991) The muscles and joints of the neck: their specialisation and role in head movement. *Progress in neurobiology* 37:165-178.

Eid SR, Crown ED, Moore EL, Liang HA, et al. (2008) HC-030031, a TRPA1 selective antagonist, attenuates inflammatory- and neuropathy-induced mechanical hypersensitivity. *Mol Pain* 4(48): 1-10.

Fernandes ES, Russell FA, Spina D, McDougall JJ, Graepel R, Gentry C, Staniland AA, Mountford DM, Keeble JE, Malcangio M, Bevan S, Brain SD (2011) A distinct role for transient receptor potential ankyrin 1, in addition to transient receptor potential vanilloid 1, in tumor necrosis factor  $\alpha$ -induced inflammatory hyperalgesia and Freund's complete adjuvant-induced monoarthritis. *Arthritis Rheum* 63:819-829.

Fernandes ES, Fernandes MA, Keeble JE (2012) The functions of TRPA1 and TRPV1: moving away from sensory nerves. *Br J Pharmacol* 166:510-521.

Fujii Y, Ozaki N, Taguchi T, Mizumura K, Furukawa K, Sugiura Y (2008) TRP channels and ASICs mediate mechanical hyperalgesia in models of inflammatory muscle pain and delayed onset muscle soreness. *Pain* 140: 292-304.

Gautam M, Berson CJ (2013) Acid-sensing ion channels (ASICs) in mouse skeletal muscle afferents are heteromers composed of ASIC1a, ASIC2, and ASIC3 subunits. *Faseb J* 27(2): 793-802.

Goldie I, Nachemson A. Synovial pH in rheumatoid knee-joints. I (1969) The effect of synovectomy. *Acta Orthop Scand* 40:634–41.

Habler C (1929) Untersuchungen zur molekulopathologie der gelenkexsudate und ihre klinischen ergebnisse. *Arch Klin Chirurgie*. 156:20–42.

Hedenberg-Magnusson B, Brodda Jansen G, Ernberg M, Kopp S (2006) Effects of isometric contraction on intramuscular level of neuropeptide Y and local pain perception. *Acta Odontol Scand* 64:360-367.

- Huang J, Zhang X, McNaughton PA (2006) Inflammatory pain: the cellular basis of heat hyperalgesia. *Curr Neuropharmacol* 4:197–206.
- Jain A, Brönneke S, Kolbe L, Stäb F, Wenck H, Neufang G (2011) TRP-channel-specific cutaneous eicosanoid release patterns. *Pain* 152: 2765-2772.
- Jeffrey JA, Yu SQ, Sikand P, Parihar A, Evans MS, Premkumar LS (2009) Selective targeting of TRPV1 expressing sensory nerve terminals in the spinal cord for long lasting analgesia. *Plos One* 4:e7021.
- Jones RC, 3rd, Xu L, Gebhart GF. The mechanosensitivity of mouse colon afferent fibers and their sensitization by inflammatory mediators require transient receptor potential vanilloid 1 and acid-sensing ion channel 3. *J Neurosci*. 2005;25:10981–10989.
- Kim H, Cui L, Kim J, Kim SJ (2009) Transient receptor potential vanilloid type 1 receptor regulates glutamatergic synaptic inputs to the spinothalamic tract neurons of the spinal cord deep dorsal horn. *Neuroscience* 160:508-516.
- Kosek E, Ekholm J, Hansson P (1996) Modulation of pressure pain thresholds during and following isometric contraction in patients with fibromyalgia and in healthy controls. *Pain* 64:415-423.
- Le Bars D, Dickenson AH, Besson JM (1979) Diffuse noxious inhibitory controls (DNIC). I. Effects on dorsal horn convergent neurones in the rat. *Pain* 6:283-304.
- Lee J, Saloman JL, Weiland G, Auh QS, Chung MK, Ro JY (2012) Functional interactions between NMDA receptors and TRPV1 in trigeminal sensory neurons mediate mechanical hyperalgesia in the rat masseter muscle. *Pain* 153:1514-1524.
- Levine JD, Alessandri-Haber N (2007) TRP channels: targets for the relief of pain. *Biochim Biophys Acta* 1772:989-1003.

- McGill SM, Hughson RL, Parks K (2000) Lumbar erector spinae oxygenation during prolonged contractions: implications for prolonged work. *Ergonomics* 43:486-493.
- Oliveira MC, Pelegrini-da-Silva A, Tambeli CH, Parada CA (2009) Peripheral mechanisms underlying the essential role of P2X<sub>3,2/3</sub> receptors in the development of inflammatory hyperalgesia. *Pain* 141:127-134.
- Perin-Martins A<sup>1</sup>, Teixeira JM, Tambeli CH, Parada CA, Fischer L (2013) Mechanisms underlying transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1)-mediated hyperalgesia and edema. *J Peripher Nerv Syst.* 2013 Mar;18(1):62-74.
- Papir-Kricheli D, Frey J, Laufer R, Gilon C, Chorev M, Selinger Z, Devor M (1987) Behavioural effects of receptor-specific substance P agonists. *Pain* 31:263-276.
- Petrus M, Peier AM, Bandell M, Hwang SW, Huynh T, Olney N, Jegla T, Patapoutian A. (2007) A role of TRPA1 in mechanical hyperalgesia is revealed by pharmacological inhibition. *Mol Pain* 3:40.
- Prasad P, Yanagihara AA, Small-Howard AL, Turner H, Stokes AJ (2008) Secretogranin III directs secretory vesicle biogenesis in mast cells in a manner dependent upon interaction with chromogranin A. *J Immunol* 181:5024–5034.
- Randall LO, Selitto JJ (1957) A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 111: 409–419.
- Ro JY, Lee JS, Zhang, Y (2009) Activation of TRPV1 and TRPA1 leads to muscle nociception and mechanical hyperalgesia. *Pain* 144(3): 270-277.
- Rosland JH (1991) The formalin test in mice: the influence of ambient temperature. *Pain* 45:211-216.

