UNIVERSIDADE DA REGIÃO DE JOINVILLE – UNIVILLE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E MEIO AMBIENTE

ALESSANDRA BETINA GASTALDI

EFEITO DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO NA DOR NEUROPÁTICA OBSERVADA EM UM MODELO DE SÍNDROME DA DOR COMPLEXA REGIONAL

JOINVILLE

2021

ALESSANDRA BETINA GASTALDI

EFEITO DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO NA DOR NEUROPÁTICA OBSERVADA EM UM MODELO DE SÍNDROME DA DOR COMPLEXA REGIONAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Meio Ambiente da Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profª. Drª. Daniela Delwing de Lima

Coorientadora: Profª Drª Samira Dal-Toé De Prá

JOINVILLE

2021

Catalogação na publicação pela Biblioteca Universitária da Univille

Gastaldi, Alessandra Betina
G255e Efeito das nanopartículas de ouro na dor neuropática observada em um modelo de síndrome da dor complexa regional / Alessandra Betina Gastaldi; orientadora Dra. Daniela Delwing de Lima; coorientadora Dra. Samira Dal-Toé de Prá. – Joinville: UNIVILLE, 2021.

119 f. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado em Saúde e Meio Ambiente – Universidade da Região de Joinville)

1. Dor crônica. 2. Dor – Tratamento. 3. Nanopartículas. I. Lima, Daniela Delwing de (orient.). II. Prá, Samira Dal-Toé de (coorient.). III. Título.

CDD 616.0472

Elaborada por Rafaela Ghacham Desiderato – CRB-14/1437

Termo de Aprovação

"Efeito das Nanopartículas de Ouro na Dor Neuropática Observada em um Modelo de Síndrome da Dor Complexa Regional"

por

Alessandra Betina Gastaldi

Dissertação julgada para a obtenção do título de Mestra em Saúde e Meio Ambiente, área de concentração Saúde e Meio Ambiente e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente.

Profa. Dra. Daniela Delwing de Lima
Orientadora (UNIVILLE)

Profa. Dra. Samira Dal-Toé De Prá
Coorientadora (UNISOCIESC)

Profa. Dra. Marta Jussara Cremer
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Daniela Delwing de Lima
Orientadora (UNIVILLE)

Profa. Dra. Samira Dal-Toé De Prá
Coorientadora (UNISOCIESC)

Profa. Dra. Débora Delwing Dal Magro
(FURB)

Profa. Dra. Therezinha Maria Novais de Oliveira
(UNIVILLE)

Joinville, 21 de maio de 2021

A todos aqueles que contribuíram e acompanharam o desenvolvimento deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer aos meus pais Joana e Vilson (*in memorian*) pela vida, pelo amor, pelo incentivo e por me deixarem o melhor legado que eu poderia receber: a educação. Agradeço juntamente as minhas irmãs, Larissa e Thália por todos os momentos de alegrias e tristezas e por acompanharem toda a minha trajetória.

Agradeço ao meu noivo Jonas por todo amor e carinho durante todos esses anos que estamos juntos, por todas as discussões sobre o conteúdo deste trabalho e por toda a ajuda, principalmente no último ano em que nosso maior presente chegou: a Aimée, a qual também agradeço por me mostrar a cada dia o amor verdadeiro.

A minha orientadora, Professora Dra. Daniela Delwing de Lima por sua forma magnífica de conduzir este trabalho, e por poder contar com seu apoio, respeito, incentivo, paciência e compreensão no decorrer deste processo. Fico extremamente agradecida de ter a oportunidade de ser sua orientanda e de produzir este trabalho em sua parceria. Você é inspiração por onde passa e me ensinou a ser uma profissional melhor e um espelho de mãe. Valeu a pena toda a espera para trabalhar com você!

A minha coorientadora, Professora Dra. Samira Dal-toé de Prá por todo o tempo disponibilizado e por todo conhecimento compartilhado para que este trabalho se concretizasse. Agradeço a aluna Maria Paula do curso de Fisioterapia por todo auxílio. Agradeço ainda a Prof. Dra. Gabriela pela prepração, caracterização e doação das nanopartículas utilizadas neste estudo.

Ao Professor MSc. Eduardo Manoel, por dispor do seu tempo e grandioso conhecimento, além de compartilhar os melhores sentimentos de empatia para comigo e nosso trabalho. Você não imagina o quão grandioso é!

Ao nosso grupo de pesquisa: Larissa, Thayná, Heloisa, Heloisi, Julia, Aline, Giovanna, Maria Helena, Maria Augusta, Scheila, Luana e Gabriela na realização desse trabalho. Agradeço imensamente a amizade, aos momentos de desabafo, aos finais de semana e pela realização das análises. Com certeza vocês foram parte essencial neste trabalho e não tenho dúvida das excelentes profissionais que vocês são/serão!

A turma XVIII do Mestrado em Saúde e Meio Ambiente pela amizade, troca de conhecimento e experiências. Não poderíamos ser uma turma melhor! Entretanto, deixo aqui um agradecimento especial as pessoas que mais me acompanharam nesta jornada dentro da turma, minhas amigas Sandra, Anajara, Karin e Samantha.

Não poderia esquecer de agradecer a todos os professores que compartilharam seus conhecimentos durante este período, em especial a Profa. Dra. Cynthia, bem como os demais funcionários da instituição envolvidos neste processo.

A Laura, aluna do curso de Farmácia e ao Jean, aluno do curso de Engenharia Ambiental.

A Fundação Pró-Rim e ao IPREPS por compreenderem todas as minhas ausências, ajustes de horários, bem como pelo auxílio financeiro.

Aos membros da banca de qualificação e de defesa, Profa. Dra. Therezinha Maria Novais de Oliveira, Profa. Dra. Débora Delwing Dal Magro por suas valiosas contribuições.

A todos os meus amigos e demais pessoas que se interessaram em conhecer um pouco a mais sobre este trabalho e me incentivaram a continuar para um dia mudar a vida das pessoas afetadas.

A UNIVILLE.

Não é o mais forte que sobrevive, nem o mais inteligente, mas o que melhor se adapta às mudanças.
Leon C. Megginson

O importante é não parar de questionar.
Albert Einstein

RESUMO

A alta prevalência (30 a 40%) de dor crônica na população brasileira (OLIVEIRA et al., 2013) alerta para a necessidade de estudos que caracterizem a incapacidade decorrente de quadros dolorosos crônicos e sugiram medicamentos para seu manejo. Segundo a Sociedade Brasileira para o Estudo da Dor, cerca de 50 a 60% dos pacientes que sofrem de algum tipo de dor crônica são parcial ou totalmente incapacitados, transitória ou permanentemente (OLIVEIRA et al., 2013), comprometendo significativamente a qualidade de vida e prejudicando capacidade de trabalho, ressaltando que este é um importante problema de saúde pública.e alvo para novos tratamentos. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito das AuNPs nas concentrações de 2,5mg/L, 7,0mg/L e 22,0mg/L, observada em um modelo de dor neuropática - Síndrome da Dor Complexa Regional Tipo I - (SDCR-I) e avaliar a presença de estresse oxidativo através da avaliação dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), conteúdo total de sulfidrilas, proteínas carboniladas e da atividade das enzimas antioxidantes (catalase – CAT, superóxido dismutase – SOD e glutationa peroxidase – GSH-Px) em sangue e nervo ciático, na fase aguda e crônica, em camundongos de 60 dias. O projeto (CEUA 004/1118) foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade da Região de Joinville. Os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com associação de xilazina (3 mg/kg) e quetamina (90 mg/kg). Para indução da SDCR-I, foi empregado e mantido um torniquete elástico ao redor da pata traseira esquerda do camundongo por 120 minutos. Foram realizadas medidas do limiar mecânico (empregando filamentos de von Frey pelo método up-and-down) e do limiar térmico ao frio (20 µL de acetona colocado na pele da pata dos animais). Os animais receberam administração intraperitoneal de AuNPs (concentrações de 2,5mg/L, 7,0mg/L e 22,0mg/L, nas doses de 0,025 mg/Kg, 0,07 mg/Kg e 0,22 mg/Kg respectivamente), veículo ou antagonista de receptor TRPA1 (HC030031) 300mg/kg/10mL, conforme o grupo analisado. As medidas foram realizadas nos dias 1, 2, 3 e 4 após a isquemia no modelo agudo e nos dias 1, 2, 3, 4, 5, 9,12 e 17 no modelo crônico. Os dados foram coletados e analisados estatisticamente pela ANOVA de uma e duas vias seguida do teste post hoc de Duncan e Bonferroni, respectivamente, quando indicado ($p<0,05$). No ensaio agudo e crônico, as AuNPs mostram-se promissoras para resultados anti-alodiníco mecânico e térmico nas três

concentrações 2,5, 7,0 e 22,0 mg/L analisadas. Em relação às análises de estresse oxidativo, verificou-se aumento na atividade antioxidante da CAT e da SOD em eritrócitos e os níveis de TBA-RS em plasma e nervo ciático em animais submetidos a indução de SDCR e essas alterações foram significativamente reduzidas pelo tratamento com as AuNPs (doses de 0,07 e 0,22 mg/kg). O nível de SH sofreu decréscimo significativo no plasma dos animais e essa diminuição foi significativamente revertida pelas AuNPs (doses de 0,07 e 0,22 mg/kg). Em nervo ciático, as AuNPs (dose de 0,22 mg/kg) diminuíram o teor de proteínas carboniladas. Os dados mostram que não ocorreram alterações significativas nos valores de transaminase glutâmico oxalacética (TGO), transaminase glutâmico pirúvica (TGP), ureia e de creatinina entre animais que receberam AuNPs e controles, concluindo que as AuNPs em tratamento de curto prazo, não causaram dano hepático ou renal significativo. Entretanto, mais estudos são necessários para corroborar com os resultados promissores obtidos até aqui, almejando o desenvolvimento de melhores alternativas terapêuticas para doenças como a SDCR.

Palavras-chave: Dor neuropática, Síndrome de dor complexa regional, Nanopartículas de ouro, tratamento com nanopartículas de ouro.

ABSTRACT

The high prevalence (30 to 40%) of chronic pain in the Brazilian population (OLIVEIRA et al., 2013) alerts to the need for studies that characterize the disability resulting from chronic painful conditions and suggest medications for its management. According to the Brazilian Society for the Study of Pain, about 50 to 60% of patients who suffer from some type of chronic pain are partially or totally incapacitated, transiently or permanently (OLIVEIRA et al., 2013), significantly compromising their quality of life and impairing work capacity, emphasizing that this is an important public health problem and a target for new treatments. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of AuNPs at concentrations of 2.5mg/L, 7.0mg/L and 22.0mg/L, observed in a model of neuropathic pain - Complex Regional Pain Syndrome Type I - (SDCR-I) and evaluate the presence of oxidative stress by evaluating the levels of thiobarbituric acid reactive substances (TBA-RS), total content of sulfhydryls, carbonyl proteins and the activity of antioxidant enzymes (catalase - CAT, superoxide dismutase - SOD and glutathione peroxidase – GSH-Px) in blood and sciatic nerve, in the acute and chronic phase, in 60-day-old mice. The project (CEUA 004/1118) was approved by the Animal Research Ethics Committee of the University of the Region of Joinville. The animals were anesthetized intraperitoneally with an association of xylazine (3 mg/kg) and ketamine (90 mg/kg). For induction of SDCR-I, an elastic tourniquet was used and maintained around the left hind paw of the mouse for 120 minutes. Measurements were taken of the mechanical threshold (using von Frey filaments by the up-and-down method) and the cold thermal threshold (20 µL of acetone placed on the skin of the animals' paws). The animals received intraperitoneal administration of AuNPs (concentrations of 2.5mg/L, 7.0mg/L and 22.0mg/L, at doses of 0.025 mg/Kg, 0.07 mg/Kg and 0.22 mg/Kg respectively), vehicle or TRPA1 receptor antagonist (HC030031) 300mg/kg/10mL, according to the analyzed group. Measurements were taken on days 1, 2, 3 and 4 after ischemia in the acute model and on days 1, 2, 3, 4, 5, 9,12 and 17 in the chronic model. Data were collected and statistically analyzed by one-way and two-way ANOVA followed by Duncan and Bonferroni post hoc test, respectively, when indicated ($p<0.05$). In the acute and chronic assay, AuNPs show promise for mechanical and thermal anti-allodynic results at the three concentrations

2.5, 7.0 and 22.0 mg/L analyzed. Regarding the oxidative stress analyses, there was an increase in the antioxidant activity of CAT and SOD in erythrocytes and the levels of TBA-RS in plasma and sciatic nerve in animals submitted to SDCR induction and these changes were significantly reduced by treatment with the AuNPs (doses of 0.07 and 0.22 mg/kg). The SH level decreased significantly in the plasma of the animals and this decrease was significantly reversed by AuNPs (doses of 0.07 and 0.22 mg/kg). In sciatic nerve, AuNPs (dose of 0.22 mg/kg) decreased the content of carbonyl proteins. The data show that there were no significant changes in the values of glutamic oxaloacetic transaminase (TGO), glutamic pyruvic transaminase (TGP), urea and creatinine between animals that received AuNPs and controls, concluding that AuNPs in short-term treatment did not cause damage significant liver or kidney. However, more studies are needed to corroborate the promising results obtained so far, aiming to develop better therapeutic alternatives for diseases such as CRPS.

Keywords: Neuropathic pain, Complex regional pain syndrome, Gold nanoparticles, treatment with gold nanoparticles.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – Geração dos potenciais de ação através de substâncias endógenas e exógenas. 28
Figura 02 – Reação de dismutação do radical O_2^- em H_2O_2 e O_2 33
Figura 03 – Reação de dismutação do H2O2 em O2 e H2O, através da enzima catalase 33
Figura 04 – Catálise da dismutação do H_2O_2 em H_2O e O_2 por meio da GSH-Px 34
Figura 05 – Planejamento experimental realizado, necessário para a concretização do estudo. 34
Figura 06 – Espectros eletrônicos para soluções aquosas de GNP-10nm. 42
Figura 07 – Padrão de DRX (Difratograma) de GNP-10 (reflexões a 38°). Cu Kα radiação (λ = 1,54056 Â, 30 kV, 30 mA). 42
Figura 08 – Microscopia eletrônica de transmissão e curva de tamanhos de GNP-10nm 42
Figura 09 – Processo de isquemia com torniquete elástico 42
Figura 10 – Nanopartículas de ouro nas concentrações de 2,5 mg/L, 7,0 mg/L e 22,0 mg/L respectivamente utilizadas nos ensaios agudo e crônico 43
Figura 11 – Cronograma de ensaios realizados no modelo agudo 44
Figura 12 – Cronograma de ensaios realizados no modelo crônico 44
Figura 13 - Filamentos de Von Frey 47
Figura 14 – Ambientação dos animais para experimentação 47
Figura 15 – Estimulação com filamentos de Von Frey 48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Definições relacionadas a dor e formas de percepção 19
Tabela 2 - Classificação dos nociceptores, conforme tipo de fibra, tamanho, velocidade da condução e função 22
Tabela 3 - Sistemas enzimáticos antioxidantes conforme sua ação biológica e seus sítios de ação 32

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Protocolo experimental para o modelo agudo e crônico de SDCR 46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AuNPs: Nanopartículas de ouro

CAT: Catalase

CGRP - Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

DPIC – Dor pós isquemia crônica

ERO: Espécies Reativas de Oxigênio

GNPs – Nanopartículas de Ouro

GSH: Glutationa

GSH-Px: Glutationa Peroxidase

O2: Oxigênio

O2 •-: Radical Superóxido

OH•: Radical Hidroxil

RNA: Ácido Ribonucleico

SDCR: Síndrome da Dor Complexa Regional

SDCR – I: Síndrome da Dor Complexa Regional tipo I

SH - Sulfidrilas

SOD - Superóxido Dismutase

SP - Substância P

TBA-RS: Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TRP: Receptor de potencial transitório

TRPA1: Receptor de potencial transitório anquirina 1

TRPV1: Receptor de potencial transiente vanilóide do tipo 1

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 18
2 OBJETIVOS 20
2.1 Objetivo geral 20
2.2 Objetivos específicos 20
3 REVISÃO 22
3.1 Dor 22
3.2 Nocicepção 23
3.3 Fisiopatologia da dor 24
3.4 Transmissão do estímulo doloroso 25
3.5 Receptor TRPA1 27
3.6 Dor crônica 29
3.7 Síndrome da Dor Complexa Regional – SDCR 30
3.8 Isquemia-reperfusão 33
3.9 Espécies reativas de oxigênio (EROs) 34
3.10 Radicais livres 36
3.11 Estresse oxidativo 37
3.12 Mecanismo de danos às moléculas 37
3.12.1 Peroxidação lipídica ou lipoperoxidação 38
3.12.2 Danos às proteínas 38
3.12.3 Danos ao DNA 39
3.13 Sistema antioxidante 39
3.13.1 Superóxido Dismutase (SOD) 41
3.13.2 Catalase (CAT) 42
3.13.3 Glutationa Peroxidase (GSH-Px) 43
3.14 Toxicidade Hepática e Renal 43
3.14.1 Dano Hepático 44
3.14.2 Dano Renal 44
3.15 Nanotecnologia, nanociência e nanopartículas 45
3.15.1 Uso de nanopartículas em pesquisas médicas 46
3.15.2 Nanopartículas de ouro 47
3.15.3 Nanopartículas e legislação 48
3.15.4 Caracterização das nanopartículas de ouro 49

4 METODOLOGIA 51
4.1 Animais 52
4.2 Síntese de nanopartículas 54
4.3 Caracterização das nanopartículas de ouro (AuNPs) 54
4.4 Protocolos experimentais 58
4.4.1 Modelo de indução de dor associada a isquemia-reperfusão 60
4.5 Administração de nanopartículas de ouro e antagonista do receptor TRPA1 61
4.6 Testes para avaliar o desenvolvimento de dor 63
4.6.1 Alodinia Mecânica (estímulo mecânico) 63
4.6.2 Alodinia térmica 65
4.7 Estudos bioquímicos e preparo das amostras 65
4.7.1 Sacrifício dos animais 65
4.7.2 Preparação dos eritrócitos e do plasma 66
4.7.3 Preparação do nervo ciático 66
4.8 Avaliação dos parâmetros de estresse oxidativo 66
4.8.1 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) 66
4.8.2 Conteúdo Total de Sulfidrilas 67
4.8.3 Catalase 67
4.8.4 Glutationa Peroxidase (GSH-Px) 67
4.8.5 Superóxido Dismutase (SOD) 68
4.8.6 Conteúdo de proteínas carboniladas 68
4.8.7 Dosagem de Proteínas 69
4.9 Investigação de hepatotoxicidade e nefrotoxicidade de nanopartículas de ouro 69
4.10 Análise estatística 69
5 INTERDISCIPLINARIDADE 71
6 RESULTADOS E DISCUSSÕES 73
6.1 Artigo: EFFECT OF GOLD NANOPARTICLES ON NEUROPATHIC PAIN OBSERVED IN A MODEL OF COMPLEX REGIONAL PAIN SYNDROME 73
CONSIDERAÇÕES FINAIS 107
REFERÊNCIAS 109

1 INTRODUÇÃO

A alta prevalência (30% a 40%) de dor crônica na população brasileira (OLIVEIRA et al., 2013) alerta para a necessidade de estudos que busquem caracterizar a incapacidade oriunda de quadros dolorosos crônicos e sugerir medicamentos para seu manejo. Segundo a Sociedade Brasileira para o Estudo da Dor, cerca de 50 a 60% dos pacientes que sofrem de algum tipo de dor crônica ficam parcial ou totalmente incapacitados, de maneira transitória ou permanente (OLIVEIRA et al., 2013), comprometendo de modo significativo a qualidade de vida e dificultando a capacidade de trabalho, apontando que este é um importante problema de saúde pública.