Ruparel NB, Patwardhan AM, Akopian AN, Hargreaves KM (2008) Homologous and heterologous desensitization of capsaicin and mustard oil responses utilize different cellular pathways in nociceptors. *Pain* 135:271-279.

Spicarova D, Palecek J (2009) The role of the TRPV1 endogenous agonist N-Oleoyldopamine in modulation of nociceptive signaling at the spinal cord level. *J Neurophysiol* 102:234-243.

Spicarova D, Nerandzic V, Palecek J (2014) Update on the Role of Spinal Cord TRPV1 Receptors in Pain Modulation. *Physiol. Res* 63: 225-236.

Staruschenko A, Jeske NA, Akopian AN (2010) Contribution of TRPV1-TRPA1 interaction to the single channel properties of the TRPA1 channel. *J Biol Chem* 285:15167-15177.

Story GM, Peier AM, Reeve AJ, Eid SR, Mosbacher J, Hricik TR, Earley TJ, Hergarden AC, Andersson DA, Hwang SW, McIntyre P, Jegla T, Bevan S, Patapoutian A (2003) ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell* 112:819-829.

Takahashi M, Ni Z, Yamashita T, Liang N, Sugawara K, Yahagi S, Kasai T (2006) Excitability changes in human hand motor area induced by voluntary teeth clenching are dependent on muscle properties. *Exp Brain Res* 171:272-7.

Vay L, Gu C, McNaughton PA (2012) The thermo-TRP ion channel family: properties and therapeutic implications. *Br J Pharmacol* 165:787–801.

Vellani V, Mapplebeck S, Moriondo A, Davis JB, McNaughton PA (2001) Protein kinase C activation potentiates gating of the vanilloid receptor VR1 by capsaicin, protons, heat and anandamide. *J Physiol* 534:813–25.

- Walder RY, Radhakrishnan R, Loo L, Rasmussen LA, Mohapatra DP, Wilson SP, Sluka KA (2012) TRPV1 is important for mechanical and heat sensitivity in uninjured animals and development of heat hypersensitivity after muscle inflammation. *Pain* 153:1664-1672.
- Wang S, Dai Y, Fukuoka T, Yamanaka H, Kobayashi K, Obata K, Cui X, Tominaga M, Noguchi K (2008) Phospholipase C and protein kinase A mediate bradykinin sensitization of TRPA1: a molecular mechanism of inflammatory pain. *Brain* 131:1241–1251.
- Zhang X, Huang J, McNaughton PA (2005) NGF rapidly increases membrane expression of TRPV1 heat-gated ion channels. *EMBO J* 24:4211–23.
- Zimmermann M.(1983) Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16:109-110.

**CONFLITS OF INTEREST**

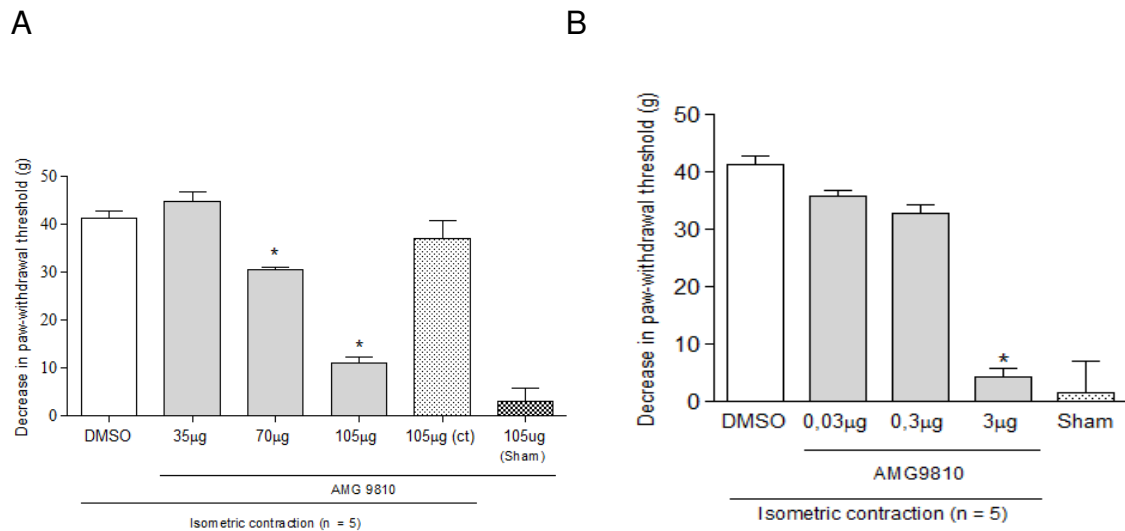
The authors declare that there are no conflicts of interest.

**ACKNOWLEDGMENT**

This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; Brazil).

## FIGURES

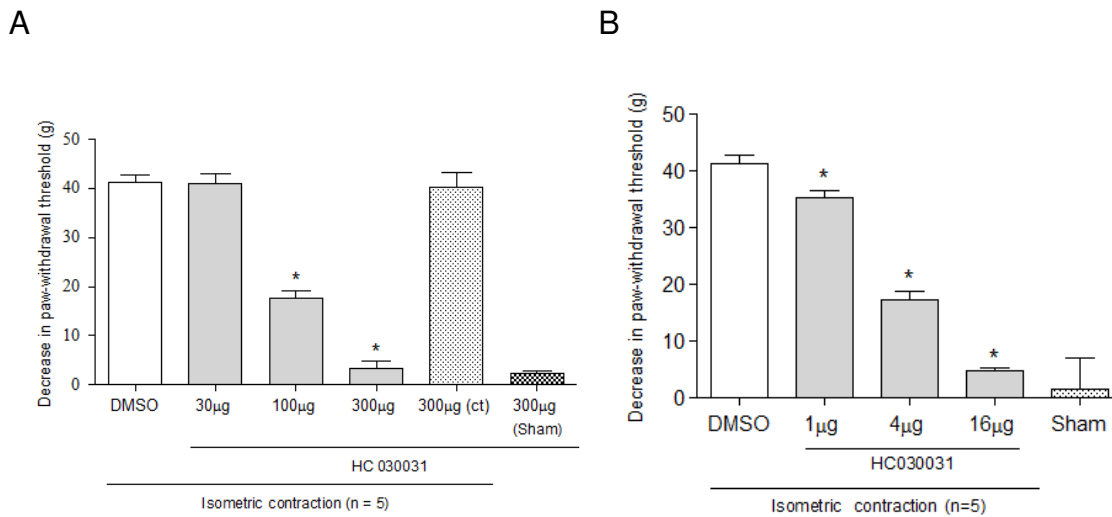
Figure 1



**Figure 1. Involvement of TRPV1 receptors in mechanical muscle hyperalgesia induced by sustained isometric contraction**

A) Intramuscular administration of AMG9810 (70µg and 105µg, but not 35µg), reduced the mechanical muscle hyperalgesia induced by sustained isometric contraction when administered in the ipsilateral but not in the contralateral gastrocnemius muscle. The administration of AMG9810 in sham group did not affect the mechanical muscle withdrawal threshold. B) Intrathecal administration of AMG9810 (3.0µg, but not 0,03 and 0,3µg) reduced the mechanical muscle hyperalgesia induced by sustained isometric contraction. The symbol “\*” indicates responses significantly lower than that induced by sustained isometric contraction ( $p < 0.05$ ; ANOVA, Tukey test). Abbreviations: ct – contralateral.

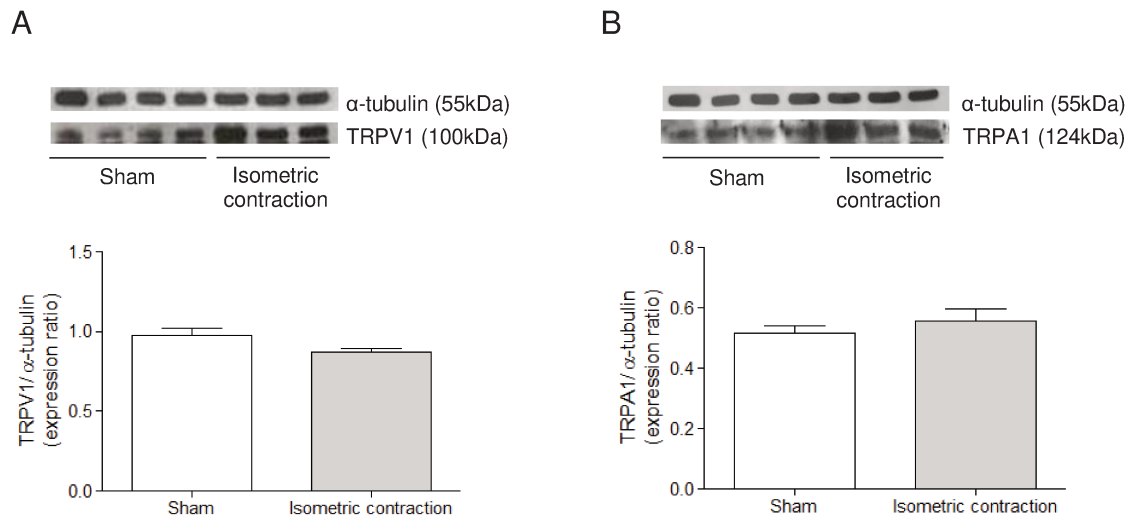
Figure 2



**Figure 2. Involvement of TRPA1 receptors in mechanical muscle hyperalgesia induced by sustained isometric contraction**

A) Intramuscular administration of HC030031 (100 and 300µg, but not 30µg) reduced the mechanical muscle hyperalgesia induced by sustained isometric contraction when administered in the ipsilateral but not in the contralateral gastrocnemius muscle. The administration of HC030031 in sham group did not affect the mechanical muscle withdrawal threshold. B) Intrathecal administration of HC030031 (1, 4 and 16µg) reduced the mechanical muscle hyperalgesia induced by sustained isometric contraction. The symbol “\*” indicates responses significantly lower than that induced by sustained isometric contraction ( $p < 0.05$ ; ANOVA, Tukey test). Abbreviations: ct – contralateral.

Figure 3



**Figure 3. Protein expression of TRPV1 and TRPA1 in gastrocnemius muscle after sustained isometric contraction**

A/B) The sustained isometric contraction did not modify the protein expression of both receptors when compared to sham group (Fig. 3,  $p > 0.05$ ; t-test).

#### 4. DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou, pela primeira vez, que os receptores TRPV1 e TRPA1 expressos no músculo gastrocnêmio e no corno dorsal da medula espinhal, no nível entre L4-L5, estão envolvidos com a hiperalgesia mecânica induzida pela contração isométrica sustentada em ratos.