A Síndrome da Dor Complexa Regional Tipo I (SDCRI) é uma das síndromes de dor crônica mal adaptativas e de controle aquém do esperado. É uma condição clínica que se caracteriza por um quadro de dor intensa, associada a múltiplas alterações autonômicas e sensitivo-motoras que pode surgir de forma espontânea (raro) ou, mais frequentemente, após um traumatismo, sendo a intensidade das manifestações clínicas desproporcional ao estímulo desencadeante (SILVA *et al.*, 2018). Reconhecem-se dois subtipos que se distinguem, genericamente, pela existência ou não de lesão nervosa associada (tipos II e I, respectivamente). A dor pode surgir após um traumatismo, não respeitar a distribuição de um único nervo periférico e estar associada a alodinia, hiperalgesia, edema, alterações da vascularização cutânea e da sudação na área atingida (SILVA *et al.*, 2018).

A dor em SDCRI é muitas vezes descrita como em queimação, característica de dor neuropática típica. Na maioria dos casos, a SDCRI ocorre após uma fratura, trauma de membros, ou lesão do sistema nervoso periférico ou central. Às vezes, os sintomas se desenvolvem sem qualquer trauma (GIERTHMUHLEN, BINDER, BARON, 2014).

Apesar do mercado mundial de fármacos analgésicos ser de cerca de 25 bilhões de dólares/ano e dos analgésicos da classe dos anti-inflamatórios não esteroides estarem entre os fármacos mais vendidos em todo mundo, o controle farmacológico efetivo de alguns tipos de dor ainda se mostra um grande desafio para a comunidade médico-científica (ELY et al., 2015). Dessa maneira, os fármacos utilizados para o tratamento da dor crônica associada a inflamação ou neuropatia

apresentam limitações relacionadas principalmente à falta de eficácia e ao desenvolvimento de efeitos adversos (OLIVEIRA JÚNIOR, CORRÊA, FERREIRA, 2016). Devido ao exposto, tem se dado ênfase à procura de novos alvos moleculares para o tratamento da SDCR, que foi descrita como uma dor que o paciente sente, sendo desproporcional ao evento que a desencadeia. É uma patologia hiperalgésica, afetando estruturas musculoesqueléticas, neurais e vasculares, sendo seu diagnóstico e tratamento desafiadores devido a sua natureza e dinâmica de apresentação e progressão (NEUMEISTER & ROMANELLI, 2020).

No processo de busca por novos fármacos analgésicos, a pesquisa pré-clínica é importante para a definição de metas, como tratamentos mais efetivos para alívio da dor, conforto do paciente e minimização de riscos para o indivíduo, sendo fundamental na busca da fisiopatologia dos mecanismos envolvidos na doença, a fim de propor terapias mais eficazes e seguras.

Considerando o potencial anti-inflamatório e analgésico das nanopartículas de ouro (CHEN, 2013) e a relativa dificuldade de controlar a dor da SDCR, é possível que as nanopartículas constituam uma alternativa eficaz e segura em amenizá-la, investigação que foi iniciada no presente estudo de modo pré-clínico.

Ainda que procedimentos que causam dor sejam necessários para o estudo de novos fármacos analgésicos, o desconforto causado pelos métodos de indução de dor aqui utilizados foi apenas o necessário para evidenciar o efeito do fármaco em estudo, sendo os animais mantidos e manuseados com cuidado e atenção durante todo o período de estudo, dentro de parâmetros éticos nacionais e internacionais de recomendações que garantiram a minimização possível de sofrimento e angústia nos animais utilizados na pesquisa.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito das nanopartículas de ouro na redução da dor neuropática observada em um modelo pré-clínico de Síndrome da Dor Complexa Regional em camundongos.

2.2 Objetivos específicos

1. Testar se nanopartículas de ouro, em diferentes concentrações (2,5 mg/L, 7,0 mg/L e 22,0 mg/L, nas doses de 0,025 mg/Kg, 0,07 mg/Kg e 0,22 mg/Kg respectivamente), tem a capacidade de antagonizar ou dessensibilizar o receptor TRPA1 e reduzir sinais de dor observados na SDCR, comparando-as ao antagonista de receptor TRPA1, através das medidas de alodinia mecânica e térmica;
2. Avaliar a presença de estresse oxidativo através da avaliação dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), conteúdo total de sulfidrilas e de proteínas carboniladas e da atividade das enzimas antioxidantes catalase, superóxido dismutase e glutationa peroxidase, nas fases aguda e crônica, do modelo de SDCR em sangue de camundongos;
3. Avaliar a presença de estresse oxidativo através da avaliação dos níveis de TBA-RS, conteúdo total de sulfidrilas e de proteínas carboniladas e da atividade das enzimas antioxidantes catalase, superóxido dismutase e glutationa peroxidase, nas fases aguda e crônica, no modelo de SDCR em nervo ciático de camundongos;
4. Verificar se as nanopartículas de ouro, em diferentes doses (0,025 mg/Kg, 0,07 mg/Kg e 0,22 mg/Kg), têm a capacidade de minimizar os níveis de TBA-RS, conteúdo total de sulfidrilas e de proteínas carboniladas, nas fases aguda e crônica, no modelo utilizado para reprodução da SDCR em sangue e nervo ciático de camundongos;
5. Verificar se as nanopartículas de ouro, em diferentes doses (0,025 mg/Kg, 0,07 mg/Kg, 0,22 mg/Kg), altera a atividade das enzimas antioxidantes catalase, superóxido dismutase e glutationa peroxidase, nas fases aguda e crônica, no modelo utilizado para reprodução da SDCR em sangue e nervo ciático de camundongos;

6. Avaliar se as nanopartículas de ouro, em diferentes doses (0,025 mg/Kg, 0,07 mg/Kg e 0,22 mg/Kg) ocasionam toxicidade renal e hepática, nas fases aguda e crônica, no modelo utilizado para reprodução da SDCR em sangue de camundongos.

3 REVISÃO

3.1 Dor

A dor é um fenômeno universal, vivenciado em todas as faixas etárias, níveis econômicos e em todas as situações e ambientes, sendo subjetiva e particular de cada indivíduo. A dor constitui um dos principais motivos pelo qual o indivíduo procura assistência em saúde para obter alívio. Geralmente, neste momento, a dor já impossibilita o indivíduo nas atividades do dia a dia, influenciando no psicológico, social, fisiológico e econômico (KAZANOWSLI & LACCETTI, 2005). É também um sinal de alerta para proteção fisiológica, considerada essencial para detectar e minimizar estímulos nocivos (WOOLF, 2010), mas pode se tornar uma situação debilitante como é o caso da dor crônica (DE PRÁ, 2017).

Dor é a sensação mais comumente encontrada dentro da clínica médica, possuindo uma característica muito particular e enfrentada de formas variadas conforme o tipo da dor, intensidade, experiências prévias do sujeito, estado psicológico do indivíduo e condições ambientais em relação a dor (MARTELLI & ZAVARIZE, 2013).

A definição de dor foi aceita em 1979 pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) que na época era defendida como “Uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a danos teciduais reais ou potenciais, ou descrita em termos de tais danos”. Essa definição foi amplamente aceita por profissionais de saúde e pesquisadores no campo da dor e adotada por várias organizações profissionais, governamentais e não-governamentais, incluindo a Organização Mundial de Saúde. Entretanto, alguns especialistas sugeriram uma reavaliação do conceito, propondo modificações, que foram aceitas por unanimidade em maio de 2020, sendo definida como "Uma experiência sensorial e emocional desagradável associada ou semelhante à associada a um dano tecidual real ou potencial” (RAJA et al, 2020).

Foram incluídas além da definição, seis diretrizes e a etimologia da palavra dor para um contexto valioso adicional, incluindo que a dor, embora tenha um papel adaptativo, é uma experiência pessoal e que sofre influência em vários graus por fatores diversos como biológicos, psicológicos e sociais. A dor é conceituada pelo indivíduo através de suas experiências de vida e seu relato de dor deve ser

respeitado, sendo sua descrição verbal apenas um dos vários comportamentos para expressar dor; porém a incapacidade de se comunicar não nega a possibilidade de sentir dor, sendo um humano ou não humano, há várias formas de expressar e medir dor através da análise comportamental. (RAJA et al, 2020).

Faz-se necessário entender a fisiopatologia da dor para analisar que os estímulos nocivos são detectados por receptores de dor ou nociceptores, que são terminações nervosas que respondem especificamente a estímulos prejudiciais, transmitindo a informação para a medula espinhal e posteriormente para centros nervosos superiores, como tronco cerebral, tálamo, córtex somatossensorial, e sistema límbico (JARDÍN et al, 2017).

3.2 Nocicepção

Dor e nocicepção são fenômenos diferentes. A dor não pode ser inferida apenas a partir da atividade nos neurônios sensoriais (RAJA et al, 2020). A nocicepção está relacionada com o processo de codificação neural de processamento de estímulos nocivos que permite aos animais sentir e evitar estímulos potencialmente prejudiciais aos tecidos, é fundamental para a sobrevivência (ALVES et al, 2017; TRACEY, 2017).

A utilização do termo nocicepção está relacionada com o reconhecimento de sinais dolorosos pelo sistema nervoso, que formulam informações relacionadas à lesão (KLAUMANN, et al 2008). Baseado nos conceitos de dor e nocicepção, o termo dor seria melhor aplicado a seres humanos do que aos animais, pelo fato deste termo envolver um componente emocional (KLAUMANN, et al 2008).

Uma das principais funções dos nociceptores é a detecção de estímulos que possam ser potencialmente prejudiciais presentes no ambiente como calor, mecânica e química com um limiar que permite realizar atividades sem dor, mas ainda com a sensibilidade suficiente para alertar sobre o risco de danos (JARDÍN et al, 2017; TRACEY, 2017).

O resultado da sensibilização periférica é o estabelecimento de hiperalgesia, quando um estímulo normalmente doloroso provoca uma resposta exacerbada, e alodinia, quando um estímulo normalmente inócuo resulta em dor (ALVES et al, 2017).

Segundo Klaumann et al (2008) algumas definições são importantes quando relacionadas a sensação dolorosa e suas formas de percepção. Estas definições estão descritas na tabela 1:

Tabela 1 - Definições relacionadas a dor e formas de percepção.

Conceito	Descrição
Nociceptor	Receptor periférico que responde a estímulos nocivos
Limiar à dor	A menor intensidade de estímulo que permite ao indivíduo perceber a dor
Alodinia	Dor que surge como resultado de estimulação não-nociva sobre a pele normal
Hiperalgesia	Aumento da resposta dolorosa produzida por um estímulo nocivo
Analgesia	Redução ou anulação da dor

Fonte: Klaumann et al, 2008.

3.3 Fisiopatologia da dor

A dor pode ser classificada em diferentes categorias: em relação temporal – aguda, quando sua ocorrência é recente ou crônica quando sua duração é prolongada. Pode ainda ser baseada no mecanismo fisiopatológico que a desencadeou (NAIDU & PHAM, 2015; OLIVEIRA et al., 2016).

Embasada no mecanismo fisiológico, a dor pode ser nociceptiva, inflamatória ou neuropática. A dor nociceptiva é aquela produzida por estímulos nocivos que ocorrem sem dano ou sensibilização do tecido. Neste tipo de dor, um estímulo nocivo é detectado, mas nenhuma mudança fisiológica ocorre para afetar o sistema nervoso.

A dor inflamatória, que consiste de danos nos tecidos que levam a inflamação e consequente sensibilização do sistema de percepção sensorial, alterando toda a fisiologia que diminui a capacidade discriminatória de nociceptores periféricos, bem como o aumento da sensibilidade estimulatória, incluindo dor espontânea (NAIDU & PHAM, 2015).

Por fim, a dor neuropática é iniciada ou causada por uma lesão ou disfunção no sistema nervoso central e/ou periférico. A dor neuropática geralmente não é reversível e muitas vezes considerada muito mais grave e resistente ao tratamento, devido a adversidade. A dor neuropática é produzida pelo dano ao tecido nervoso, por uma lesão ou doença do sistema somatossensorial, incluindo fibras periféricas (fibras Aβ, Aδ e C) e neurônios centrais, e afeta 7–10% da população geral (COLLOCA et al, 2017). Caracteriza-se pela aparição de hiperalgesia, dor espontânea, parestesia e alodinia mecânica e por frio (KLAUMANN et al, 2008; NAIDU & PHAM, 2015; COLLOCA et al, 2017), processados por nociceptores especializados que constituem a primeira linha de defesa do sistema somatossensorial. A detecção desses estímulos depende da família de canais de íons do potencial receptor transiente (TRP), que é ativada mediante pressão prejudicial, temperatura extrema ou produtos químicos endógenos e exógenos tóxicos (COLLOCA et al, 2017).

3.4 Transmissão do estímulo doloroso

O fenômeno sensitivo doloroso é baseado em uma cadeia de eventos que se inicia com a transformação dos estímulos ambientais físicos ou químicos em potenciais de ação, que são posteriormente transferidos das fibras nervosas periféricas para o sistema nervoso central (OLIVEIRA et al, 2016).

A capacidade de um indivíduo perceber o estímulo potencialmente danoso para os tecidos (nocicepção) e causar dor, é um processo complexo que engloba uma série de eventos: transdução, transmissão, modulação, e percepção do dano tecidual real ou potencial (CASTRO, 2008; MUIR, 2010).

A percepção da dor consiste num conjunto de mecanismos cerebrais em que se discrimina, descodifica e se atribui significado ao fenômeno doloroso (KLAUMANN et al, 2008; VITOR et al, 2008; TORTORA et al, 2016).

A percepção da dor acontece em dois diferentes estágios: o primeiro, denominado nocicepção, refere-se à transdução do estímulo doloroso ao SNC por receptores especializados, denominados nociceptores. O segundo estágio se refere ao processamento dessa informação nociceptiva, levando a percepção consciente da dor (VITOR et al, 2008).

Na transdução, a energia do estímulo é convertida em atividade eletrofisiológica, onde independente da natureza do estímulo, esse provoca imediatamente uma mudança no potencial de membrana, alterando a permeabilidade de íons. Neste processo, o qual ocorre nos nociceptores, o estímulo nocivo é transformado num impulso elétrico ou potencial de ação (KLAUMANN et al, 2008; OLIVEIRA et al, 2016). Na segunda etapa, denominada transmissão, a informação é transmitida através da medula espinhal para o tronco encefálico e tálamo e, finalmente, ao córtex somatossensorial, a partir do qual tem-se consciência da dor. Trata-se da propagação do impulso elétrico através das vias nociceptivas (MOFFAT & RAE, 2010; VITOR et al, 2008).

A modulação, a qual corresponde a terceira etapa, consiste em um conjunto de mecanismos que atenuam ou amplificam os impulsos nociceptivos, podendo ser de nível periférico ou central. É na região do corno posterior (onde estão localizados ou neurônios sensitivos, que transmitem as informações sensoriais provenientes de outras partes do corpo através da medula espinhal até o cérebro (VITOR et al, 2008; KLAUMANN et al, 2008).

A classificação dos nociceptores é baseada em vários critérios, como a velocidade de condução, diâmetro do axônio ou expressão de marcadores bioquímicos e moleculares. Funcionalmente, os nociceptores podem ser classificados com base em suas respostas ao frio nocivo, calor nocivo e estímulos mecânicos de alto limiar, bem como sua resposta a uma variedade de substâncias químicas (VIANA, 2016). A classificação dos nociceptores está evidenciada na tabela 2, onde são classificados em três grandes grupos, segundo seu diâmetro, seu grau de mielinização e sua velocidade de condução. Devido a estrutura dessas fibras nervosas ou por possuírem o revestimento de mielina, a velocidade de condução do estímulo será diferenciada.

Tabela 2 - Classificação dos nociceptores, conforme tipo de fibra, tamanho, velocidade da condução e função.

Tipo de fibra	Tamanho da fibra	Velocidade de condução	Função
Fibras Aβ	Diâmetro grande (maior que 10 µm), mielinizadas	Rápida (30 – 100m/s)	Responsáveis por sensações inócuas, aplicadas a pele, músculos e articulações
Fibras Aδ	Diâmetro intermediário (2 a 6µm), pouco mielinizadas	Intermediária (1,2 – 30m/s)	Modula a primeira fase da dor: mais aguda ou semelhante à pontada
Fibras C	Diâmetro pequeno (0,4 a 1,2 µm), não mielinizadas	Lenta (0,5 – 2,0 m/s)	Responsáveis pela segunda dor ou dor difusa, queimação persistente

Fonte: KLAUMANN et al, 2008; RIOS, 2014.

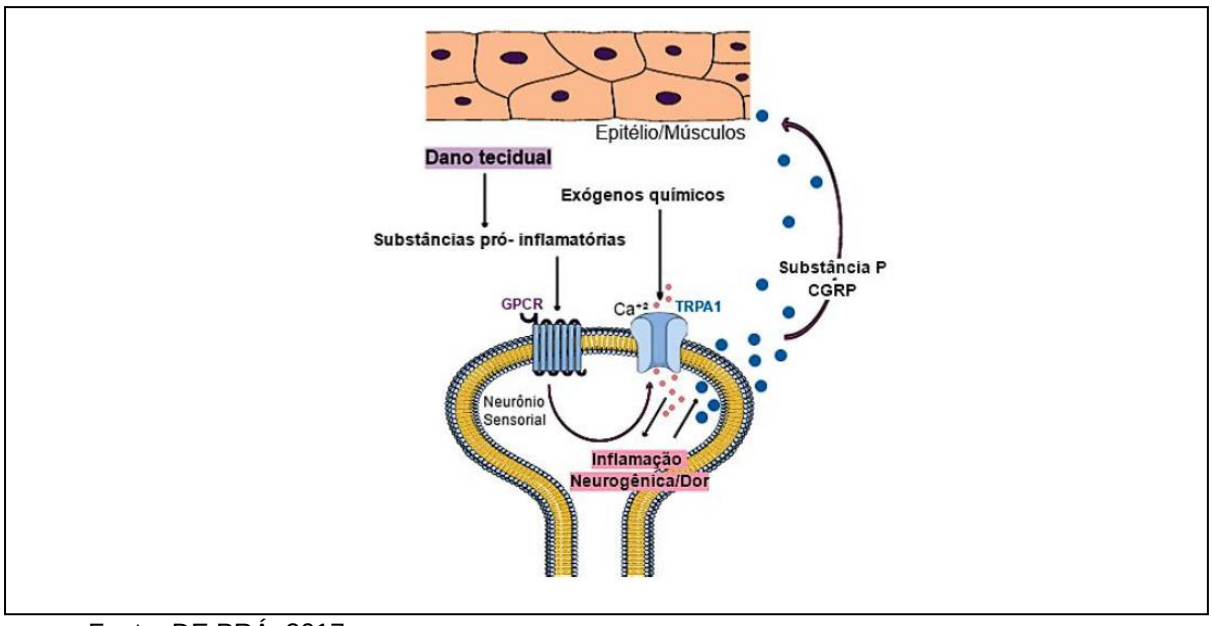
3.5 Receptor TRPA1

Os estímulos nocivos percebidos através de nociceptores são mediados por transdutores de alto limiar, capazes de converter estímulos térmicos, mecânicos e químicos em fluxos de íons que estimulam os neurônios a produzir um impulso sensorial (PATAPOUTIAN et al, 2009).