A hiperalgesia mecânica induzida pela contração isométrica sustentada é um modelo de dor muscular desenvolvido recentemente pelo nosso grupo de pesquisa. Nós demonstramos que a contração isométrica sustentada a uma intensidade submáxima é capaz de induzir hiperalgesia muscular mecânica  $\frac{1}{2}$  e 1 hora após o término do estímulo. Além disso, foi demonstrado que esta hiperalgesia muscular mecânica está associada a um processo inflamatório, aumento dos níveis de creatina-quinase e não há evidências histológicas de dano estrutural nas fibras musculares (dados não publicados). Especificamente, o envolvimento de um processo inflamatório foi demonstrado pelos achados de que a hiperalgesia muscular mecânica foi reduzida pelo pré-tratamento com o anti-inflamatório esteroide dexametasona e pelo inibidor de ciclooxigenase, a indometacina (dados não publicados). Portanto, o bloqueio da hiperalgesia muscular mecânica pela administração intramuscular ou intratecal do antagonista seletivo do receptor TRPV1, AMG9810, sugere que a ativação do receptor TRPV1 expresso no músculo gastrocnêmio e no corno dorsal da medula espinhal é essencial para sensibilização induzida pelos mediadores inflamatórios finais nas fibras aferentes primárias. Vários estudos sustentam a nossa hipótese de que o receptor TRPV1 contribui para a hiperalgesia muscular mecânica (Chen et al., 2014; Walder et al., 2012; Lee et al., 2012; Ro et al., 2009; Fujii et al., 2008). O mecanismo pelo qual o receptor TRPV1 contribui para esta resposta ainda é desconhecido. Sabe-se que a inflamação está associada à diminuição do pH, e que o pH abaixo de 6.0 pode ativar diretamente o canal do TRPV1 (Breese et al., 2005; Caterina et al., 2000). Também já está descrito que a ativação do receptor TRPV1 pode ser regulada pelo metabolismo de lipídios em um meio com pH suavemente acidificado (Habler, 1929; Goldie and Nashemson, 1969; Huang et al., 2006) e que mediadores inflamatórios como a prostaglandina, bradicinina e ATP podem sensibilizar os canais TRPV1 através da ativação de uma variedade de receptores acoplados a proteína G e de um número de

proteínas-quinases (Vellani et al., 2001; Crandall et al., 2002; Zhang et al., 2005; Huang et al., 2006), incluindo proteína quinase C e A. Sendo assim, considerando-se que a hiperalgesia muscular mecânica induzida pela contração isométrica sustentada está associada a um processo inflamatório, é possível sugerirmos que a contração isométrica sustentada induz a liberação de mediadores inflamatórios associados a diminuição do pH, que por sua vez sensibiliza os receptores TRPV1 nos nociceptores aferentes primários e aumenta, de forma subsequente, a sinalização nociceptiva para a medula espinhal. Parece estar claro que a grande maioria dos receptores TRPV1 no curso dorsal da medula espinal estão presentes no terminal pré-sináptico dos ramos centrais das aferências primárias (Spicarova et al., 2014) e sua ativação aumenta a liberação de glutamato (Jeffry et al., 2009, Spicarova and Palecek, 2009), que por sua vez, aumenta a atividade neural do trato espinotalâmico (Kim et al., 2009). Baseado nessas evidências, nós sugerimos que o envolvimento dos receptores TRPV1 expressos no corno dorsal da medula espinhal na hiperalgesia muscular mecânica induzida pela contração isométrica sustentada seja modulada pela liberação central de glutamato.

O presente estudo também demonstrou que, de forma semelhante ao antagonista do receptor TRPV1, o antagonista seletivo do receptor TRPA1, HC030031, administrado via intramuscular ou intratecal, reduziu a hiperalgesia muscular mecânica induzida pela contração isométrica sustentada. O mecanismo pelo qual o receptor TRPA1 contribui para esta resposta é desconhecido. Tem sido descrito que camundongos deficientes para o receptor TRPA1 apresentam importante déficit na excitação do nociceptor pela bradicinina e na hipersensibilidade dolorosa (Cesare and McNaughton, 1996; Chaplan et al., 1994). Além disso, recentes estudos demonstraram que a bradicinina bem como a ativação de outros receptores acoplados a proteína G aumentam a sua resposta inflamatória através da sensibilização do receptor TRPA1, via fosfolipase C e PKA, mediadas por vias de sinalização intracelular (Dai et al., 2007; Wang et al., 2008). Em conjunto, é possível sugerir que alguns mediadores inflamatórios liberados após a contração isométrica sustentada ativem ambos os canais de TRPV1 e TRPA1 pelas vias intracelulares e sensibilizem as fibras aferentes primárias para contribuir com a hiperalgesia muscular mecânica (Ro et al., 2009). As evidências de que a administração intratecal do antagonista do receptor TRPA1 reduz a

hiperalgesia muscular mecânica induzida pela contração isométrica sustentada sugerem que o receptor TRPA1 central também está envolvido nesta resposta. Já está estabelecido que, semelhante ao receptor TRPV1, o receptor TRPA1 é expresso não somente nos tecidos periféricos, mas também nos terminais centrais das fibras nervosas dos nociceptores aferentes primários. Nos terminais centrais, que estão localizados no corno dorsal da medula espinhal, o receptor TRPA1 amplifica a liberação de glutamato e, desse modo, potencializa a transmissão dos sinais nociceptivos para os interneurônios medulares e neurônios de projeção (Arima et al., 2000). Baseando-nos nessas evidências, também podemos sugerir que o envolvimento dos receptores TRPA1 expressos no corno dorsal da medula espinhal na hiperalgesia muscular mecânica induzida pela contração isométrica sustentada seja também modulada pela liberação central de glutamato.

Ambos os receptores TRPV1 e TRPA1 desempenham papel fundamental na dor (Bevan and Andersson, 2009; Fernandes et al., 2011) via ativação dos neurônios sensoriais. De fato, 97% dos neurônios sensoriais que expressam o receptor TRPA1 co-expressam o receptor TRPV1. Enquanto que 30% dos neurônios que expressam o receptor TRPV1, co-expressam o receptor TRPA1 (Story et al., 2003). Tanto os canais TRPV1 quanto os TRPA1 são cálcio-permeáveis, e, embora não tenha sido descrito que suas subunidades formem um canal heterotetrâmero, elas podem formar um complexo na membrana plasmática dos neurônios sensoriais. Isso possibilita que o receptor TRPV1 influencie nas características intrínsecas do canal TRPA1, incluindo a relação entre voltagem e corrente e sua probabilidade de abrir com potenciais de ação negativos (Staruschenko et al., 2010). Além disso, tanto o receptor TRPV1 quanto o TRPA1 são integradores de uma variedade de estímulos nocivos e seus agonistas podem, pelo menos em parte, dessensibilizar de forma diferente as vias dos receptores TRPV1 e TRPA1 (Ruparel et al., 2008). Em geral, baseado nas evidências apresentadas acima, pode ser sugerido que os receptores TRPV1 e TRPA1 trabalhem juntos para ativar as fibras nociceptivas aferentes durante a contração isométrica sustentada.

Embora a sensibilização dos receptores TRPV1 e TRPA1 seja um mecanismo potencial para o reforço da hiperalgesia muscular, pode ser também um aumento da

expressão de ambos receptores após inflamação no tecido muscular. No presente estudo, nós demonstramos que a contração isométrica sustentada não modifica a expressão local de ambos receptores no mesmo momento do pico da hiperalgesia muscular mecânica. Esses resultados estão de acordo com um estudo que demonstrou que após a inflamação muscular induzida pela contração excêntrica não houve alteração na expressão do receptor TRPV1 (Fujii et al., 2008).

## CONCLUSÃO

Em resumo, o presente estudo sugere que os receptores TRPV1 e TRPA1 expressos no músculo gastrocnêmio e no corno dorsal da medula espinhal estão envolvidos com a hiperalgesia muscular mecânica induzida pela contração isométrica sustentada em ratos. Nós sugerimos que os receptores TRPV1 e TRPA1 co-expressos nas fibras aferentes primárias trabalhem juntos para ativar as fibras nociceptivas aferentes durante a contração isométrica sustentada. Além disso, sugerimos que os receptores TRPV1 e TRPA1 são potenciais alvos para o controle da dor muscular inflamatória.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amandusson A, Blomqvist A (2013) Estrogenic influences in pain processing. *Front Neuroendocrinol* 34 (4): 329-49.
- Andersen JH, Haahr JP, Frost P (2007) Risk factors for more severe regional musculoskeletal symptoms. *Arthritis & rheumatism* 56: 1355-1364.
- Apkarian AV, Bushnell MC, Treede RD, Zubieta JK (2005) Human brain mechanisms of pain perception and regulation in health and disease. *Eur J of Pain* 9: 463-484.
- Arendt-Nielsen L, Svensson P, Sessle BJ et al (2008) Interactions between Glutamate and Capsaicin in Inducing Muscle Pain and Sensitization in Humans. *Eur J Pain* 12: 661-670.
- Arima T, Svensson P, Arendt-Nielsen L (2000) Capsaicin-induced muscle hyperalgesia in the exercised and non-exercised human masseter muscle. *J Orofac Pain* 14:213–223.
- Atoyan R, Shander D, Botchkareva NV (2009) Non-neuronal expression of transient receptor potential type A1 (TRPA1) in human skin. *Journal of Investigative Dermatology* 129: 2312-2315.
- Basbaum AI, Julius D (2006) TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell* 124:1269-1282.
- Baum K, Essfeld D (1999) Origin of back pain during bedrest: A new hypothesis. *Eur J Med Res* 4:389-393.
- Bautista DM, Jordt SE, Nikai T, Tsuruda PR, Read AJ, Poblete J, Yamoah EN, Bevan S, Andersson DA (2009) TRP channel antagonists for pain opportunities beyond TRPV1. *Curr Opin Investig Drugs* 10:655-663.
- Boix F, Roe C, Rosenborg L, Knardahl S (2005) Kinin peptides in human trapezius muscle during sustained isometric contraction and their relation to pain. *J Appl Physiol* 98:534-540.

Bonet IJM, Fisher L, Parada CA, Tambeli CH (2013) The role of transient receptor potential A 1 (TRPA1) in the development and maintenance of carrageenan-induced hyperalgesia. *Neuropharmacologic* 65: 206-212.

Breese NM, George AC, Pauers LE, Stucky CL (2005) Peripheral inflammation selectively increases TRPV1 function in IB4-positive sensory neurons from adult mouse. *Pain* 115:37–49.

Breivik H, Collett B, Ventafridda V, Cohen R, Gallacher D (2006) Survey of chronic pain in Europe: prevalence, impact on daily life, and treatment. *Eur J Pain* 10:287-333.

Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389: 816-24.

Caterina MJ, Leffler A, et al. (2000) Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 288: 306-13.

Cesare P, McNaughton P (1996) A novel heat-activated current in nociceptive neurons and its sensitization by bradykinin. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:15435-15439.

Chaplan, S.R., Bach, F.W., Pogrel, J.W., Chung, J.M., and Yaksh, T.L (1994) Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J. Neurosci. Methods* 53, 55–63.

Chen WN, Lee CH, Lin SH, Wong CW, Sun WH, Wood JN, Chen CC (2014) Roles of ASIC3, TRPV1, and NaV1.8 in the transition from acute to chronic pain in a mouse model of fibromyalgia. *Mol Pain* 10:40.

Cimmino MA, Ferrone C, Cutolo M (2011) Epidemiology of chronic musculoskeletal pain. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 25:173-183.

Coogan D, Ntani G, Palmer KT, Felli VE, Harari R; Barrero LH, et al (2013) Disabling musculoskeletal pain in working populations: Is it the job, the person, or the culture?. *Pain* 154: 856-863.