Para a transmissão desses impulsos, a família de proteínas transdutoras de canais iônicos nociceptivos que mais se destaca são as do canal de receptores de potencial transitório, denominadas TRP, sendo as de maior destaque as classes TRPV1 e TRPA1 (PATAPOUTIAN et al, 2009; JARDÍN et al, 2017; TRACEY, 2017; KOIVISTO et al, 2018), sendo extensivamente investigados e considerados alvos validados para o desenvolvimento de novos analgésicos, porque estão envolvidas na detecção de estímulos térmicos e químicos potencialmente prejudiciais ao organismo (PATAPOUTIAN et al, 2009). Esta família possui uma ampla gama de ativadores endógenos e exógenos como compostos químicos, temperatura, estímulos mecânicos, osmolaridade, lipídios, luz, espécies reativas ao oxigênio, peróxido de hidrogênio, componentes do estresse oxidativo e pH (ANDERSSON et al. 2008; BESSAC et al. 2008; SAWADA et al. 2008; MIYAMOTO et al. 2009;

GIORGI et al, 2019). A ativação do TRPA1 por esses fatores endógenos e exógenos induz dor espontânea e inflamação neurogênica (DE PRÁ, 2017), conforme figura 01. O receptor é relevante para a liberação de neuropeptídeos (SP e CGRP) causando inflamação neurogênica, além de auxiliar na geração de potenciais de ação que contribuem para a transmissão de estímulos dolorosos até centros supra-espinhais (DE PRÁ, 2017).

Figura 01: Geração dos potenciais de ação através de substâncias endógenas e exógenas.



Fonte: DE PRÁ, 2017.

Evidências crescentes sugerem um papel importante em estados de dor aguda, inflamatória e crônica para um subconjunto de canais iônicos de potencial receptor transiente (TRP). Dentre eles, o TRPA1, integrante da subfamília TRPA, é um dos alvos para estudar os mecanismos da dor e ele é conhecido por ser ativado por vários estímulos nociceptivos (GUPTA et al, 2016).

O TRPA1 também chamado de P120 ou ANKTM1 é o único membro da subfamília TRPA e é especializado na transdução de estímulos nocivos em mamíferos, é um canal iônico ativado por substâncias oxidantes, podendo ser sensibilizado após inflamação tecidual (ANTONIAZZI et al, 2018). Ele está amplamente distribuído por todo o corpo em tecidos neurais (fibras nervosas sensoriais) e não neurais (CONKLIM et al, 2019). Ele contribui para a transdução de

estímulos nocivos para sinais elétricos (KOIVISTO et al, 2018). Originalmente, TRPA1 foi considerado para detectar frio nocivo e, portanto, a dor causada pelo frio que ultrapassa a faixa fisiológica tolerável. No entanto, estudos posteriores sugeriram que TRPA1 está envolvido na detecção de hipersensibilidade ao frio (KOIVISTO et al, 2018).

As respostas das fibras nervosas aferentes primárias nociceptivas à estimulação mecânica nociva foram atenuadas pelo bloqueio farmacológico ou genético do TRPA1, indicando que os canais periféricos do TRPA1 contribuem para a nocicepção mecânica (KOIVISTO et al, 2018).

A ativação do potencial receptor transitório da anquirina 1 (TRPA1) aumenta o fluxo sanguíneo, o edema e a recepção da dor (CONKLIM et al, 2019). Eles são canais catiônicos não seletivos que permeiam principalmente o cálcio, mas também o potássio e o sódio. O influxo de cálcio para a célula desencadeia várias ações, como proliferação celular, morte celular, transcrição gênica e liberação de neurotransmissores (GIORGI et al, 2019).

Os antagonistas que atuam nesses dois canais (TRPV1 e TRPA1) são candidatos promissores como analgésicos em virtude do bloqueio da ativação dos canais em resposta a estímulos nocivos ou inflamação (PATAPOUTIAN et al, 2009). O antagonismo do TRPA1 é um alvo terapêutico promissor para a dor neuropática. O HC-030031 (Sigma-Aldrich®) é um bloqueador seletivo do canal TRPA1, antagonizando o influxo de cálcio e a dor (Sigma-Aldrich, 2019), sendo conhecidamente um promotor de efeitos antinociceptivos, antiinflamatórios (reduz o edema e a infiltração de células inflamatórias) e antioxidantes (diminuiu os níveis da SOD - ANTONIAZZI et al, 2018).

3.6 Dor crônica

A IASP define como a dor crônica que dura ou recorre por mais de três meses, e esta afeta 20% das pessoas em todo o mundo (IASP, 2019). A dor crônica é definida como uma dor contínua ou recorrente, possui função de alerta, tendo muitas vezes uma etiologia incerta, não desaparecendo com o emprego dos procedimentos terapêuticos convencionais e é causa de incapacidades e inabilidades prolongadas (TEIXEIRA, 2011; SMITH et al, 2011; CELICH & GALON, 2009).

Devido a sua duração longa, a dor crônica compromete a homeostase e deixa de ser sinal de alerta, causando comprometimento funcional, sofrimento, incapacidade progressiva e custo socioeconômico (MARTINEZ, 2004).

3.7 Síndrome da Dor Complexa Regional – SDCR

A SDCR teve sua primeira descrição no século XVII, pelo médico Ambroise Paré, após tratar com sucesso uma síndrome de dor intensa e persistente que ocorreu ao rei francês Charles IX após uma flebotomia de membro. Entretanto, foi Silas Weir Mitchell, considerado o pai da neurologia, o responsável pela primeira descrição detalhada de SDCR em 1864 (LAU & CHUNG, 2004).

Mitchell dedicou os primeiros anos de sua carreira aos soldados feridos por tiros durante a Guerra Civil Americana, que possuíam lesões nos nervos periféricos. Entre todas as doenças que descreveu, havia uma síndrome caracterizada por uma dor crônica, que descrevia como queima, localizada distalmente ao local da lesão do nervo periférico. A descrição dada foi sugestiva e descreveu minuciosamente os sinais e sintomas da doença hoje conhecida como SDCR (BARROS, 2017).

O termo SDCR foi desenvolvido a fim de explicitar as características da doença (STANTON-HICKS et al, 1995; BARROS, 2017) - *síndrome:* indica que os sinais e sintomas da SDCR são uma série de eventos distintos correlacionados; *dor:* é essencial para o diagnóstico da síndrome. A dor pode ser espontânea ou evocada, como alodínia ou hiperalgesia; *complexa:* expressa as variadas características clínicas dentro de uma única pessoa ao longo do tempo, bem como as características de inflamação e alterações autonômicas, cutâneas, motoras e distróficas; *regional:* reflete que a maioria dos casos envolvem uma determinada região do corpo, muito embora a dor possa expandir para além da área da lesão inicial.

A SDCR é caracterizada por dor intensa que acomete uma extremidade do corpo, além de edema, aumento da sensibilidade ao frio e ao toque, sudorese, alteração de coloração e diminuição da capacidade de movimento (BORTAGARAY et al, 2019). Apesar de não possuir uma causa bem definida, a SDCR geralmente se desenvolve após uma lesão nas extremidades e está relacionada a traumas, normalmente ocasionados por entorses, fraturas, luxações, lacerações, contusões e distensões, além de imobilização prolongada, gesso apertado, traumas cirúrgicos,

períodos pós-operatórios, após processos inflamatórios, infarto do miocárdio, acidente vascular encefálico, infecção, injeções, tumores e isquemia do membro (FELIU; EDWARDS, 2010; ARTIOLI et al, 2011; CORDON et al, 2002; BIRKLEIN & DIMOVA, 2017).

A SDCR apresenta variados sinais e sintomas, localiza-se preferencialmente na extremidade do membro acometido, sendo descrita dor espontânea ou contínua em queimação, latejamento, esmagamento, punhalada, choque ou torção; alodínia; hiperpatia; hiperalgesia; edema regional; hiperestesia; sudorese e temperatura local aumentada; alterações da pele (brilhosa e eritematosa); osteopenia e déficit motor (ARTIOLI et al, 2011).

Há dois tipos de SDCR: a tipo I, também chamada de distrofia simpático reflexa (DSR), trata de uma neuropatia que pode se desenvolver a partir de um trauma numa extremidade corpórea sem que ocorra lesão nervosa, e a tipo II, também conhecida como causalgia, difere do tipo I justamente por apresentar lesão nervosa, mesmo que parcial, para confirmação diagnóstica. No tipo II, a lesão do nervo periférico geralmente está localizada distal ao gânglio da raiz dorsal, mas os casos causados por uma lesão da raiz nervosa são extremamente raros (FELIU; EDWARDS, 2010; BRATTI, 2011, PARK et al, 2018).

Entre os principais sintomas que acometem indivíduos com SDCR do tipo I encontram-se dor espontânea, resposta dolorosa exacerbada a diversos estímulos (hiperalgesia), dor evocada por estímulos inócuos (alodínia), disfunção da regulação vasomotora e anormalidades motoras (VELDMAN et al., 1993; BRATTI, 2011). Embora a SDCR tipo I e II possam ser fisiopatologicamente diferentes, os sintomas clínicos permanecem os mesmos (PARK et al, 2018).

Bortagaray e colaboradores (2019) descrevem que a base do diagnóstico desta síndrome permanece clínica e não há um padrão ouro para diagnóstico, pois não há indicadores de imagem ou marcadores séricos precisos. A indicação de tratamento é baseada no acompanhamento do paciente pela equipe multiprofissional devido aos vários componentes da doença.

Como alternativa farmacológica para o alívio da dor crônica, estão incluídos os antidepressivos, como inibidores seletivos da recaptação da serotonina e antidepressivos tricíclicos, aplicação tópica de gel e manejo intravenosa de cetamina, anticonvulsivantes devido sua capacidade de estabilizar os neurônios

hiperexcitáveis, bloqueadores dos canais de cálcio estabilizando a membrana celular, que pode resultar no alívio da dor (NEUMEISTER & ROMANELLI, 2020).

A pesquisa de terapias especificamente para SDCR tem sido escassa, sendo tratamento para essas síndromes amplamente baseado em estratégias terapêuticas adaptados de estados de dor neuropática que não a SDCR (GIERTHMUHLEN, BINDER, BARON, 2014). Embora o entendimento fisiopatológico tenha avançado, nem todos os aspectos da síndrome da dor neuropática têm sido explorados de modo a permitir proveito terapêutico.

Mecanismos fisiopatológicos consideram basicamente três mecanismos principais: reforço da inflamação neurogênica periférica, disfunção do sistema nervoso simpático e reorganização estrutural no sistema nervoso central. O tratamento geralmente requer uma abordagem multidisciplinar, incluindo intervenções médicas e não médicas (BIRKLEIN, SCHLERETH, 2015).

O estudo pré-clínico da SDRC é realizado quando da avaliação do potencial terapêutico de diferentes tratamentos. Uma das formas de reproduzir a SDRC em camundongos é por meio do modelo de isquemia-reperfusão, no qual a privação de oxigênio seguida de reperfusão resulta em geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) o suficiente para provocar dano tecidual desencadeador de inflamação, morte celular e necrose tecidual (ROCHA et al., 2012), reproduzindo a neuropatia em questão de modo a permitir a mensuração da eficácia de compostos em teste sobre a dor.

A epidemiologia da SDCR ainda não está bem definida, principalmente no Brasil. Todavia, alguns estudos fornecem informações importantes a respeito dessa fisiopatologia, sendo a média de idade de 41 anos, com predomínio de mulheres, numa relação de 3:1 (VELDMAN et al, 1993), corroborando com os estudos de Allen et al (1999), em que a média de idade corresponde a 41,8 anos. Allen et al (1999), atestou que a relação entre mulheres e homens é de 2,3:1, sendo pouco frequente em crianças, mas quando acometida nesta faixa etária, possui início da sintomatologia entre 9 e 15 anos de idade (CORDON, 2002).

Estudos mais recentes como o de base populacional de Drummond (2010) retrata uma ocorrência de 5,5 casos a cada 100.000 habitantes/ano nos Estados Unidos, com identificação de 20.000 a 80.000 casos novos por ano. Já Sethna et al (2007) retrata 26,2 casos por 100.000 habitantes ano nos Países Baixos. A incidência aumenta com a idade (até setenta anos) e 3 a 4 vezes mais mulheres que

homens são afetados, sendo os membros superiores são mais afetados (60%) que os inferiores (40%). Quanto as causas, as fraturas merecem destaque (45%), entorses (18%) e cirurgias eletivas (12%) são os eventos principais desencadeantes relatados (MOS, 2007).

3.8 Isquemia-reperfusão

Além da lesão motivadora do dano ao nervo que guarda relação com o desencadeamento da SDCR, o desequilíbrio entre perfusão inadequada e reperfusão pode contribuir para a instalação da SDCR, podendo ser ocasionada após trauma ou compressão de membros, na medida em que a isquemia-reperfusão (I/R), que é caracterizada pela privação inicial do fluxo sanguíneo para os tecidos e órgãos (isquemia) é seguida pela restruturação do fluxo sanguíneo (reperfusão). O período isquêmico resulta em alterações celulares que alteram as vias de sinalização subsequentes e a expressão molecular (MONTALTO et al., 2003; WADA et al., 2001; LIANGOs et al., 2010).

As lesões por isquemia e reperfusão culminam em diversos efeitos deletérios para os mais diferentes tipos de órgãos. Contraditoriamente, é a reperfusão a grande responsável pelas principais lesões nas células do órgão isquemiado, justamente porque a isquemia cria condições para que, no momento da reperfusão, enzimas ativadas participem da redução do oxigênio molecular gerando espécies reativas ao oxigênio (EROs) (YAMAKI et al, 2012; ROCHA et al, 2012).

No modelo de isquemia-reperfusão de indução da SDRC, a reperfusão é responsável pelas lesões nervosas do órgão isquemiado, posto que cria condições para que, no momento da reperfusão, enzimas que participam da redução do oxigênio molecular gerem espécies reativas de oxigênio (EROs) (ROCHA *et al.*, 2012), implicando em dano tecidual que origina várias respostas celulares deletérias que culminam em inflamação, morte celular, necrose tecidual e falência do órgão (FONDEVILA et al., 2003; MIGUEL, 2012; YAMAKI *et al.*, 2012).

Coderre e colaboradores (2004) padronizaram o processo de SDCR-I, através de DPIC em ratos com o objetivo de simular suas manifestações clínicas da doença. Nesse modelo, a aplicação de um torniquete no membro de interesse promove privação circulatória seguida de um período de reperfusão. Por isso, ocorrem aumento de estresse oxidativo, ativação da resposta inflamatória (edema e

hiperemia), instalação de hiperalgesia mecânica e térmica ao frio e de sintomas de neuropatia (inclusive no membro contralateral em longo prazo).

O modelo foi adaptado para camundongos por Millecamps e colaboradores (2010), onde ocorre a anestesia do animal e posteriormente coloca-se o torniquete elástico no tornozelo por um período de três horas, sendo cortado após o decorrer do procedimento, ocasionando intensa reperfusão da pata (TANG et al., 2017). O procedimento foi padronizado em camundongos C57BL/6 pelo tempo de duas horas (DE PRÁ, 2017).

A indução de isquemia-reperfusão promove estresse oxidativo, acompanhado de resposta inflamatória, contribuindo para morbidade e mortalidade em numerosas doenças, como: síndrome coronariana aguda, AVC, lesão de membros. A isquemia resulta em hipóxia profunda e disfunção tecidual, enquanto a reperfusão subsequente agrava a lesão tecidual isquêmica por induzir morte celular e ativar resposta inflamatória (Zang et al, 2020).

Durante o período isquêmico, a hipóxia resulta em redução dos fosfatos de alta energia, como ATP e fosfocreatina, e em intracelular acidose devido a formação de lactato, que altera a permeabilidade da membrana lisossomal e inibe a bomba de sódio e potássio, o que causa retenção de sódio e água dentro das células e acúmulo de cálcio intracelular que motiva a produção de espécies reativas de oxigênio pelas mitocôndrias. Isso ativa as proteínas calpaínas, que são proteases de cisteína dependentes de cálcio. Restabelecer o fluxo sanguíneo é primordial para aliviar o dano aos tecidos que sofreram isquemia, porém a reperfusão exacerba o dano em comparação à isquemia sozinha: oxigênio torna a elevar o cálcio intracelular, resultando em dano celular dependente das calpaínas. O catabolismo do ATP durante a isquemia induz acúmulo de hipoxantina intracelular que favorece a formação de espécies reativas de oxigênio quando da reoxigenação (Zang et al, 2020).

3.9 Espécies reativas de oxigênio (EROs)

As espécies reativas de oxigênio são produzidas por organismos vivos como resultado do metabolismo celular normal e de fatores ambientais, como poluentes atmosféricos, radiação gama e ultravioleta, medicamentos, dieta, fumaça de cigarro, do ozônio e dióxido de nitrogênio e estresse (BIRBEN, et al, 2012; JACOB, 2013).

Em concentrações adequadas, participam de inúmeros processos fisiológicos, como processo de geração aeróbica de energia na cadeia respiratória, são importantes mediadores das vias de sinalização intracelular, bem como necessárias para a fagocitose de microrganismos pelos neutrófilos (CHIES et al, 2019). Entretanto, quando presentes em excesso, as EROs podem reagir com diferentes estruturas do organismo, como carboidratos, material genético, proteínas, lipídios, causando danos celulares (CHIES et al, 2019).

Para manter o equilíbrio e prevenir tais danos, os organismos possuem sistemas denominados antioxidantes, responsáveis pela remoção de tais espécies reativas, controlando e reestabelecendo o chamado equilíbrio redox (CHIES et al, 2019).

Todavia, quando a produção de espécies reativas excede a capacidade das defesas antioxidantes em removê-las, tem-se uma condição fisiopatológica denominada estresse oxidativo que pode levar a danos celulares e outros efeitos deletérios na função e integridade estrutural de tecidos biológicos (SILVA Jr. et al., 2002; BARBOSA et al, 2010; ENGERS et al, 2011; MIGUEL, 2012).

Os efeitos nocivos das EROs podem ser prevenidos por enzimas antioxidantes como superóxido dismutase (SOD), glutationa peroxidase (GSH-Px) e catalase e por substâncias antioxidantes como glutationa, ácido lipoico, melatonina, ácido úrico, vitaminas C e E, entre outros (SILVA Jr. et al., 2002; MIGUEL, 2012).

A produção contínua de espécies reativas de oxigênio contribui para oxidação de fosfolipídios e de proteínas, resultando em dano ao DNA e à membrana mitocondrial. Ainda por causa do excesso de radicais livres e de cálcio intracelular, ocorre abertura dos poros de permeabilidade transitória mitocondriais, liberando citocromo C e DNA mitocondrial, que são capazes de promover apoptose celular, autofagia, necrose e ativar a resposta imune inata. A lesão por isquemia-reperfusão também resulta em edema endotelial e degradação do glicocálice. Como consequência, o contato intercelular entre células endoteliais é perdido e aumenta a permeabilidade vascular. As células endoteliais superexpressam moléculas de adesão, levando ao recrutamento de neutrófilos para o compartimento intersticial e possuem função pró-inflamatória. A degranulação deles conduz a infiltração monocitária nos tecidos lesionados e eles diferenciam em macrófagos pró-inflamatórios que liberam citocinas inflamatórias, como TNF-α e IL-1β (Zang et al, 2020).