Crandall M, Kwash J, Yu W, White G (2002) Activation of protein kinase C sensitizes human VR1 to capsaicin and to moderate decreases in pH at physiological temperatures in *Xenopus* oocytes. *Pain* 98:109–17.

Cristino L, de Petrocellis L, Pryce G, Baker D, Guglielmotti V, Di Marzo V (2006) Immunohistochemical localization of cannabinoid type 1 and vanilloid transient receptor potential vanilloid type 1 receptors in the mouse brain. *Neuroscience* 139:1405-1415.

da Costa DS, Meotti FC, Andrade EL, Leal PC, Motta EM, Calixto JB (2010) The involvement of the transient receptor potential A1 (TRPA1) in the maintenance of mechanical and cold hyperalgesia in persistent inflammation. *Pain* 148:431–437.

Dai Y, Wang S, Tominaga M et al (2007) Sensitization of TRPA1 by PAR2 contributes to the sensation of inflammatory pain. *JCI* 117: 1979-87.

Davis JB, Gray J, Gunthorpe MJ, Hatcher JP, Davey PT, Overend P, Harries MH, Latcham J, Clapham C, Atkinson K, Hughes SA, Rance K, Grau E, Harper AJ, Pugh PL, Rogers DC, Bingham S, Randall A, Sheardown SA (2000) Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature* 405:183-187.

Dubner R (1991) Basic mechanisms of pain associated with deep tissues. *Can J Physiol Pharmacol* 69:607-609.

Dutia MB (1991) The muscles and joints of the neck: Their specialisation and role in head movement. *Progress in Neurobiology* 2: 165-178.

Eid SR, Crown ED, Moore EL, Liang HA, et al. (2008) HC-030031, a TRPA1 selective antagonist, attenuates inflammatory- and neuropathy-induced mechanical hypersensitivity. *Mol Pain* 4: 1-10.

Fernandes ES, Russell FA, Spina D, McDougall JJ, Graepel R, Gentry C, Staniland AA, Mountford DM, Keeble JE, Malcangio M, Bevan S, Brain SD (2011) A distinct role for transient receptor potential ankyrin 1, in addition to transient receptor potential vanilloid 1, in tumor necrosis factor  $\alpha$ -induced inflammatory hyperalgesia and Freund's complete adjuvant-induced monoarthritis. *Arthritis Rheum* 63:819-829.

Fernandes ES, Fernandes MA, Keeble JE (2012) The functions of TRPA1 and TRPV1: moving away from sensory nerves. *Br J Pharmacol* 166:510-521.

Fujii Y, Ozaki N, Taguchi T, Mizumura K, Furukawa K, Sugiura Y (2008) TRP channels and ASICs mediate mechanical hyperalgesia in models of inflammatory muscle pain and delayed onset muscle soreness. *Pain* 140: 292-304.

Gaskin DJ, Richard P (2012) The economic costs of pain in the United States. *J Pain* 13:715-724.

Gautam M, Berson CJ (2013) Acid-sensing ion channels (ASICs) in mouse skeletal muscle afferents are heteromers composed of ASIC1a, ASIC2, and ASIC3 subunits. *Faseb J* 27(2): 793-802.

Gavva NR, Tamir R, Qu Y, Klionsky L, Zhang TJ, Immke D, Wang J, Zhu D, Vanderah TW, Porreca F, Doherty EM, Norman MH, Wild KD, Bannon AW, Louis JC, Treanor JJ (2005) AMG 9810 [(E)-3-(4-t-butylphenyl)-N-(2,3-dihydrobenzo[b][1,4] dioxin-6-yl)acrylamide], a novel vanilloid receptor 1 (TRPV1) antagonist with antihyperalgesic properties. *J Pharmacol Exp Ther* 313:474-484.

Ghilardi JR, Rohrich H, Lindsay TH, Sevcik MA, Schwei MJ, Kubota K, Halvorson KG, Poblete J, Chaplan SR, Dubin AE, et al. (2005) Selective blockade of the capsaicin receptor TRPV1 attenuates bone cancer pain. *J Neurosci* 25:3126 –3131.

Goldie I, Nachemson A. Synovial pH in rheumatoid knee-joints. I (1969) The effect of synovectomy. *Acta Orthop Scand* 40:634–41.

Gureje O, Korff MV, Simon GE, Gater R (1998) Persistent Pain and Well-being - A World Health Organization Study in Primary Care. *JAMA* 280: 147-151.

Habler C (1929) Untersuchungen zur molekulopathologie der gelenkexsudate und ihre klinischen ergebnisse. *Arch Klin Chirurgie*. 156:20–42.

Henderson LA, Gandevia SC, Macefield VG (2007) Somatotopic organization of the processing of muscle and cutaneous pain in the left and right insula cortex: a single trial fMRI study. *Pain* 128: 20-30.

Hedenberg-Magnusson B, Brodda Jansen G, Ernberg M, Kopp S (2006) Effects of isometric contraction on intramuscular level of neuropeptide Y and local pain perception. *Acta Odontol Scand* 64:360-367.

Hoheisel U, Mense S, Simons DG, Yu XM (1993) Appearance of new receptive fields in rat dorsal horn neurons following noxious stimulation of skeletal muscle: a model for referral of muscle pain? *Neurosci Lett* 153:9-12.

Honore P, Wismer CT, et al. (2005) A-425619 [1-isoquinolin-5-yl-3-(4-trifluoromethylbenzyl)-urea], a novel transient receptor potential type V1 receptor antagonist, relieves pathophysiological pain associated with inflammation and tissue injury in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 314:410–421.

Huang J, Zhang X, McNaughton PA (2006) Inflammatory pain: the cellular basis of heat hyperalgesia. *Curr Neuropharmacol* 4:197–206.

Jain A, Brönneke S, Kolbe L, Stäb F, Wenck H, Neufang G (2011) TRP-channel-specific cutaneous eicosanoid release patterns. *Pain* 152: 2765-2772.

Jeffrey JA, Yu SQ, Sikand P, Parihar A, Evans MS, Premkumar LS (2009) Selective targeting of TRPV1 expressing sensory nerve terminals in the spinal cord for long lasting analgesia. *Plos One* 4:e7021.

Ji RR, Samad TA, Jin SX, Schmoll R, Woolf CJ (2002) p38 MAPK activation by NGF in primary sensory neurons after inflammation increases TRPV1 levels and maintains heat hyperalgesia. *Neuron* 26; 36:57-68.

Jones RCW, Xu L, Gebhart GF (2005) The Mechanosensitivity of Mouse Colon Afferent Fibers and Their Sensitization by Inflammatory Mediators Require Transient Receptor Potential Vanilloid 1 and Acid-Sensing Ion Channel 3. *J Neurosci* 25: 10981-89.

Julius D, Basbaum AI (2001) Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413:203-210.

Kim H, Cui L, Kim J, Kim SJ (2009) Transient receptor potential vanilloid type 1 receptor regulates glutamatergic synaptic inputs to the spinothalamic tract neurons of the spinal cord deep dorsal horn. *Neuroscience* 160:508-516.

Kosek E, Ekholm J, Hansson P (1996) Modulation of pressure pain thresholds during and following isometric contraction in patients with fibromyalgia and in healthy controls. *Pain* 64:415-423.

Le Bars D, Dickenson AH, Besson JM (1979) Diffuse noxious inhibitory controls (DNIC). I. Effects on dorsal horn convergent neurones in the rat. *Pain* 6:283-304.

Lee J, Saloman JL, Weiland G, Auh QS, Chung MK, Ro JY (2012) Functional interactions between NMDA receptors and TRPV1 in trigeminal sensory neurons mediate mechanical hyperalgesia in the rat masseter muscle. *Pain* 153:1514-1524.

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

Lorenz J, Casey KL (2005) Imaging of acute versus pathological pain. *Eur J of Pain* 10:284-293.

Matsudaira K, Kawaguchi M, Isomura T, Arisaka M, Fujii T, Takeshita K (2013) Identification of Risk Factors for New-Onset Sciatica in Japanese Workers. *Spine* 38:1691-1700.

Loram LC, Fuller A, Fick LG, Cartmell T, Poole S, Mitchell D (2007) Cytokine profiles during carrageenan-induced inflammatory hyperalgesia in rat muscle and hind paw. *J Pain* 8:127-136.

McGill SM, Hughson RL, Parks K (2000) Lumbar erector spinae oxygenation during prolonged contractions: implications for prolonged work. *Ergonomics* 43:486-493.

Mense S (1993) Nociception from skeletal muscle in relation to clinical muscle pain. *Pain* 54:241-289.

Mense S (2009) Algesic agents exciting muscle nociceptors. *Exp Brain Res* 196:89-100.

Mense, S, Gerwin RD. Muscle pain: Understanding the mechanisms (2010) Springer, Berlin.

Mersky YH. (1986) Classification of chronic pain. Descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. Prepared by the International Association for the Study of Pain, Subcommittee on Taxonomy. Pain 3: S1-S226.

Millan MJ (1999) The induction of pain: an integrative review. Prog Neurobiol 57:1-164.

Minson FP (2009) Ano internacional de combate às dores musculoesqueléticas. Jornal dor – SBED 34: 4.

Murray CJL, et al (2013) The state of US Health, 1990-2010 Burden of Diseases, Injuries and risk factors. JAMA 310: 591-608.

Nahit ES, Macfarlane GJ, Pritchard CM, Cherry NM, Silman AJ (2001) Short term influence of mechanical factors on regional musculoskeletal pain: a study of new workers from 12 occupational groups. Occup Environ Med 58: 374-381.

Oliveira MC, Pelegrini-da-Silva A, Tambeli CH, Parada CA (2009) Peripheral mechanisms underlying the essential role of P2X<sub>3,2/3</sub> receptors in the development of inflammatory hyperalgesia. Pain 141:127-134.

Palit S, Kerr KI, Kuhn BL, Terry EL, DeVentura JL, Bartley EL (2013) Exploring Pain Processing Differences in Native Americans. Health Psychology 32: 1127–1136.

Papir-Kricheli D, Frey J, Laufer R, Gilon C, Chorev M, Selinger Z, Devor M (1987) Behavioural effects of receptor-specific substance P agonists. Pain 31:263-276.

Perin-Martins A, Teixeira JM, Tambeli CH, Parada CA, Fisher L (2013) Mechanisms underlying transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1)-mediated hyperalgesia and edema. Journal of the Peripheral Nervous System 18: 62-74.

Petrus M, Peier AM, Bandell M, Hwang SW, Huynh T, Olney N, Jegla T, Patapoutian A. (2007) A role of TRPA1 in mechanical hyperalgesia is revealed by pharmacological inhibition. Mol Pain 3:40.

Prasad P, Yanagihara AA, Small-Howard AL, Turner H, Stokes AJ (2008) Secretogranin III directs secretory vesicle biogenesis in mast cells in a manner dependent upon interaction with chromogranin A. *J Immunol* 181:5024–5034.

Rami HK, Thompson M, Stemp G, Fell S, Jerman JC, Stevens AJ, Smart D, Sargent B, anderson D, Randall AD, et al. (2006) Discovery of SB-705498: a potent, selective and orally bioavailable TRPV1 antagonist suitable for clinical development. *Bioorg Med Chem Lett* 16:3287–3291.

Randall LO, Selitto JJ (1957) A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 111: 409–419.

Ravnefjord A, Brusberg M, Kang D et al (2009) Involvement of the transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) in the development of acute visceral hyperalgesia during colorectal distension in rats. *E J Pharmacol* 611: 85-91.