Ao mesmo tempo, não ocorre lesão neural, perda ou anormalidade de função motora ou anestesia sensorial, aproximando-se dos cenários observados em pacientes humanos, nos quais a SDCR comumente surge após fraturas, contusões, entorses, lesão por esmagamento, cirurgias artroscópicas, lesões edematosas de tecidos moles (Coderre et al, 2004).

3.10 Radicais livres

O termo radical livre refere-se a um átomo, grupos de átomos ou moléculas que são altamente reativas, que contêm um número ímpar de elétrons em sua camada de valência. É este não emparelhamento de elétrons da última camada que confere alta instabilidade e alta reatividade a esses átomos ou moléculas (COTINGUIBA, et al 2013; KIRKHAM et al., 2006; VASCONCELOS, et al., 2014).

A principal fonte de radicais livres produzidos no organismo vem do metabolismo normal do oxigênio, ocorrendo, sobretudo, nas mitocôndrias, membranas celulares e no citoplasma (BARBOSA, 2010).

Os radicais livres são moléculas reativas produzidas naturalmente durante o metabolismo, metabólicos e atuam como mediadores para a transferência de elétrons em várias reações bioquímicas, desempenhando funções relevantes no metabolismo, que fisiologicamente são neutralizadas pelo sistema antioxidante (BARBOSA, 2010; SHAMI & MOREIRA, 2004).

A produção de radicais livres é regulada por variados processos e vias metabólicas, atuando como sinalizadores intra e extracelular. Sua produção excessiva pode conduzir a danos oxidativos (SOARES, 2015).

A presença dos radicais livres é crítica para a manutenção de muitas funções fisiológicas normais, porém fora do normal pode causar danos celulares graves como: quebra da dupla hélice do DNA, alterando sua estrutura, acúmulo de bases nitrogenadas danificadas, desencadeando mutação e oncogênese, peroxidação lipídica, que modifica a estrutura celular e altera o transporte transmembrana, além de também levar à mutagênese e, portanto, à transformação celular e à proliferação descontrolada (BARBOSA *et al.*, 2010; JACOB, 2013; COTINGUIBA, et al 2013).

Quando a formação de radicais livres e/ou EROs supera a capacidade de ação dos antioxidantes, aumenta a oxidação de biomoléculas, gerando metabólitos

que podem ser marcadores específicos do estresse oxidativo: TBARS mensura substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico, dosando aldeídos que são metabólitos secundários da oxidação de lipídios, sendo o malondealdeído (MDA) um dos mais abundantes (BARBOSA *et al.*, 2010). Proteínas carboniladas são formadas por clivagem oxidativa do suporte estrutural das proteínas, causando desaminação de aminoácidos, como lisina e ácido glutâmico e a elevação destas está presente em várias condições, como: envelhecimento, doenças neurodegenerativas, obesidade, diabetes, degeneração macular ligada à idade, anemia, carcinoma hepatocelular, síndrome da imunodeficiência adquirida (FRIJHOFF *et al.*, 2015). Os grupos sulfidrilas (SH) são considerados os maiores e mais frequentes antioxidantes no plasma e na membrana das hemácias, podem ser convertidos por agentes oxidantes em agentes dissulfeto e causar desnaturação de proteínas de membrana, podendo também ocorrer dano intracelular com oxidação da hemoglobina em meta-hemoglobina (VAN DIJK *et al.*, 2020).

3.11 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é uma condição fisiopatológica em que a produção de espécies reativas excede a capacidade das defesas antioxidantes do organismo em removê-las (CHIES et al, 2019).

O estresse oxidativo é um distúrbio que ocorre quando existe um desequilíbrio entre os sistemas oxidativo (radicais livres) e o antioxidante, em favor do primeiro. Neste processo, há a geração excessiva de radicais livres ou em detrimento da velocidade de remoção desses no organismo (BARBOSA et al., 2010; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; ENGERS; BEHLING; FRIZZO, 2011).

Esse desequilíbrio pode levar a determinados danos, como a lesão por isquemia e reperfusão, ocorrência de doenças crônicas não transmissíveis cardiovasculares, diabetes, câncer, hipertensão e processos neurodegenerativos, transformação e morte celular, doenças de Alzheimer e de Parkinson, além do envelhecimento precoce (CARACENI, 2005; BARBOSA et al 2010; LEITE et al, 2012; CERCHIARO & HONÓRIO, 2011; JACOB, 2013).

3.12 Mecanismo de danos às moléculas

As EROs podem danificar diferentes biomoléculas, como lipídios, por meio de peroxidação lipídica, proteínas (grupos carbonilas e sulfidrilas) e gerar danos oxidativos ao DNA, bem como alterações na expressão gênica (BARBOSA et al 2010; SILVA e FERRARI, 2011; STEFANI et al, 2020).

3.12.1 Peroxidação lipídica ou lipoperoxidação

A membrana plasmática é uma barreira flexível, porém resistente, constituída principalmente por lipídeos e proteínas, tendo como estrutura básica uma bicamada lipídica (duas camadas em contraposição), composta por três tipos de moléculas: fosfolipídeos, colesterol e glicolipídeos. Uma das características principais da membrana plasmática é permitir a movimentação de substâncias do meio intracelular e extracelular, sendo denominada essa característica de permeabilidade seletiva (TORTORA et al, 2016).

Quando a estrutura da membrana plasmática sofre algum tipo de ataque dos radicais livres, um processo chamado de peroxidação lipídica ou lipoperoxidação é desencadeado (ENGERS et al, 2011).

A peroxidação lipídica altera a fluidez das membranas, provocando menor seletividade no transporte iônico e na sinalização transmembrana, o que prejudica o transporte celular (SILVA e FERRARI, 2011).

Há indícios de que a peroxidação lipídica está associada ao envelhecimento, câncer e ao aumento da toxidade de xenobióticos, sendo o radical hidroxila (OH•) apontado como a principal espécie iniciadora deste processo (SAMPAIO & MORAES, 2010).

Uma maneira de avaliar o dano lipídico em ambiente laboratorial é através da análise da técnica de TBARS, sendo uma técnica de fácil execução, barata e bastante aceita na literatura (CHIES et al, 2019).

3.12.2 Danos às proteínas

As proteínas são polímeros de aminoácidos unidos por ligações covalentes, formando as macromoléculas biológicas mais abundantes, e estão presentes em todas as partes das células. Há uma enorme diversidade de proteínas que são os instrumentos moleculares pelos quais a informação genética é expressa. Além disso,

a variedade com que os aminoácidos podem ser ligados em diferentes sequências pode gerar produtos tão diversos como enzimas, hormônios, anticorpos, transportadores, fibras musculares, proteínas do cristalino dos olhos, penas, teias de aranha, chifres de rinocerontes, proteínas do leite, antibióticos, venenos de cogumelos e uma ampla variedade de outras substâncias com atividades biológicas as mais diversas (NELSON; COX, 2019).

As proteínas podem sofrer rompimentos de ligações peptídicas bem como danificações em suas cadeias laterais, ocasionando mudanças em propriedades químicas e físicas, tais como fluidez e permeabilidade da membrana celular. Essas mudanças causam ampliação do líquido intracelular aumentando o risco de ruptura de membrana e organelas, podendo levar a apoptose (LEVINE, 2002; VASCONCELOS et al, 2007).

Ainda, pode ocorrer inativação de várias proteínas (enzimas e proteção celular), quando ocorre oxidação dos grupos sulfidrila (-SH) e formação de ponte dissulfeto (-SS) (SAMPAIO & MORAES, 2010).

Além disso, o conteúdo carbonílico de proteínas é amplamente utilizado como marcador de dano oxidativo em proteínas, sob condições de estresse oxidativo (VASCONCELOS et al, 2007). A formação da proteína carbonila é um fenômeno comum durante o estresse oxidativo e quantifica-la é importante para a mensuração do dano oxidativo. Os grupamentos carbonílicos são produzidos pela oxidação da cadeia lateral de aminoácidos suscetíveis como arginina, lisina, prolina e treonina, ou pela clivagem oxidativa das proteínas (BEAL, 2003; DALLE-DONNEet al., 2003; VASCONCELOS et al, 2007).

3.12.3 Danos ao DNA

O DNA, de estrutura tridimensional e formado por nucleotídeos, está entre as descobertas mais notáveis na área da biologia no século XX. É este polímero que codifica as instruções para formar todos os outros componentes celulares e fornecer o molde para a produção de moléculas idênticas de DNA para serem distribuídas aos descendentes no processo de divisão celular. A perpetuação de uma espécie biológica requer que sua informação genética seja mantida de forma estável, com o mínimo de erros para definir espécies, distingui-las umas das outras e assegurar sucessivas gerações (NELSON; COX, 2014).

As quatro bases do DNA, assim como a própria molécula de desoxirribose podem ser lesadas. Deste dano, podem resultar quebras das cadeias (com consequentes modificações cromossômicas), locais apurínicos ou apirimidínicos e alterações oxidativas nas bases, bem como instabilidade genômica, progressão neoplásica, mutagênese, entre outros. São também capazes de condicionar dano no DNA através da peroxidação lipídica, da oxidação de proteínas e de alterações na expressão gênica (ROESSNER et al, 2008; TEIXEIRA, 2013; SILVA & JASIULIONIS, 2014)

3.13 Sistema antioxidante

Os antioxidantes são substâncias que, mesmo presentes em baixas concentrações, são capazes de atrasar ou inibir as taxas de oxidação, mantendo-os dentro dos limites fisiológicos e passíveis de regulação, impedindo que os danos oxidativos sejam amplificados e resultem em danos sistêmicos irreparáveis (BARBOSA et al, 2010; VASCONCELOS et al, 2014).

Os elementos protetores do sistema antioxidante endógeno podem ser enzimáticos ou não enzimáticos. O primeiro inclui as enzimas: SOD, que remove íons superóxido por acelerar sua conversão em peróxido de hidrogênio nas mitocôndrias e no citosol; CAT, que converte peróxido de hidrogênio em água e oxigênio; e a GSH-Px, que é a mais importante enzima removedora de peróxido de hidrogênio, utilizando-o para oxidar a glutationa, conforme a tabela 3 (BARBOSA et al, 2010; JACOB, 2013;KESHARI *et al.*, 2015). Sistemas não enzimáticos incluem compostos que agem como varredores de EROs como as vitaminas A, C e E, glutationa, ácido úrico e melatonina (KESHARI *et al.*, 2015).

Tabela 3 - Sistemas enzimáticos antioxidantes conforme sua ação biológica e seus sítios de ação

Enzima	Ação biológica	Locais
Superóxido dismutase (SOD)	Catalisa a dismutação do O_2^-, convertendo-o em H_2O_2, que é menos reativo e pode ser degradado por outras enzimas, como a CAT e GSH-Px	Abundante nas células aeróbicas
Catalase (CAT)	Catalisa a redução do H_2O_2 em água e oxigênio	Eritrócitos e baço, rins dos mamíferos e fígado
Glutationa peroxidase (GSH-Px)	Catalisa a redução do H_2O_2 e peróxidos orgânicos para o seu álcool correspondente, utilizando glutationa como co-fator, a qual oscila entre a sua forma oxidada e reduzida	Fígado e linfonodos

Fonte: Adaptado de OLIVEIRA & SCHOFFEN (2010).

Essas enzimas agem por meio de mecanismos de prevenção, impedindo e/ou controlando a formação de radicais livres e espécies não-radicais, envolvidos com a iniciação das reações em cadeia que culminam com propagação e amplificação do processo e, consequentemente, com a ocorrência de danos oxidativos (BARBOSA et al, 2010).

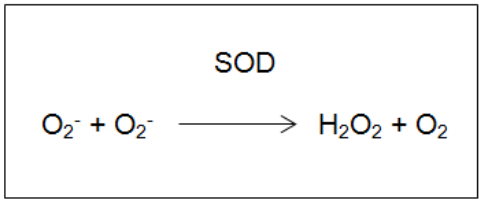
3.13.1 Superóxido Dismutase (SOD)

A enzima SOD é um antioxidante extremamente poderoso na célula. É uma enzima endógena que atua como um componente do sistema de defesa de primeira linha contra EROs porque esta enzima atua diretamente na prevenção do acúmulo do radical superóxido. É responsável por catalisar a reação de óxido-redução (dismutação) de duas moléculas de ânion superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio molecular (O_2), consequentemente tornando o O_2^- potencialmente prejudicial em menos perigoso (ANDRADE JÚNIOR et al., 2005; IGHODARO & AKINLOYE, 2018).

A SOD é uma metaloenzima, necessitando de um íon metálico em seu sítio ativo para sua atividade. Dependendo do tipo de íon metálico necessário, existem variadas formas da enzima, ligando-se a ela o ferro (Fe), Zinco (Zn), cobre (Cu) e manganês (Mn). A enzima encontra-se comumente em sistemas eucariontes

(cloroplastos, mitocôndrias, citosol e peroxissomos) e procariontes. A SOD tem importante papel antioxidante, visto que, catalisa a dismutação do radical superóxido O_2^- conforme figura 02 e possui ação protetora contra lesões do DNA (ANDRADE JÚNIOR et al., 2005; ENGERS; BEHLING; FRIZZO, 2011)

Figura 02 – Reação de Dismutação do radical O_2^- em H_2O_2 e O_2.



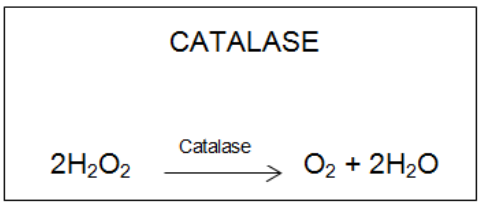
Fonte: Adaptado de ANDRADE JÚNIOR et al. (2005).

3.13.2 Catalase (CAT)

A enzima CAT é considerada o maior componente da defesa antioxidante primária na decomposição do H_2O_2 em altas concentrações, contando com a participação da GSH-Px (ANDRADE JÚNIOR et al., 2005).

A CAT é uma enzima antioxidante comum presente em quase todos os tecidos vivos que utilizam O_2. Utiliza como co-fator o ferro (Fe) ou o manganês (Mn) e possui a capacidade de catalisar a degradação do H_2O_2 em água (H_2O) e O_2, (conforme figura 03), diminuindo a atividade reativa do peróxido contra as células, completando o processo de desintoxicação iniciado pela SOD (ANDRADE JÚNIOR et al., 2005; BARREIRO et al, 2006; FUJII et al., 2011).

Figura 03 – Reação de dismutação do H_2O_2 em O_2 e H_2O, através da enzima catalase.



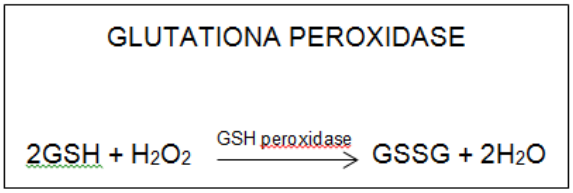
Fonte: Adaptado de BARREIROS et al. (2006)

3.13.3 Glutationa Peroxidase (GSH-Px)

A glutationa (GSH), possui papel central na biotransformação e eliminação de xenobióticos e na defesa das células contra o estresse oxidativo (HUBER et al, 2008).

A glutationa peroxidase (GSH-Px ou GPx) é uma importante enzima intracelular que decompõe os H_2O_2 em água; e os peróxidos lipídicos aos seus álcoois correspondentes, principalmente na mitocôndria e em minoria, no citosol (figura 04). Na maioria das vezes, sua atividade depende de um co-fator micronutriente denominado selênio, por esse motivo, a GSH-Px é frequentemente chamada de selenocisteína peroxidase. A enzima desempenha um papel crucial na inibição do processo de peroxidação lipídica e, portanto, protege as células do estresse oxidativo (IGHODARO & AKINLOYE, 2018).

Figura 04 – Catálise da dismutação do H_2O_2 em H_2O e O_2 por meio da GSH-Px



Fonte: Adaptado de BARREIROS et al. (2006)

Na presença de baixos níveis de H_2O_2, os peróxidos orgânicos são eliminados preferencialmente pela glutationa peroxidase, dividindo a função de dismutação com a CAT (JUNIOR et al, 2005).

3.14 Toxicidade Hepática e Renal

Considerando o potencial das nanopartículas de se distribuírem pelos vários tecidos do organismo, é possível que ocorra acúmulo significativo nos principais órgãos detoxificadores do organismo, o fígado e os rins, com potencial para toxicidade limitante do uso terapêutico das AuNPs conforme a intensidade desse risco.

Transaminases hepáticas elevam na corrente sanguínea de modo significativo quando há lesão importante de hepatócitos (SUCIU *et al*., 2020) e o mesmo aplica-

se à ureia e creatinina em situação de dano renal (BAZZANO *et al*., 2015) tornando-as indicadores de hepato e nefrotoxicidade, respectivamente.

3.14.1 Dano Hepático

De acordo com Suciu *et al.* (2020), o teste mais comum para avaliação da função hepática é a dosagem sérica das enzimas TGO e TGP. Essa mensuração fornece indicadores de dano hepatocelular e seu aumento significativo motiva investigação mais aprofundada. A TGO encontra-se principalmente nas mitocôndrias dos hepatócitos, enquanto a TGP está mais localizada no citoplasma e essa diferença auxilia o diagnóstico e o prognóstico de doenças hepáticas, de modo que, havendo dano hepatocelular leve, predomina no soro a enzima citoplasmática, ao passo que em lesões graves, há liberação da enzima mitocondrial também (TELLI, FRIGERI, MELLO, 2016).

Yao *et al.* (2019) revisaram os vários mecanismos passíveis de desencadear toxicidade hepática por meio de nanopartículas e indicaram que elas podem ativar a inflamação, aumentar o estresse oxidativo e possivelmente levar à morte celular. Atribuído às nanopartículas metálicas, tem-se informação de redução do tempo de sobrevida de hepatócitos (que guarda relação com tempo e dose), de maior nível de peroxidação lipídica e na atividade da SOD e da CAT, bloqueio da função mitocondrial e da respiração celular, resultando em queda dos níveis de ATP e ativação de vias sinalizadoras de inflamação, apoptose e autofagia celular, além de dano do DNA (YAO *et al.*, 2019).

3.14.2 Dano Renal

Para a função renal, o diagnóstico de patologias pode ser realizado por meio de exames laboratoriais como a dosagem de creatinina sanguínea. Creatinina é um produto de metabolismo da creatina e da fosfocreatina presentes na musculatura esquelética, que é excretado sobretudo por via renal em taxa relativamente constante ao longo do dia (MALTA *et al.*, 2019). Em função da disponibilidade e do custo, a creatinina é o teste de triagem mais difundido na prática clínica para avaliação da função renal (MALTA *et al.*, 2019).

A ureia é o principal metabólito nitrogenado da degradação de proteínas, sendo excretada 90% pelos rins e correspondendo a 75% do nitrogênio não proteico excretado, porém é um fraco preditor da taxa de filtração renal porque cerca de 40-70% retornam para o sangue por difusão passiva, além da taxa de produção hepática poder influenciar sua concentração sem ter relação com a função renal (SODRÉ, COSTA, LIMA, 2007). Por isso, a principal utilidade clínica da ureia é estar na determinação da função renal em conjunto com a creatinina.

3.15 Nanotecnologia, nanociência e nanopartículas

Desde a década passada, é notável o crescente interesse da comunidade científica a respeito do ramo da nanociência no que se refere às intrigantes mudanças nas propriedades físicas de determinados sólidos, quando suas dimensões são reduzidas à escala nanométrica e, também, à possibilidade de controle sobre os componentes estruturais de materiais e dispositivos em escalas de tamanho bem inferiores àquelas convencionais (MELO et al., 2012).

A nanotecnologia compreende a ciência que trabalha com materiais a níveis moleculares, seja para manipulação e/ou criação de novos materiais e produtos (CRUZ et al, 2020), cuja dimensão está entre o intervalo de 1 a 100 nanômetros, sendo 1 nanômetro igual a 1 bilionésimo de metro ou então, 10^{-9}.

A nanotecnologia abrange a produção e a aplicação de sistemas físicos, químicos e biológicos em escalas submicrônicas, de átomos ou moléculas individuais. Essa tecnologia em desenvolvimento terá grande impacto nas sociedades no decorrer do século XXI, podendo ser comparada aos conhecimentos de biologia molecular, prometendo avanços nas áreas de ciência dos materiais e manufaturas, nanoeletrônica, tecnologia da informação, biotecnologia, segurança nacional, bem como, medicina e saúde (BHUSHAN, 2017; DAS et al, 2011).

As propriedades dos materiais em nanoescala podem ser muito diferentes daqueles em uma escala maior. Os nanomateriais são interfaces com dimensões extremamente pequenas, que apresentam grande área superficial e consequentemente, apresentam propriedades mecânicas, ópticas, magnéticas ou químicas distintas de partículas e superfícies macroscópicas (QUINA, 2004; LOURAL, 2014; BHUSHAN, 2017).

A nanotecnologia aplicada aos materiais, principalmente os metais, atrai considerável atenção pela expectativa do impacto que pode causar na rotina de processos, preservação do meio ambiente, aplicação em catálise e aperfeiçoamento de materiais já existentes. Espera-se que o avanço da nanociência estimule a exploração de novos conceitos e de novas teorias, influenciando uma nova aplicação industrial que possa se tornar uma possível fonte de crescimento econômico (VIEIRA, 2012).

Uma das maiores dificuldades em trabalhar com nanopartículas é a obtenção de suspensões coloidais estáveis, já que as nanopartículas possuem uma alta energia superficial, e têm a tendência natural de se agregarem e crescerem, fazendo-se necessária a adição de agentes denominados estabilizadores, que se adsorvem na superfície das nanopartículas, formando uma camada que impede a coalescência (MELO JUNIOR et al, 2012; ZARBIN, A. J. G, 2007).

3.15.1 Uso de nanopartículas em pesquisas médicas

Atualmente a nanotecnologia vem mostrando uma grande gama de aplicações na área de pesquisa médica. É um campo em desenvolvimento e possui um enorme potencial para impactar positivamente no sistema de saúde. Importantes aplicações da nanotecnologia estão sendo empregadas na área da saúde e o conhecimento básico da interação dos nanomateriais com as células e suas consequências biológicas está começando a evoluir (BHATTACHARYA & MUKHERJEE, 2008).

A utilização das nanopartículas no campo biomédico tem demonstrado interesse devido à sua: (1) estabilidade química; (2) facilidade de síntese e processo de fabricação; (3) biocompatibilidade genuína e não interferência com outros biomateriais; (4) bioconjugação de superfície com sondas moleculares; (5) propriedades ópticas marcantes e (6) baixa citotoxidade (KATZ et al., 2004).

Para uma aplicação com alta sensibilidade e seletividade em sistemas diagnósticos e terapêuticos, os nanomateriais devem estar combinados com biomoléculas ainda mais específicas, por exemplo, sistemas antígeno/anticorpo, enzima/substrato, receptores ou proteínas de membrana, sequências de DNA ou RNA (CANCINO; MARANGONI e ZUCOLOTTO, 2014).

Devido às suas dimensões reduzidas, as nanopartículas podem penetrar em diversas regiões do organismo de um indivíduo. Porém, essa entrada no sistema

biológico depende de diversos fatores como composição química da superfície, propriedades físico-químicas, tamanho e forma, capacidade de agregação ou aglomeração, ou mesmo a funcionalização com biomoléculas específicas (CANCINO; MARANGONI e ZUCOLOTTO, 2014).

Entretanto, considerando o avanço do interesse no campo das nanopartículas, tem-se poucos estudos toxicológicos que subsidiem a elaboração de estratégias de regulação eficazes para assegurar a saúde da população e do meio ambiente. Dada a grande capacidade de alcance das nanopartículas, os esforços voltados para a elaboração de medidas regulatórias de segurança biológica em aplicações de produtos diversos, principalmente no âmbito da nanofarmacologia, são fundamentais (SANTOS, 2015).

3.15.2 Nanopartículas de ouro

Dentro do universo das partículas nanometálicas, as AuNPs foram as primeiras a serem descobertas, provavelmente pelo fato de poderem ser preparadas com muita facilidade. O ouro é um metal de grande importância histórica devido ao seu alto valor agregado e sua beleza associada, além de suas propriedades químicas de metal nobre, sendo utilizado em eletrônica e na área médica (COURA *et al.,* 2018).

Como resultado do desenvolvimento das engenharias, há notáveis avanços na nanotecnologia, com estratégias inovadoras de tratamento sendo exploradas por pesquisadores sobre a utilização das nanopartículas de metais nobres na área da saúde. As nanopartículas metálicas têm sido amplamente exploradas para fins biomédicos, destacando-se então, as nanopartículas de ouro (GNPs, AuNPs ou NPOs) (DAS et al, 2011), que recebem atenção especial devido às propriedades ópticas, eletrônicas, redox e catalíticas (DANIEL, ASTRUC, 2004). As AuNPs são ótimas para pesquisa, por serem biocompatíveis, de simples preparação e tendência à forte ligação por grupamentos tióis e aminas (MUKHERJEE et al., 2005; HAINFELD et al., 2006).

A aplicação biomédica das AuNPs tem aumentado consideravelmente devido a sua baixa citotoxidade, com isto, são utilizadas clinicamente para melhorar o potencial dos fármacos, alterando a farmacocinética, biodistribuição e absorção

celular. A utilização das AuNPs s no tratamento de diversas doenças surgiu devido a várias evidências como um promissor agente anti-inflamatório (CHEN, 2013).

Inúmeros estudos demonstram a versatilidade das nanopartículas de ouro como um agente precursor vital de agentes terapêuticos, devido a sua eficiência, segurança e eficácia na transferência de medicamentos, levando em consideração suas características físico-químicas, biocompatibilidade, flexibilidade funcional, alta área de superfície, fazendo com que a nanopartícula seja revestida com centenas de moléculas (BROWN et al, 2010; DAS et al, 2011; ELAHI et al, 2018). Além disso, tem sido utilizadas com absorção de infravermelho que produzem calor quando excitadas pela luz em comprimentos de onda de 700 a 800 nm. Quando a luz é aplicada a um tumor contendo nanopartículas de ouro, as partículas aquecem rapidamente, causando apoptose nas células tumorais (STUCHINSKAYA, et al 2011). AuNPs também são usadas para detectar biomarcadores no diagnóstico de doenças cardíacas, cânceres e agentes infecciosos (PENG et al, 2009).

As aplicações das nanopartículas se estendem a variadas áreas que vão além da aplicação biomédica. As AuNPs tem sido utilizadas como condutores de tintas para impressão de chips eletrônicos, além de conectar resistores, condutores e outros elementos a chips eletrônicos (HUANG et al, 2003). São aplicadas também a sensores colorimétricos, podendo identificar se os alimentos são adequados para consumo, ou aliadas a espectroscopia de Raman como substratos para permitir a medição de energias vibracionais de ligações químicas. Essa estratégia também pode ser usada para a detecção de proteínas, poluentes e outras moléculas (UMA LIMA, et al, 2012).

3.15.3 Nanopartículas e legislação

Em âmbito nacional em 2012, através da Portaria Interministerial Nº 510/2012, foi instituído o CIN - Comitê Interministerial de Nanotecnologia, de responsabilidade atualmente do Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações (MCTIC), com a finalidade de integração e na coordenação, bem como no aprimoramento das políticas, diretrizes e ações voltadas para o desenvolvimento das nanotecnologias no país (BRASIL, 2012).

No ano de 2013 e atualizada em 2019, o Brasil instituiu a Iniciativa Brasileira de Nanotecnologia – IBN - como um conjunto de ações para integrar e fortalecer ações governamentais na área, com foco na promoção da inovação na indústria brasileira e no desenvolvimento econômico e social, para entre outros objetivos, promover o avanço e o fortalecimento científico, tecnológico e a inovação nacional relacionados às propriedades da matéria em escala nanométrica (BRASIL, 2019). Na época, contou com o investimento de R$ 440 milhões para fortalecer as ações na área de nanotecnologia e hoje, conta com apoio das agências de fomento (CNPq, FINEP, EMBRAPII e SisNANO). A IBN prioriza entre seus objetos de pesquisa, temas como nanofármacos e nanomedicina, nanossegurança e saúde (BRASIL, 2019)

Na estruturação da IBN, criou-se como um dos eixos estratégicos o Sistema Nacional de Laboratórios em Nanotecnologias – SisNANO, constituído por um conjunto de laboratórios de acesso aberto a usuários públicos e privados e direcionados à pesquisa, ao desenvolvimento e à inovação em nanociências e nanotecnologias (BRASIL, 2019).

Em 2014, o país passou a fazer parte do Projeto Europeu denominado NanoReg, com objetivo de coletar e promover estudos sobre nanomateriais a fim de subsidiar com dados para regulação da produção e manuseio destes produtos. O projeto contou com o apoio de 85 parceiros institucionais de todo o mundo para o desenvolvimento de métodos confiáveis, reproduzíveis e relevantes para testar e avaliar os efeitos dos nanomateriais sobre saúde humana e meio ambiente em um contexto regulatório. Infelizmente, o projeto encerrou-se em fevereiro de 2017, ao investimento de 50 milhões de euros (BRASIL, 2018).

3.15.4 Caracterização das nanopartículas de ouro

A caracterização adequada das nanopartículas é fundamental, uma vez que a sua atividade biológica pode ser alterada radicalmente com a variação de algumas propriedades físico-químicas. Nesta caracterização, alguns parâmetros como o tamanho médio das partículas, a área e a composição química superficial, são fundamentais.

Algumas das principais metodologias para caracterização de nanopartículas que podem auxiliar na interpretação dos resultados toxicológicos são descritas a seguir.

A Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) permite caracterizar de forma local e de forma simultânea, a morfologia, cristalografia e composição química dos materiais em geral e é uma das principais ferramentas para realizar a caracterização de nanomateriais (WILLIAMS & CARTER, 2009). As imagens geradas permitem a visualização de como as AuNPs estão dispersas na matriz utilizada.

O Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV), por sua vez, se tornou um instrumento imprescindível nas mais diversas áreas devido ao desenvolvimento de novos materiais, por exemplo, nanomateriais, que têm exigido informações muito detalhadas das características microestruturais (MALISKA, 2011). Por meio do microscópio eletrônico de varredura é possível visualizar a superfície de amostras volumosas e obter imagens de superfícies polidas ou rugosas, com grande profundidade de campo e alta resolução, fácil interpretação das imagens com aparência tridimensional, possuí grande aceitação devido a sua ampla gama de utilização e um mínimo de preparação das amostras (MANNHEIMER, 2002).

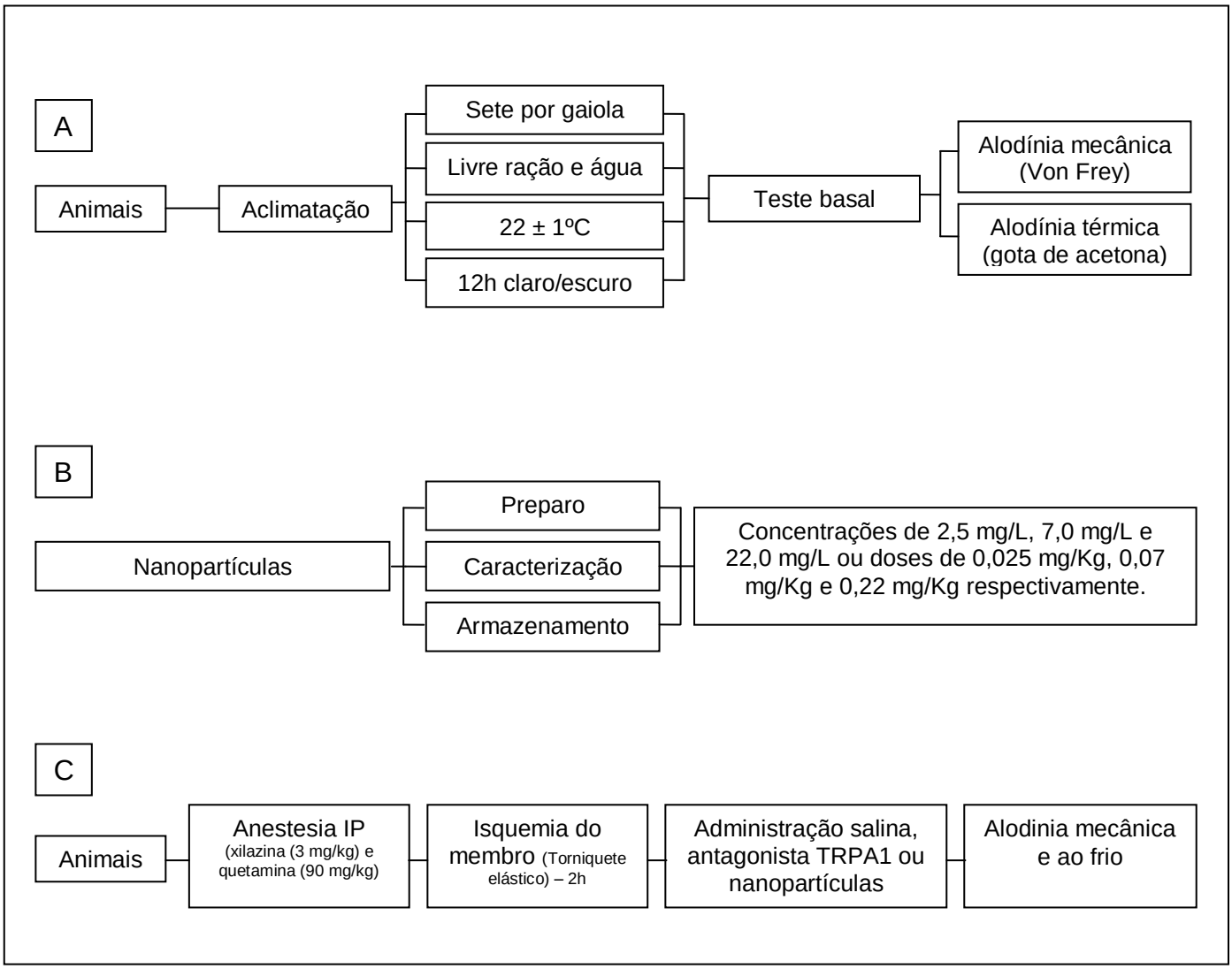
O Potencial Eletrocinético em Sistemas Coloidais, mais conhecido como Potencial Zeta (Pz), é o potencial existente entre a superfície das partículas e do líquido de dispersão que varia de acordo com a distância a partir da superfície de cada partícula (MALVERN, 2004; BEDÊ, 2010). Os valores encontrados de Pz indicam se as partículas em um líquido tendem a permanecer aglomeradas ou não e consequentemente nos fornecem informações sobre a estabilidade das partículas no meio onde estão, podendo variar bastante dependendo das características da matriz de dispersão (MALVERN, 2004). É um importante método de análise para nanopartículas devido a grande tendência de aglomeração e de mudanças no seu comportamento.

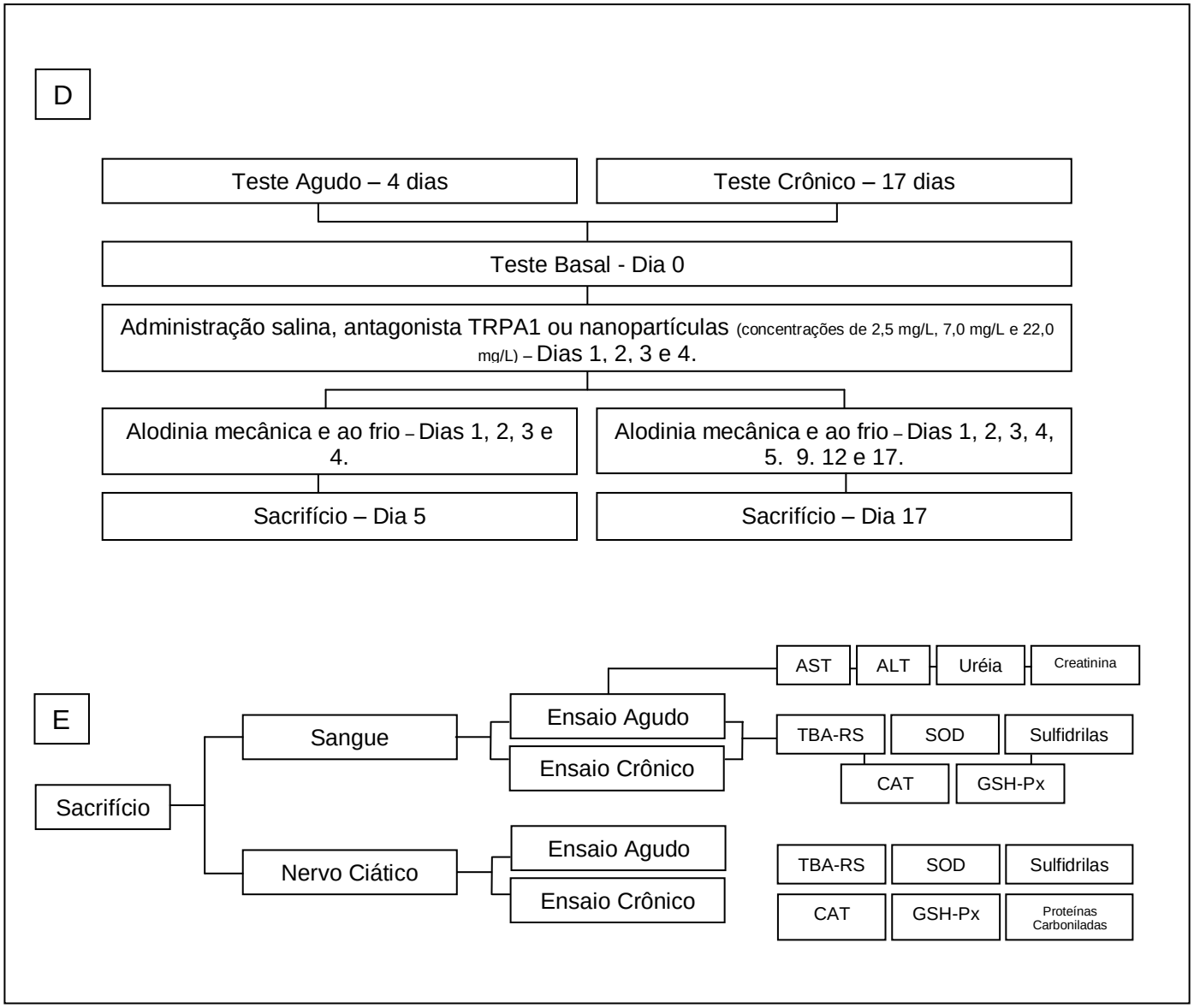
4 METODOLOGIA

O presente estudo é pré-clínico, quantitativo experimental, e foi submetido a avaliação pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE e aprovado pelo mesmo através do parecer CEUA número 004/1118 (anexo 1). Os autores do presente estudo declaram não haver conflitos de interesses.