Reid MC, Bennett DA, Chen WG, Eldadah BA, Farrar JT, Ferrell B, Gallagher RM, Hanlon JT, Herr K, Horn SD, Inturrisi CE, Lemtouni S, Lin YW, Michaud K, Morrison RS, Neogi T, Porter LL, Solomon DH, Von Korff M, Weiss K, Witter J, Zacharoff KL (2011) Improving the pharmacologic management of pain in older adults: identifying the research gaps and methods to address them. *Pain Med* 12:1336-1357.

Riley JL, Cruz-Almeida Y, Glover TL, King CD, Goodin BR, Sibille KT, et al. (2013) Age and race effects on pain sensitivity and modulation among middle-aged and older adults. *Pain* 15:272-282.

Ro JY, Lee JS, Zhang, Y (2009) Activation of TRPV1 and TRPA1 leads to muscle nociception and mechanical hyperalgesia. *Pain* 144(3): 270-277.

Ruparel NB, Patwardhan AM, Akopian AN, Hargreaves KM (2008) Homologous and heterologous desensitization of capsaicin and mustard oil responses utilize different cellular pathways in nociceptors. *Pain* 135:271-279.

Spicarova D, Palecek J (2009) The role of the TRPV1 endogenous agonist N-Oleoyldopamine in modulation of nociceptive signaling at the spinal cord level. *J Neurophysiol* 102:234-243.

Spicarova D, Nerandzic V, Palecek J (2014) Update on the Role of Spinal Cord TRPV1 Receptors in Pain Modulation. *Physiol. Res* 63: 225-236.

Staruschenko A, Jeske NA, Akopian AN (2010) Contribution of TRPV1-TRPA1 interaction to the single channel properties of the TRPA1 channel. *J Biol Chem* 285:15167-15177.

Story GM, Peier AM, Reeve AJ, Eid SR, Mosbacher J, Hricik TR, Earley TJ, Hergarden AC, Andersson DA, Hwang SW, McIntyre P, Jegla T, Bevan S, Patapoutian A (2003) ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell* 112:819-829.

Takahashi M, Ni Z, Yamashita T, Liang N, Sugawara K, Yahagi S, Kasai T (2006) Excitability changes in human hand motor area induced by voluntary teeth clenching are dependent on muscle properties. *Exp Brain Res* 171:272-7.

Toth A, Wang Y, Kedei N et al (2005) Different vanilloid agonists cause different patterns of calcium response in CHO cells heterologously expressing rat TRPV1. *Life Sci* 76: 2921-32.

Vay L, Gu C, McNaughton PA (2012) The thermo-TRP ion channel family: properties and therapeutic implications. *Br J Pharmacol* 165:787–801.

Vellani V, Mapplebeck S, Moriondo A, Davis JB, McNaughton PA (2001) Protein kinase C activation potentiates gating of the vanilloid receptor VR1 by capsaicin, protons, heat and anandamide. *J Physiol* 534:813–25.

Walder RY, Radhakrishnan R, Loo L, Rasmussen LA, Mohapatra DP, Wilson SP, Sluka KA (2012) TRPV1 is important for mechanical and heat sensitivity in uninjured animals and development of heat hypersensitivity after muscle inflammation. *Pain* 153:1664-1672.

Walker KM, Urban L, Medhurst SJ, Patel S, Panesar M, Fox AJ, and McIntyre P (2003) The VR1 antagonist capsazepine reverses mechanical hyperalgesia in models of inflammatory and neuropathic pain. *J Pharmacol Exp Ther* 304:56- 62.

Wang S, Dai Y, Fukuoka T, Yamanaka H, Kobayashi K, Obata K, Cui X, Tominaga M, Noguchi K (2008) Phospholipase C and protein kinase A mediate bradykinin sensitization of TRPA1: a molecular mechanism of inflammatory pain. *Brain* 131:1241–1251.

Yu XM, Sessle BJ, Hu JW (1993) Differential effects of cutaneous and deep application of inflammatory irritant on mechanoreceptive field properties of trigeminal brain stem nociceptive neurons. *J Neurophysiol* 70:1704-1707.

Zhang X, Huang J, McNaughton PA (2005) NGF rapidly increases membrane expression of TRPV1 heat-gated ion channels. *EMBO J* 24:4211–23.

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

## ANEXOS

### ANEXO 1

#### Carta de submissão à revista "Life Sciences"

Assunto: Submission Confirmation

De: "Life Sciences" <ees.lfs.0.2ec59a.6eb5bc00@eesmail.elsevier.com>

Data: Qui, Janeiro 22, 2015 03:07

Para: maria.fusaro@fca.unicamp.br

oliveira\_mcl@yahoo.com.br

---

Dear Dr. Oliveira-Fusaro,

Your submission entitled "Mechanical muscle hyperalgesia induced by sustained isometric contraction is modulated by TRPV1 and TRPA1 receptors" has been received by Life Sciences

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Elsevier Editorial Systems as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/lfs/>.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Life Sciences

## ANEXO 2

## Parecer do Comitê de Ética



CEUA/Unicamp

**Comissão de Ética no Uso de Animais  
CEUA/Unicamp****CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto "Envolvimento dos receptores TRPV1, TRPA1 e ASIC3 na hiperalgesia muscular induzida pela contração isométrica sustentada no músculo gastrocnêmio de ratos" (protocolo nº 3277-1), sob a responsabilidade de Profa. Dra. Maria Claudia Gonçalves de Oliveira-Fusaro / Carolina Ocanha Jorge, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao **IBAMA, SISBIO** ou **CIBio**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 17 de fevereiro de 2014.

Campinas, 17 de fevereiro de 2014.

Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira  
Presidente

Fátima Alonso  
Secretária Executiva