A figura 05 apresenta uma breve descrição dos procedimentos realizados neste estudo na sequência A, B, C, D e E.

Figura 05: Planejamento experimental realizado, necessário para a concretização do estudo.





(A) Procedimentos animais. (B) Procedimentos com as nanopartículas de ouro nas concentrações de 2,5mg/L, 7,0mg/L e 22,0mg/L. (C) Sequência dos procedimentos realizados com os animais. (D) Protocolo de duração e testes realizados no ensaio agudo e no ensaio crônico. (E) Análises bioquímicas realizadas no ensaio agudo e crônica a partir dos materiais de coleta: sangue e nervo ciático.
Fonte: o autor.

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos *Mus musculus*, da linhagem Swiss adultos (20 – 30 g, 60 dias) machos, provenientes do biotério da Universidade da Região de Blumenau – FURB.

Antes do processo de experimentação, todos os animais foram acomodados (sete por gaiola) contendo maravalha e aclimatados por sete dias para adaptação

em um novo meio. Os animais foram mantidos em ciclo claro/escuro de 12h, à temperatura controlada de 22 ± 1ºC, com livre acesso a comida (ração) e água. A frequência de troca de caixas foi realizada a cada dois dias.

Os experimentos e o sacrifício dos animais para análise bioquímica foram realizados conforme o disposto na Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, e nas demais normas aplicáveis à utilização de animais em ensino e/ou pesquisa, especialmente as Resoluções Normativas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA. Todos os procedimentos com os animais foram realizados única e exclusivamente após aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa no uso de animais da UNIVILLE.

As condições de ambiente, iluminação, acomodação e nutrição seguiram as recomendações exigidas pelo ”Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 1996”.

Após o período de adaptação, todos os animais foram avaliados antes de qualquer tipo de procedimento experimental (teste basal) para comparação fisiológica entre organismos diferentes. Os animais também foram avaliados após a indução da dor neuropática, e então após a administração das nanopartículas de ouro e antagonista de receptor TRPA1 (HC030031).

O camundongo é uma espécie ideal para estudos de comportamento, pois tratam-se de animais de fácil manuseio e criação. Além disso, um número amostral pequeno já é suficiente para testar as hipóteses de trabalho.

Utilizou-se o modelo de dor da SDCR-I induzida por SDCR em camundongos, pois é um modelo já definido e que produz poucas alterações ao animal (como perda de peso e alterações locomotoras), porém causa o desenvolvimento de dor que é importante para o estudo (descoberta de novos analgésicos). Ressalta-se que os animais foram mantidos por apenas 17 dias com dor, um período de tempo em que observa-se no modelo da SDCR, porém o animal ainda apresenta comportamento locomotor normal, o que não impossibilita a avaliação dos parâmetros de dor. Também é necessário o uso de camundongos na pesquisa, pois foi necessário retirar amostras de tecidos após a eutanásia do animal para observar o estresse oxidativo e avaliar o possível efeito anti-inflamatório das nanopartículas de ouro. Além disso, as AuNPs não estão disponíveis ainda para uso clínico, desta maneira devem ser testadas primeiramente em animais de experimentação.

4.2 Síntese de nanopartículas

Foram utilizadas nanopartículas de ouro provenientes da Sociedade Educacional de Santa Catarina (UNISOCIESC) em Joinville/SC através de parceria, sintetizadas pelo método descrito por Turkevich e colaboradores (1951), com algumas modificações, que incluem a redução química do precursor metálico ácido tetracloroaúrico ($HAuCl_4$) (Sigma-Aldrich, MO, EUA) com o agente redutor e estabilizante citrato de sódio ($Na_3C_6H_5O_7.2H_2O$) (Nuclear, SP, Brasil), para evitar a coalescência.

O controle dimensional das nanopartículas foi efetuado variando-se a concentração do agente redutor, pois o tamanho das AuNPs depende da quantidade e da velocidade de citrato de sódio que se adiciona na reação, ou seja, quanto maior a quantidade adicionada e maior a velocidade de adição de citrato de sódio menor ficará a partícula.

Ensaios variando-se sistematicamente as concentrações de citrato de sódio foram efetuados até obtenção das AuNPs na dimensão desejada. A solução de citrato de sódio na concentração de 136,0 mM foi utilizada para obtenção do diâmetro médio de 10 nm.

Inicialmente, 100 mL de 0,50 mM de ácido tetracloroaúrico foram transferidos para um balão de fundo redondo e a solução foi aquecida em banho-maria no óleo em até 90º C sob agitação a 700 rpm. A solução de citrato de sódio previamente preparada, foi adicionada e o sistema mantido à temperatura descrita, em agitação a 200 rpm durante 20 minutos. O meio reacional foi então resfriado naturalmente até temperatura ambiente e o pH da solução foi ajustado ao pH fisiológico com solução tampão. A solução preparada adquiriu coloração vermelho escuro, correspondente ao tamanho das nanopartículas de 10 nm.

Todas as amostras de AuNPs foram armazenadas em temperatura ambiente, em frascos fechados e ao abrigo da luz, no biotério da UNIVILLE, onde foram realizadas as administrações nos camundongos.

4.3 Caracterização das nanopartículas de ouro (AuNPs)

Após a síntese, a solução de AuNPs foi caracterizada pela própria fornecedora (UNISOCIESC), empregando-se a técnica de espectroscopia no ultravioleta-visível (UV-Vis), via monitoramento da banda de superfície de plasmon ressonante (SPR), usando um espectrofotômetro modelo UV-1800, difração de raios-x, através do equipamento de LAB-X, modelo XDR – 6000 (Shimadzu),

Para a espectrometria de UV-visível, a medição da banda de SRP, foi realizada a temperatura ambiente num espectrofotômetro utilizando uma cubeta de quartzo contendo uma alíquota de 1 mL de cada uma das soluções, sendo que o espectro eletrônico das soluções foi monitorado diariamente ao longo de uma semana no intuito de revelar qualquer alteração do comprimento de onda na máxima absorção.

Para medidas de difratometria de raios-x (DRX), uma alíquota de 9 mL da solução de AuNPs foi centrifugada a 10.000 rotações por minuto por 10 minutos. O sobrenadante foi removido e o material sedimentado transferido para uma porta amostra e seco em estufa. O material foi caracterizado com os seguintes parâmetros: Comprimento de onda da radiação do tubo de cobre: 1.54056 Å, voltagem de 30 kV, corrente 30 mA. Velocidade de varredura: 2°/min, ao passo de 0.02°, entre 20-80° (Balasubramanian et al., 2010). O diâmetro médio das AuNPs foram calculados usando a equação de Scherrer (Yan et al., 2005).

Equação de Scherrer: $D = \frac{K\lambda}{\beta \cos(\theta)}$

Onde, D é Diâmetro médio, K = 0,94, uma constante característica das partículas esféricas, λ é comprimento onda (raios-x usado): 1,54056, β: Largura da banda a meia altura (total na metade máxima do pico em radianos) e θ: Ângulo de Bragg (do pico de 100% de intensidade) (Aromal & Philip, 2012).

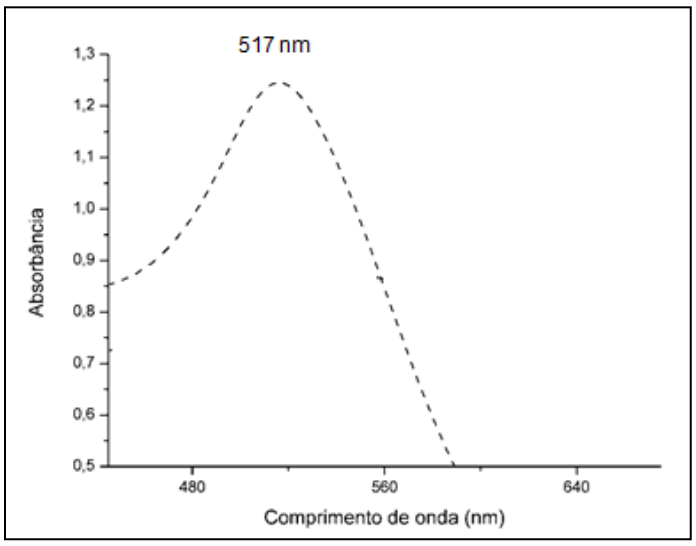
A caracterização morfológica das nanopartículas empregadas neste estudo foi efetuada com auxílio de um microscópio de transmissão eletrônica JEOL Titan 80-300 kV. As amostras foram preparadas da seguinte forma: imediatamente após a síntese, uma alíquota de solução de AuNPs foi diluída até absorbância inferior a 0,10 e transferida para um tubo Eppendorf que foi mantido em banho ultrassônico por 15 minutos. Em seguida, um porta amostra de cobre foi imerso na solução e

deixado secar ao ar por 12 h. A curva de distribuição de partículas foi efetuada selecionando-se uma região do porta-amostras contendo AuNPs bem dispersas.

A análise do Potencial Zeta, (ZetaPALS; Brookhaven Instruments, Nova Iorque, EUA) foi utilizado para medir os potenciais Zeta das GNP. A temperatura foi mantida a 25 °C. A concentração de ouro na solução de AuNPs foi determinada por espectrometria de absorção atômica (EAA) utilizando um espectrofotômetro modelo AA240 (FS-FAST SEQUENTIAL ATOMIC ABSORPTION SPECTROMETER marca VARIAN).

Quantidades suficientes de AuNPs 10 nm foram sintetizadas e caracterizadas conforme a metodologia descrita. A figura 06 corresponde aos espectros eletrônicos de soluções de AuNPs 10 nm e revela a presença de uma banda de SPR em 517 nm.

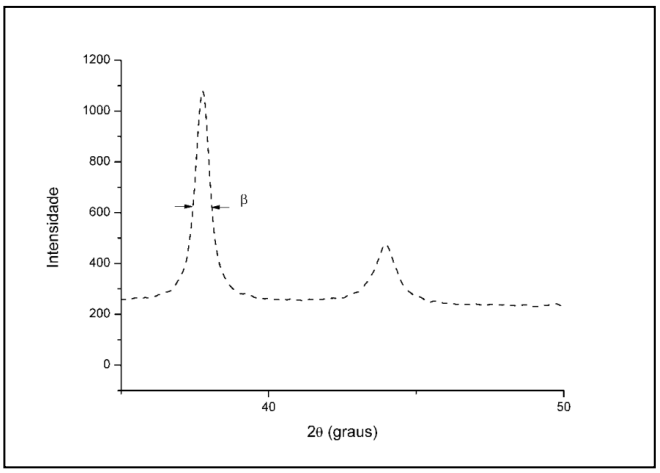
Figura 06 – Espectros eletrônicos para soluções aquosas de GNP-10nm.



Fonte: UniSociesc

Os difratogramas de raios-X apresentados na figura 07 mostram reflexões em 38,18 típico de ouro metálico. Os diâmetros médios das nanopartículas foram determinados com base no sinal de maior intensidade, ou seja, $2\Theta = 38^{o}$ e empregando a equação de Scherrer. Os valores obtidos foi de 10 nm, conforme esperado, sendo que este foi confirmado pela imagen de TEM, que mostrou predominantemente GNP esféricas.

Figura 07 – Padrão de DRX (Difratograma) de GNP-10 (reflexões a 38°). Cu Kα radiação (λ = 1,54056 Â, 30 kV, 30 mA). Taxa de leitura 2°/min.

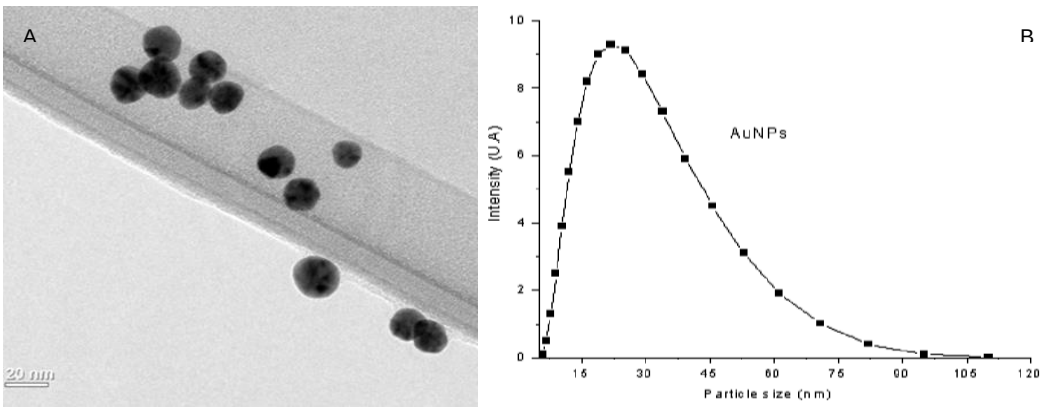


Fonte: UniSociesc

O teor de ouro em solução, determinado por espectroscopia de absorção atômica para ambas as soluções foi de 70 mg L^{-1}. A medida de potencial zeta revelou valor de -30 mV, caracterizando as AuNPs de 10 nm.

A figura 08 (A) ilustra a micrografia obtida por microscopia de transmissão eletrônica (TEM) das AuNPs. A inserção (histogramas (B) corresponde à respectiva curva de distribuição de tamanho de partículas).

Figura 08 – Microscopia eletrônica de transmissão e curva de tamanhos de GNP-10nm.



Nanopartículas de ouro esféricas preparadas em solução aquosa. (A) Diâmetro 10 nm. (B) Curva de distribuição do tamanho das partículas. A barra de escala equivale a 20 nm. Fonte: UniSociesc.

Pode-se observar que os resultados de espectroscopia de UV-vis, DRX assim como a análise de TEM corroboram com estudos anteriores, mostrando que os espectros eletrônicos e, consequentemente, as colorações das dispersões coloidais

de AuNPs dependem da geometria e tamanho das partículas, visto que a coloração resulta da interação dos elétrons das superfícies das nanopartículas com a luz incidente (Philip, 2008; Alkilany & Murphy, 2010). Ainda, com o aumento do tamanho das partículas a banda de SPR característica torna-se mais larga e desloca-se em direção ao vermelho, e os picos de DRX tornam-se mais estreitos (Link & El-Sayed, 1999; Chen et al., 2005). Neste sentido, a equação de Scherrer foi aplicada neste estudo, tomando como base o sinal mais intenso, isto é, o pico em ($2\theta = 38{,}18^{o}$), correspondente ao plano cristalino (111) para calcular o diâmetro médio de partícula das dispersões de nanopartículas de 10 nm. Este procedimento foi fundamental para assegurar que as AuNPs usadas neste estudo apresentaram sempre as mesmas dimensões, tornando, desta forma, aptas para serem utilizadas no estudo ora proposto. Um detalhe importante é em relação a curva de distribuição de tamanho de partículas que foi efetuada a partir das determinações de diâmetro de um conjunto de partículas por TEM. Observa-se nas inserções que se trata de distribuições estreita de tamanhos. Por exemplo, as AuNPs de 10 nm têm mínimo em 9 e máximo em 12 nm.

4.4 Protocolos experimentais

Os animais foram divididos em 10 grupos, sendo que cada grupo possuía 7 animais, conforme o quadro 1.

As administrações (salina, antagonista TRPA1 e nanopartículas nas concentrações de 2,5 mg/L, 7,0 mg/L e 22,0 mg/L) foram realizadas conforme descrito abaixo:

Grupo 1 – Controle Salina - 7 animais – administração intraperitoneal de veículo (salina).

Grupo 2 – Controle Antagonista TRPA1 - 7 animais – administração intraperitoneal de antagonista de receptor TRPA1 (HC030031);

Grupo 3 – Controle + NANO 2,5 - 7 animais – administração intraperitoneal de nanopartículas de ouro (2,5 mg/L);

Grupo 4 – Controle + NANO 7,0 - 7 animais – administração intraperitoneal de nanopartículas de ouro (7,0 mg/L);

Grupo 5 – Controle + NANO 22,0 - 7 animais – administração intraperitoneal de nanopartículas de ouro (22,0 mg/L);

Grupo 6 – Isquemia Salina - 7 animais – administração intraperitoneal de veículo (salina);

Grupo 7– Isquemia (SDCR) Antagonista TRPA1 – 7 animais - administração intraperitoneal de antagonista de receptor TRPA1 (HC030031);

Grupo 8 – Isquemia + NANO 2,5 - 7 animais – administração intraperitoneal de nanopartículas de ouro (2,5 mg/L);

Grupo 9 – Isquemia + NANO 7,0 - 7 animais – administração intraperitoneal de nanopartículas de ouro (7,0 mg/L);

Grupo 10 – Isquemia + NANO 22,0 - 7 animais – administração intraperitoneal de nanopartículas de ouro (22,0 mg/L).

Quadro 1 - Protocolo experimental para o modelo agudo e crônico de SDCR

Ensaio 1 Agudo – 4 dias	Ensaio 2 Crônico – 17 dias
Controle Salina	Controle Salina
Controle Antagonista	Controle + NANO 2,5
Controle + NANO 2,5	Controle + NANO 7,0
Controle + NANO 7,0	Controle + NANO 22,0
Controle + NANO 22,0	Isquemia Salina
Isquemia Salina	Isquemia + NANO 2,5
Isquemia (SDCR) Antagonista	Isquemia + NANO 7,0
Isquemia + NANO 2,5	Isquemia + NANO 22,0
Isquemia + NANO 7,0	
Isquemia + NANO 22,0	

Fonte: O autor.

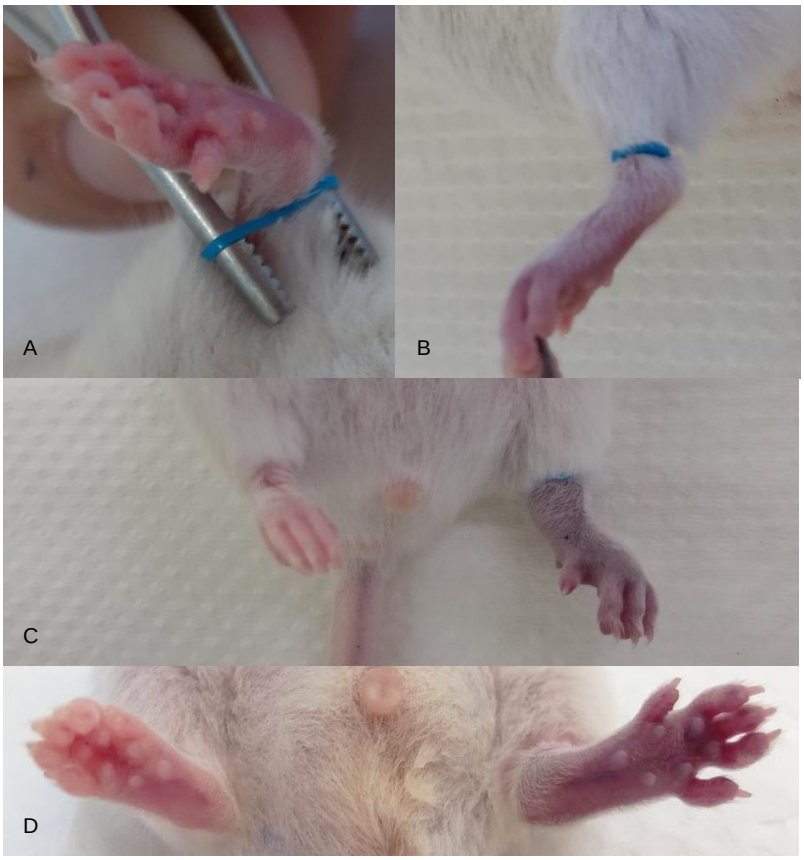
4.4.1 Modelo de indução de dor associada a isquemia-reperfusão

Antes do processo de isquemia-reperfusão, todos os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com associação de xilazina (3 mg/kg) e

quetamina (90 mg/kg) em dose suficiente para estado de anestesia geral que perdurou por 120 minutos, sendo administrada novamente caso necessário.

Após a indução da anestesia, provocou-se a isquemia no membro, onde um torniquete elástico (Oband n 16; Kyowa Limited, Osawa, Japan) foi colocado ao redor da pata traseira esquerda do camundongo (Figura 09), apenas próximo a articulação do tornozelo, por um período de 120 minutos (KLAFKE et al, 2016). A cessação da anestesia foi programada para que os camundongos se recuperassem totalmente dentro de 120 minutos após a reperfusão, o que ocorre imediatamente após a remoção do torniquete.

Figura 09 – Processo de isquemia com torniquete elástico.



(a) Inserção do torniquete elástico na pata do animal. (b) Posição final do torniquete elástico. (c) Processo de isquemia no decorrer do período de 2 horas. (d) Visualização da isquemia no membro esquerdo traseiro do animal.
Fonte: O autor.

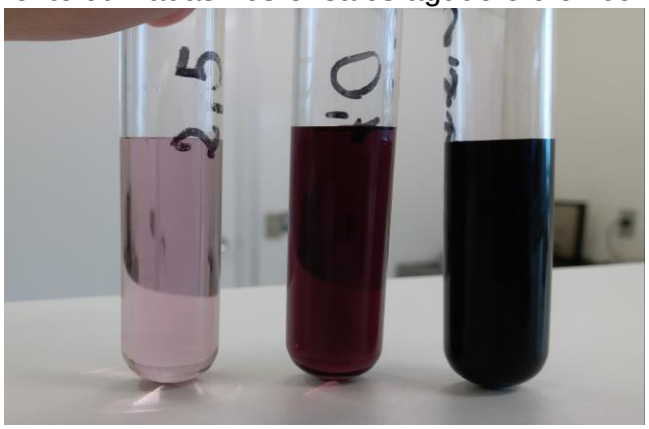
No grupo controle, os camundongos receberam exatamente o mesmo tratamento anestésico, porém o torniquete de elástico foi cortado de modo que apenas vagamente rodeou o tornozelo, não obstruindo o fluxo sanguíneo na pata traseira.

Os experimentos foram divididos em teste agudo, com duração de 4 dias e teste crônico, com duração de 17 dias. Durante o teste agudo é possível perceber o papel do receptor TRPA1, que já foi apresentado anteriormente em estudos de isquemia e reperfusão (SASAKI et al., 2014; KLAFKE et al., 2016; SO et al., 2016; DE PRÁ, et al., 2017). Entretanto, a fase crônica é aquela considerada como neuropática e consequentemente, com maior dificuldade de tratamento. Portanto, durante o teste crônico é possível analisar o desenvolvimento de alodinia mecânica (Von Frey) e alodinia ao frio (acetona) durante todo o período da realização do modelo da SDCR e avaliar o efeito dos tratamentos administrados (KLAFKE et al. 2016; DE PRÁ, S. D. T, 2017).

4.5 Administração de nanopartículas de ouro e antagonista do receptor TRPA1

No dia da indução de SDCR foi administrado aos animais por via intraperitoneal: nanopartículas de ouro avaliando dose-resposta nas concentrações de 2,5 mg/L, 7,0 mg/L e 22,0 mg/L (figura 10), solução salina (NaCl 0.9%) para o grupo controle ou o antagonista de receptor TRPA1 (HC030031) (300mg/kg/10mL) (KLAFKE et al. 2016). As concentrações de nanopartículas foram definidas baseadas em estudo anterior seguindo modelo animal para psoríase da Universidade Federal do Paraná (FERREIRA, 2017).

Figura 10 – Nanopartículas de ouro nas concentrações de 2,5 mg/L, 7,0 mg/L e 22,0 mg/L respectivamente utilizadas nos ensaios agudo e crônico.



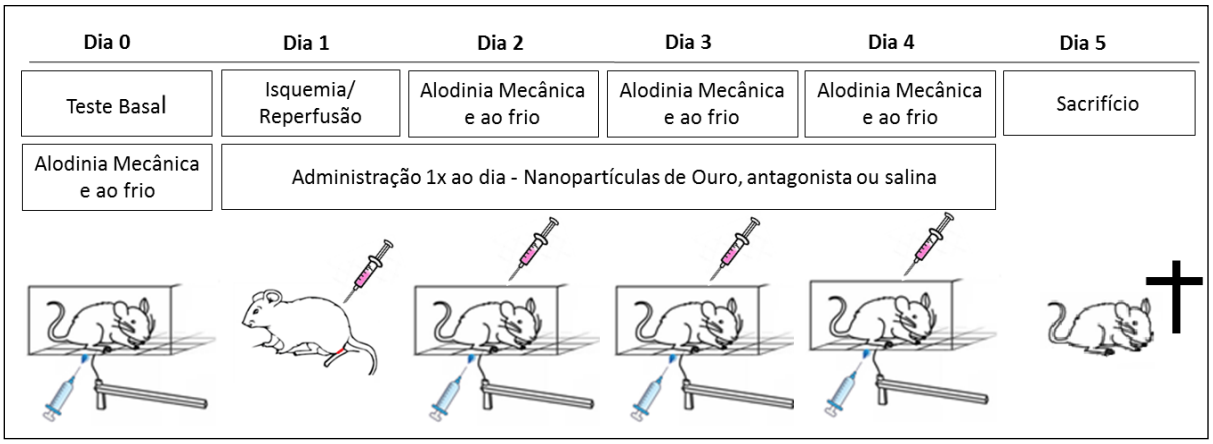
Fonte: O autor.

As administrações ocorreram apenas uma vez ao dia, iniciando no dia da indução da SDCR e nos três dias posteriores, totalizando quatro dias, com intervalo

de 24 horas entre as administrações, simulando tratamentos com pacientes com a SDCR.

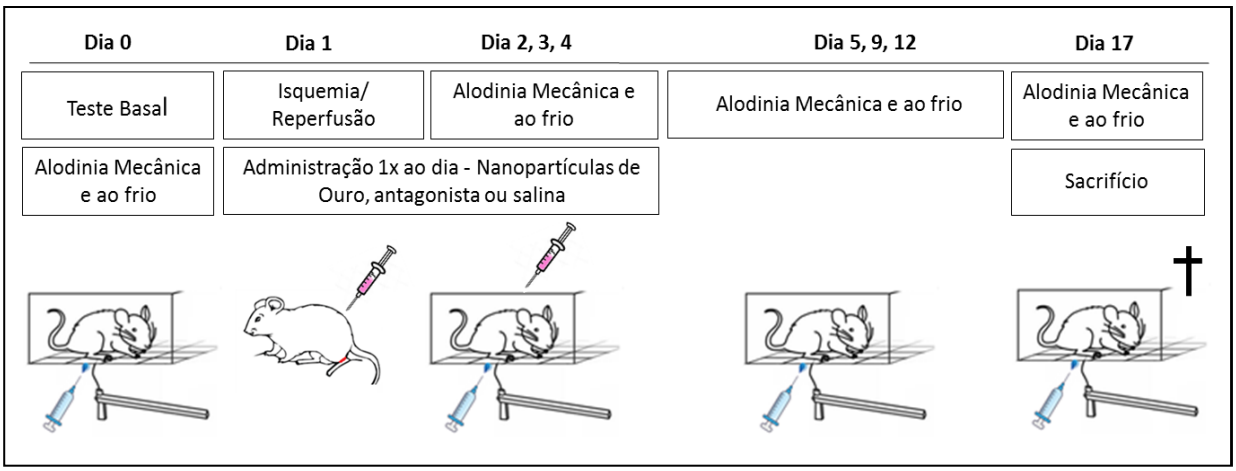
Após a administração de nanopartículas de ouro, veículo ou antagonista de receptor TRPA1 (HC030031), o desenvolvimento de hiperalgesia mecânica e ao frio foram avaliados até o 4° dia no modelo agudo (Figura 11) e nos dias 5, 9, 12 e 17 no modelo crônico (Figura 12) da SDCR (KLAFKE et al., 2016).

Figura 11 – Cronograma de ensaios realizados no modelo agudo.



Fonte: O autor.

Figura 12 – Cronograma de ensaios realizados no modelo crônico.



Fonte: O autor.

Foram necessários 70 camundongos para o experimento agudo e 56 para o experimento crônico, totalizando 126 animais no estudo. Justifica-se a diferença de animais nos dois ensaios pelo fato de que no ensaio agudo foi também administrado antagonista e no ensaio crônico, apenas veículo e nanopartículas.

Procedimentos que causam dor são necessários para o estudo e o desconforto causado pelos métodos utilizados foi apenas o necessário, e os animais foram mantidos e manuseados com cuidado e atenção durante todo o período de estudo.

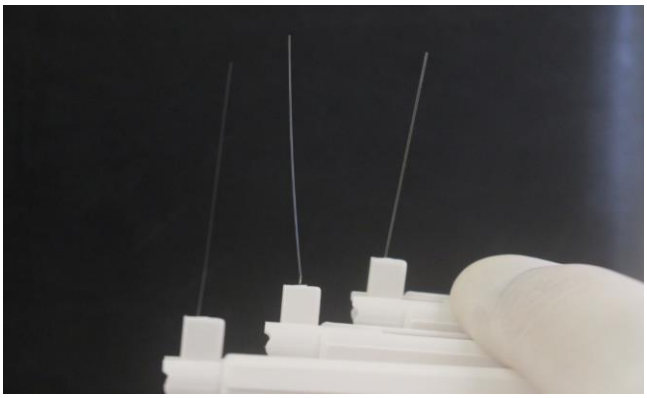
4.6 Testes para avaliar o desenvolvimento de dor

4.6.1 Alodinia Mecânica (estímulo mecânico)

Para estudar a sensibilidade a estímulos mecânicos foi realizado o teste utilizando filamentos de Von Frey de intensidade crescente (0,02-10 g), como descrito anteriormente (DIXON, 1980; ROSSATO et al., 2011; TREVISAN et al., 2012).

O teste manual de Von Frey, desenvolvido pelo fisiologista austríaco Maximilian von Frey, é um método considerado padrão ouro para determinar os limiares de avaliação da alodinia mecânica em camundongos e ratos (DEUIS et al., 2017). O equipamento consiste na utilização de filamentos de nylon de comprimento constante, mas de diâmetros crescentes que se inclinam ou se curvam quando é atingida uma força de pressão (Figura 13) (LEAL & SAKATA, 2014).

Figura 13 - Filamentos de Von Frey



Fonte: O autor.

Os animais foram ambientados no local de experimentação (figura 14), que consiste em câmaras elevadas com chão de tela metálica, por 1 hora. Após esse período, foi realizada a estimulação da pata traseira esquerda de cada animal com filamentos de Von Frey pelo método de up-and-down.

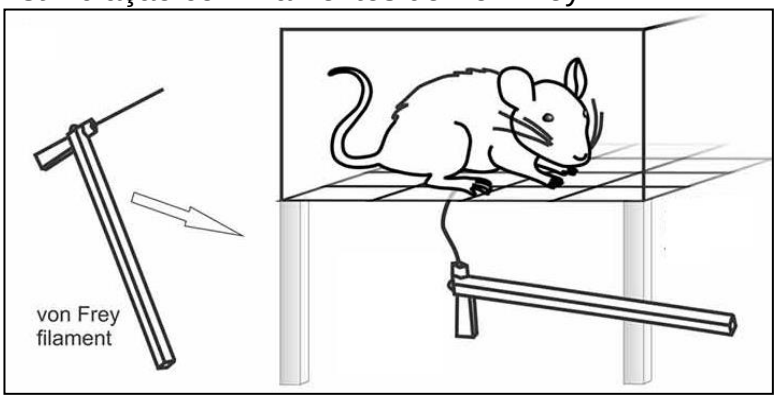
Figura 14 – Ambientação dos animais para experimentação.

Fonte: O autor.

Este método é utilizado para determinar a força mecânica necessária para eliciar uma resposta de retirada da pata em 50% dos animais, com base estatística (DIXON, 1980; CHAPLAN et al., 1994).

Inicialmente, o primeiro filamento utilizado promoveu uma pressão de 0,6g. Se não houve resposta, o próximo filamento com uma força maior é testado (1,0g); se houve uma resposta, o próximo filamento de força inferior é testado (0,4g) e assim sucessivamente. Este processo é contínuo até que pelo menos quatro leituras sejam obtidas após a primeira mudança de direção, e a sequência de resultados seja registrada. São consideradas respostas positivas se o animal retirar, lamber ou sacudir a pata (figura 15) (LEAL & SAKATA, 2014).

Figura 15 – Estimulação com filamentos de Von Frey.



Fonte: DEUIS et al., 2017.

No total, foram realizadas sete estimulações, com variação de utilização dos filamentos de 0,02; 0,07; 0,16; 0,40; 1,4; 2,0; e 4,0 g. Com os resultados obtidos, foi

calculado o valor correspondente a 50% do limiar, em g, que cada animal suporta (limiar 50%). Uma diminuição deste valor é considerada como hiperalgesia mecânica e uma reversão nesta queda como sendo um efeito antinociceptivo (anti-hiperalgésico) (DIXON, 1980).

4.6.2 Alodinia Térmica

O teste de evaporação da acetona ou teste da acetona é um método utilizado como uma medida de alodinia ao frio (CARLTON et al., 1994; CHOI et al., 1994; VISSERS e MEERT , 2005; DEUIS et al., 2017). Foi descrito pela primeira vez em 1994, sendo uma técnica utilizada para quantificar um comportamento incômodo, desencadeado pelo resfriamento.

A alodinia térmica ao frio foi mensurada usando uma modificação do método da gota de acetona. Após os animais serem ambientados, uma gota de acetona PA 99,5% (20 µL) foi borrifada na superfície plantar da pele da pata esquerda traseira dos animais. As respostas comportamentais pela retirada da pata do animal para a gota de acetona foram cronometradas utilizando um cronômetro digital, com tempo medido em segundos pelo tempo que o animal permanecer com a pata retirada do chão (TREVISAN et al., 2013).

Ambos os testes para avaliar o desenvolvimento de dor foram realizados pelas mesmas pessoas para evitar discrepância na leitura dos resultados.

4.7 Estudos bioquímicos e preparo das amostras

4.7.1 Sacrifício dos animais

Os animais foram sacrificados através de método físico por decapitação, na ausência de anestesia, onde sangue total e nervo ciático foram removidos e posteriormente utilizados para determinação da atividade das enzimas antioxidantes CAT, SOD e GSH-Px; avaliação de dano proteico através do conteúdo total de sulfidrilas e de proteínas carboniladas e avaliação de lipoperoxidação por meio da dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS).

O sacrifício dos animais, no modelo agudo, ocorreu no 5° dia após a indução da SDCR e os tecidos foram retirados para as análises, e no modelo crônico, os

animais foram sacrificados e os tecidos retirados para análises no 17° dia após a indução da SDCR.

4.7.2 Preparação dos eritrócitos e do plasma

Os eritrócitos e o plasma foram preparados a partir de amostras de sangue total obtidas de camundongos.

O sangue total foi centrifugado a 1,000 x g, o plasma foi separado e congelado para posterior determinação. Os eritrócitos foram então lavados 3 vezes com solução salina gelada (0,153 mol/L cloreto de sódio). Os lisados foram preparados pela adição de 1 mL de água destilada para 100 µL de eritrócitos lavados e congelados para determinação da atividade das enzimas antioxidantes.

Para determinação da atividade das enzimas antioxidantes, eritrócitos foram congelados e descongelados três vezes e centrifugados a 13,500 × *g* por 10 min. O sobrenadante foi diluído para conter aproximadamente 0,5 mg/mL de proteína.

4.7.3 Preparação do nervo ciático

O nervo ciático foi removido, decapsulado e mantido em gelo com tampão salina (154 mM NaCl, 5 mM Tris–HEPES, pH 7.5). O homogeneizado (15%) (p/v) foi preparado em tampão específico usando homogeneizador Potter-Elvehejem (5 pulsos). O homogeneizado foi centrifugado a × 3.000 g, a 4°C por 15 minutos para remoção de resíduos celulares e o sobrenadante estocado em alíquotas e armazenado a -80°C para determinação da atividade das enzimas antioxidantes, TBA-RS, proteínas carboniladas e conteúdo total de sulfidrilas (DE PRÁ, S. D. T, 2017).

4.8 Avaliação dos parâmetros de estresse oxidativo

4.8.1 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS)

TBA-RS foi determinado de acordo com o método descrito por Ohkawa *et al.* (1979). A metodologia de TBA-RS, mensura o Malondialdeído (MDA), um produto da lipoperoxidação, causado principalmente por radicais livres hidroxil. O nervo ciático

homogeneizado e o plasma foram misturados com ácido tricloroacético a 20% e 0,8% de ácido tiobarbitúrico e aquecidos num banho de água fervente durante 60 min. TBA-RS foi determinado pela absorvância a 535 nm. Uma curva de calibração foi obtida utilizando 1,1,3,3-tetrametoxipropano como o precursor de MDA e cada ponto da curva foi submetido ao mesmo tratamento que o das amostras. Os resultados foram expressos em nmol de MDA por mg de proteína.

4.8.2 Conteúdo Total de Sulfidrilas

O conteúdo total de sulfidrilas foi determinado de acordo com o método descrito por Aksenov e Markesbery (2001), o qual se baseia na redução do ácido ditionitrobenzóico (DTNB) por tióis, gerando um derivado amarelo (TNB) que é mensurado espectrofotometricamente em 412nm. Resumidamente, 50µL de homogeneizado foi adicionado a 1 mL de tampão PBS pH 7,4 contendo EDTA 1mM. A reação foi iniciada pela adição de 30µl de DTNB 10,0mM e incubada durante 30 minutos à temperatura ambiente em local escuro. Os resultados foram expressos em nmol TNB/mg de proteína.

4.8.3 Catalase

A atividade de CAT foi ensaiada pelo método de Aebi (1984) usando um espectrofotômetro Shimadzu UV-1800. O método utilizado baseia-se no desaparecimento de H_2O_2 a 240 nm num meio de reação contendo 20 mM de H_2O_2, 0,1% de Triton X-100, 10 mM de tampão de fosfato de potássio, pH 7,0, e proteína 0,1-0,3mg/mL. Uma unidade foi definida como 1µmol de H_2O_2 consumido por minuto e a atividade específica é calculada como unidades de CAT/mg de proteína.

4.8.4 Glutationa Peroxidase (GSH-Px)

A atividade de GSH-Px foi mensurada pelo método de Wendel (1981), utilizando tertbutil-hidroperóxido como substrato. A decomposição do NADPH foi monitorada em espectrofotômetro a 340 nm por 4 minutos (espectrofotômetro Shimadzu UV-1800). O meio contém 2 mM de GSH, 0,15U / ml GSH redutase, 0,4 mM de azida, 0,5 mM de tertbutil- hidroperóxido e 0,1 mM de NADPH. Uma unidade

de GSH-Px é definida como 1µmol de NADPH consumido por minuto e a atividade específica é apresentada como unidades de GSH-Px/mg de proteína.

4.8.5 Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi determinada pelo método de auto-oxidação do pirogalol, como descrito por Marklund (1985), um processo altamente dependente de superóxido (O_2^-), que é um substrato para a SOD. O processo consiste em 15 µL de cada amostra, 215µL de uma mistura contendo 50 uM de tampão Tris, pH 8,2 foram adicionados à 1 µM de EDTA e 30 uM de CAT. Subsequentemente, são adicionados 20 uL de pirogalol e a absorvância foi registada imediatamente a cada 30 segundos durante 3 minutos a 420 nm usando um espectrofotômetro Shimadzu UV-1800. A inibição da auto-oxidação do pirogalol ocorre na presença de SOD, cuja atividade pode ser indiretamente testada espectrofotometricamente. Uma curva de calibração foi realizada com SOD purificada como referência, para calcular a atividade da SOD presente nas amostras. Uma unidade de SOD é definida como a quantidade de SOD necessária para inibir 50% da auto-oxidação de pirogalol e a atividade específica é relatado como unidades de SOD/mg de proteína.

4.8.6 Conteúdo de proteínas carboniladas

O teor de carbonilas foi verificado através de um método descrito por Reznick e Packer (1994), com base na reação de carbonilação de proteínas com dinitrofenilhidrazina formando dinitrofenilhidrazona, um composto amarelo, medido espectrofotometricamente a 370 nm. Resumidamente, 200 uL de homogeneizado ou plasma foi adicionado a tubos de plástico contendo 400 uL de dinitrofenilhidrazina 10 mM (preparado em HCl 2 M). As amostras foram mantidas no escuro durante 1 h e agitadas em vórtex a cada 15 min. Subsequentemente, 500 uL de ácido tricloroacético a 20% foram adicionados a cada tubo. A mistura foi submetida a vórtex e centrifugada a 14.000 x g durante 3 minutos e o sobrenadante obtido é descartado. O sedimento foi lavado com 1 mL de etanol / acetato de etila (1: 1 v / v), agitado e centrifugado a 14000 x g durante 3 min. O sobrenadante foi rejeitado e o sedimento ressuspenso em 600µL de guanidina 6M (preparado numa solução de fosfato de potássio 20 mM, pH 2,3), antes de agitação em vórtex e incubação a 60°C

durante 15 min. As amostras em seguida foram centrifugadas a 14.000 x g durante 3 min e o sobrenadante usado para medir a absorvância a 370 nm (UV) numa cubeta de quartzo. Os resultados são relatados como conteúdo total de carbonilas (nmol / mg de proteína).

4.8.7 Dosagem de Proteínas

A determinação das proteínas foi realizada pelo método de Lowry (1951), onde foi utilizando albumina sérica bovina como padrão.

4.9 Investigação de hepatotoxicidade e nefrotoxicidade de nanopartículas de ouro

Os camundongos foram divididos em quatro grupos (sete animais por grupo) e tratados uma vez por dia por quatro dias com AuNPs (0,025; 0,07 e 0,22 mg/Kg) ou solução salina (0,1 ml/10 g) por via oral. Um dia após a última administração, os animais foram eutanasiados por decapitação e o sangue foi coletado em tubos heparinizados e o plasma foi separado por processo de centrifugação a 2.500 rpm por 10 minutos. Os processos das análises bioquímicas constaram das dosagens de: transaminase glutâmico oxalacética (TGO) e transaminase glutâmico pirúvica (TGP), ureia e creatinina.

Os ensaios foram realizados por sistema de identificação-espectrofotométrica em analisador bioquímico semi-automatizado Shimadzu UV-visível, com utilização de Kits comerciais Bioclin/Biosystems e Labtest.

4.10 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no IBM Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) para Windows, versão 20.0, em computador compatível com PC (IBM Corp. Armonk, NY, EUA). O teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov foi realizado para confirmar uma distribuição paramétrica; os dados foram então analisados por ANOVA, seguido pelo teste post-hoc de Duncan, quando o teste F foi significativo. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Os resultados são expressos como médias ± DP para sete experiências independentes

(animais) realizadas em duplicado. *** p <0,001, ** p <0,01 e * p <0,05, em comparação com o teste de intervalo múltiplo de Duncan.

5 INTERDISCIPLINARIDADE

A dor é um fenômeno universal, vivenciado em todas as faixas etárias, níveis econômicos e em todas as situações e ambientes, sendo particular de cada indivíduo e influenciando no psicológico, social, fisiológico e econômico (KAZANOWSLI & LACCETTI, 2005).

Apesar de ser considerada rara, a SDCR é caracterizada por dor intensa que acomete uma extremidade do corpo, além de edema, aumento da sensibilidade ao frio e ao toque, sudorese, alteração de coloração e diminuição da capacidade de movimento (BORTAGARAY et al, 2019). Além de vários acontecimentos relacionados a traumas, normalmente ocasionados por entorses, fraturas, luxações, lacerações, contusões e distensões, além de imobilização prolongada, gesso apertado, traumas cirúrgicos, períodos pós-operatórios, após processos inflamatórios, infarto do miocárdio, acidente vascular encefálico, infecção, injeções, tumores (FELIU; EDWARDS, 2010; ARTIOLI et al, 2011; CORDON et al, 2002; BIRKLEIN & DIMOVA, 2017), a isquemia do membro, seguida de sua reperfusão culminam em diversos efeitos deletérios para os mais diferentes tipos de órgãos.

A ativação de enzimas participantes da redução do oxigênio molecular gera EROs (YAMAKI et al, 2012; ROCHA et al, 2012) implicando em dano tecidual que origina várias respostas celulares deletérias que culminam em inflamação, morte celular, necrose tecidual e falência do órgão (FONDEVILA et al., 2003; MIGUEL, 2012; YAMAKI *et al.*, 2012).

Trata-se de uma doença multifatorial com poucas opções terapêuticas e que, ainda assim, não resolvem em sua totalidade a situação do indivíduo. Os dados referentes a sua epidemiologia são escassos, dificultando seu diagnóstico e tratamento imediatos ou corretos.

A ciência está em constante desenvolvimento, portanto esta pesquisa apresenta muitos benefícios atrelados as demais áreas do conhecimento.

A nanotecnologia é uma ciência em ascensão que apresenta várias pesquisas atuais, busca-se o desenvolvimento de novos tratamentos, fazendo com que nanomateriais e a própria nanotecnologia tenham novas aplicações.

Em casos positivos de desenvolvimento de fármacos e tratamentos, é possível a melhora na qualidade de vida dos indivíduos que sofrem com a SDCR. Por se tratar de material em escala nanométrica, pode ocorrer melhora no

armazenamento, bem como a redução de resíduos hospitalares, contribuindo para gestão ambiental. Os tratamentos com nanomateriais podem ter fácil aplicabilidade e apresentar menores efeitos colaterais.

Com a descoberta e aplicabilidade de novos tratamentos, o rendimento dos indivíduos acometidos pela SDCR, tanto ocupacional como social terão resultados positivos. Os indivíduos poderão participar de maiores atividades que antes eram impedidos pelos sinais e sintomas da doença, entrelaçando os laços familiares.

Além disso, o desenvolvimento de novas tecnologias farmacêuticas corrobora para fins lucrativos e aumentam a concorrência de indústrias químicas, com a finalidade de aprimorar/criar novas formas farmacêuticas, cada vez mais efetivas e que resultem em menor toxicidade para os indivíduos, outros organismos, corpos hídricos e demais sistemas ambientais.

Portanto, o estudo da associação das AuNPs para tratamento da SDCR, traz benefícios em diversos níveis e áreas de conhecimento, gerando ganhos na indústria química e farmacêutica, alavancando a nanociência, causando redução de despesas com o sistema de saúde, além da redução de resíduos e contribuindo para diversas áreas, como a biologia, farmácia, medicina, biomedicina, química, fisioterapia, engenharias e muitas outras áreas de conhecimento, estreitando cada vez mais com o avanço das pesquisas, as áreas de saúde e meio ambiente.

6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 Artigo:

EFFECT OF GOLD NANOPARTICLES ON NEUROPATHIC PAIN OBSERVED IN A MODEL OF REGIONAL COMPLEX PAIN SYNDROME

Alessandra Betina Gastaldi[1], Larissa Delmonego[1], Maria Helena Packer[2], Thayná Patachini Maia[2], Luana Carla Pscheidt[3], Eduardo Manoel Pereira[3], Heloisi Cabral[4], Maria Paula Engster[5], Samira Dal-Toé de Prá[5], Débora Delwing-Dal Magro[6], Daniela Delwing-de Lima[1-2*]

[1]Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente, Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE, Rua Paulo Malschitzki,10- Zona Industrial Norte, CEP 89201-972, Joinville, SC, Brazil.

[2]Departamento de Medicina, Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE, Rua Paulo Malschitzki, 10- Zona Industrial Norte, CEP 89201-972, Joinville, SC, Brazil.

[3]Departamento de Farmácia, Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE, Rua Paulo Malschitzki, 10- Zona Industrial Norte, CEP 89201-972, Joinville, SC, Brazil.

[4]Departamento de Ciências Biológicas, Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE, Rua Paulo Malschitzki, 10- Zona Industrial Norte, CEP 89201-972, Joinville, SC, Brazil.

[5]Departamento de Saúde, Sociedade Educacional de Joinville – UNISOCIESC, Rua Albano Schmidt, 3333 - Boa Vista, Joinville - SC, CEP 89206-001, Joinville, SC, Brazil.

[6]Departamento de Ciências Naturais, Centro de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Regional de Blumenau - FURB, Rua Antônio da Veiga,140, CEP 89012-900, Blumenau, SC, Brazil.

*Address for correspondence: Dra. Daniela Delwing-de Lima, Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente; Departamento de Medicina, Universidade da Região de Joinville, Rua Paulo Malschitzki, 10 - Zona Industrial Norte, CEP 89201-972, Joinville, SC, Brazil, Phone 55 47 3461 9112, E-mail: daniela.delwing@univille.br; danidelwing@hotmail.com

ABSTRACT

This study evaluated the effect of gold nanoparticles (AuNPs) in the acute and chronic phases of an animal model of Complex Regional Pain Syndrome Type I (CRPS-I) and on oxidative stress parameters (levels of substances reactive to thiobarbituric acid [TBA-RS], total sulfhydryl content [SH], protein carbonyl content) and on the activity of the antioxidant enzymes catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) in the blood and sciatic nerve of mice. We also evaluated the acute hepatic and nephrotoxicity of AuNPs through the levels of transaminases, creatinine and urea in the serum of mice. The animals were anesthetized and an elastic tourniquet was used around the left hind paw for 120 minutes, followed by measurements of the mechanical threshold with von Frey filaments and the thermal threshold with acetone. The animals received intraperitoneal administration of AuNPs at concentrations of 2.5 mg/L, 7.0 mg/L and 22.0 mg/L, Ankyrin Transient Potential Receptor 1 (TRPA1) receptor antagonist (HC030031) 300 mg/kg or saline vehicle after induction of CRPS-I. The CRPS-I model promoted a statistically significant increase in the activity of CAT, SOD and GSH-Px in the erythrocytes; increase GSH-Px and reduce SOD in the sciatic nerve and increase the levels of TBA-RS in the plasma and sciatic nerve. The content of SH suffered a significant decrease in the plasma of the animals that underwent ischemia. These alterations were significantly reversed by treatment with AuNPs (7.0 and 22.0 mg/L). AuNPs (22.0 mg/L) reduced protein carbonyl content in the sciatic nerve. In the acute and chronic trial, AuNPs were significantly effective in reducing mechanical and thermal allodynia in the three doses used. The levels of transaminases, creatinine and urea were not modified by short-term treatment with AuNPs.

Keywords: Neuropathic pain, Complex regional pain syndrome, Gold nanoparticles, treatment with gold nanoparticles.

1 INTRODUTION

The high prevalence (30 to 40%) of chronic pain in the Brazilian population (OLIVEIRA et al., 2013) warns the necessity of studies to characterize the disability resulting from chronic painful conditions and suggest medications for its management. According to the Brazilian Society for the Study of Pain, about 50 to 60% of patients suffering from some type of chronic pain are partially or totally disabled, transiently or permanently (OLIVEIRA et al., 2013), significantly compromising quality of life and hindering work capacity, pointing out that this is an important public health problem.

The Complex Regional Pain Syndrome Type I (CRPS-I) is one of the chronic pain syndromes that are poorly adaptive and have less than expected control. It is a clinical condition that is characterized by intense pain, associated with multiple autonomic and sensory-motor changes that can appear spontaneously (rare) or, more often, after a trauma, being the intensity of the clinical manifestations disproportionate to the stimulus trigger (SILVA et al., 2018). Two subtypes are recognized, which are generally distinguished by the existence or not of associated nerve damage (types II and I, respectively). Pain may arise after trauma, not respecting the distribution of a single peripheral nerve and be associated with allodynia, hyperalgesia, edema, changes in skin vascularization and sweating in the affected area (SILVA et al., 2018; BIRKLEIN & DIMOVA, 2017; BORTAGARAY et al, 2019).

Pain in CRPS-I is often described as burning, characteristic of typical neuropathic pain. In most cases, CRPS-I occurs after a fracture, limb trauma, or injury to the peripheral or central nervous system. Sometimes, symptoms develop without any trauma (GIERTHMUHLEN, BINDER, BARON, 2014).

Although the global market for analgesic drugs is around 25 billion dollars/year and analgesics in the class of non-steroidal anti-inflammatory drugs are among the best selling drugs worldwide, the effective pharmacological control of some types of pain is still showing itself a major challenge for the medical-scientific community (ELY et al., 2015). Thus, the drugs used to treat chronic pain associated with inflammation or neuropathy have limitations related mainly to the lack of effectiveness and the development of adverse effects (OLIVEIRA JÚNIOR, CORRÊA, FERREIRA, 2016). Due to the above, emphasis has been placed on the search for new molecular

targets for the treatment of CRPS-I, which has been described as a pain that the patient feels, being disproportionate to the event that triggers it. It is a hyperalgesic pathology, affecting musculoskeletal, neural and vascular structures, and its diagnosis and treatment are challenging due to its nature and dynamics of presentation and progression (NEUMEISTER & ROMANELLI, 2020).

In the process of searching for new analgesic drugs, pre-clinical research is important for the definition of goals, such as more effective treatments for pain relief, patient comfort and minimization of risks for the individual, being fundamental in the search the pathophysiology of mechanisms involved in the disease, in order to propose more effective and safer therapies.

Considering the anti-inflammatory and analgesic potential of gold nanoparticles (AuNPs) (CHEN, 2013) and the relative difficulty of controlling the pain of CRPS-I, it is possible that nanoparticles are an effective and safe alternative to alleviate it. Therefore, we investigate the effect of AuNPs in the acute and chronic phases of an animal model of CRPS-I, on oxidative stress parameters and on the activity of antioxidant enzymes in the blood and sciatic nerve of mice. We also evaluated the acute hepatotoxicity and nephrotoxicity of AuNPs in the serum of mice.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Animals

Male *Mus musculus* adult Swiss mice (20 - 30 g, 60 days) were used. Before the experimentation process the animals were accommodated (7 per cage) and acclimated for 7 days to adapt to a new environment. They were kept on a 12h light/dark cycle. at a constant temperature of 22° C, with free access to food and water. The experiments were carried out according to the provisions of Law 11,794, of October 8, 2008, and in the other rules applicable to the use of animals in teaching and/or research, especially the Normative Resolutions of the National Council for the Control of Animal Experimentation - CONCEA. The project was submitted to evaluation by the Animal Research Ethics Committee of the University of the Region of Joinville (UNIVILLE) and approved by the opinion document 004/1118. All procedures involving animals were performed only and exclusively after ethical approval of the project.

The conditions of environment, lighting, accommodation and nutrition followed the recommendations required by the “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 1996”.

2.2 Gold Nanoparticles

AuNPs from the Educational Society of Santa Catarina (UNISOCIESC) in Joinville / SC were used.Were synthesized by the method described by Turkevich and collaborators (1951) with some modifications, which include the chemical reduction of the metallic precursor tetrachloroauric acid (HAuCl4) (Sigma -Aldrich, MO, USA) with the reducing agent and stabilizing sodium citrate (Na3C6H5O7.2H2O) (Nuclear, SP, Brazil), to avoid coalescence.

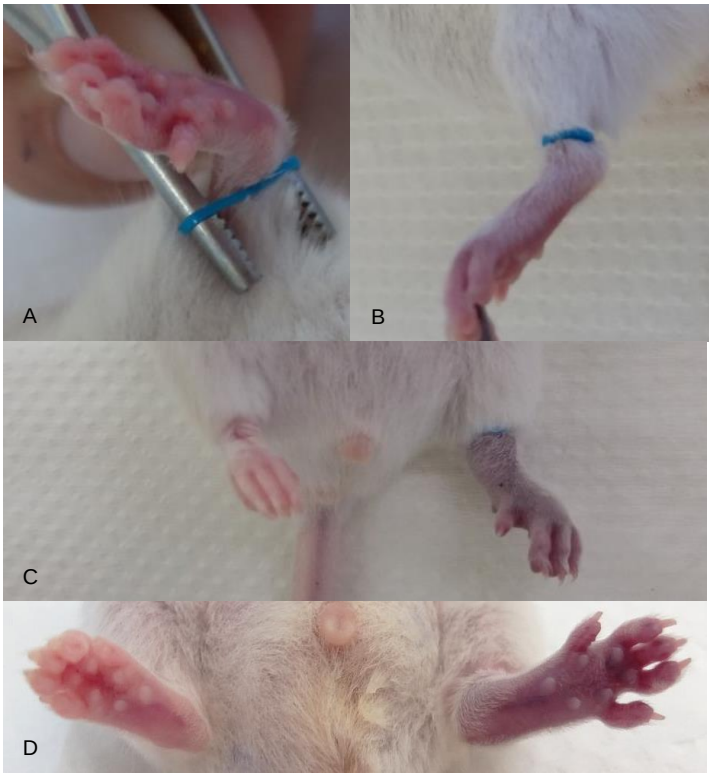
After synthesis, the AuNPs solution was characterized by the supplier itself, using the ultraviolet-visible (UV-Vis) spectroscopy technique, via monitoring the resonant plasmon surface band (RPS), using a spectrophotometer model UV-1800, X-ray diffraction, using the LAB-X equipment, model XDR - 6000 (Shimadzu).

The results obtained were predominantly spherical nanoparticles of 10 nm.

2.3 CRPS-I ischemia-reperfusion model

Animals were anesthetized intraperitoneally with an association of xylazine (3 mg/kg) and ketamine (90 mg/kg) for general anesthesia to last for 120 minutes. After induction of anesthesia, an elastic tourniquet (Oband n 16; Kyowa Limited, Osawa, Japan), as shown in the figure 1, was placed around the left posterior leg of the mice just next to the ankle joint for 120 minutes (KLAFKE et al, 2016). The cessation of anesthesia was scheduled so that the mice would recover fully within 120 minutes after reperfusion, which occurred immediately after the tourniquet was removed. Control group were anesthetized, but the elastic tourniquet was cut so that the ankle was only loosely surrounded and did not obstruct blood flow in the hind leg. Previous experiments have shown that during this time interval the development of mechanical hyperalgesia and cold allodynia is successfully induced (CODERRE et al, 2004; KLAFKE et al, 2016).

Figure 1: Ischemia process with elastic tourniquet.



(a) Insertion of the elastic tourniquet in the animal's paw. (b) Final position of the elastic tourniquet. (c) Ischemia process over the 2 hour period. (d) Visualization of ischemia in the animal's left rear limb. (Source: The author, 2019)

2.4 Administration of gold nanoparticles and TRPA1 receptor antagonist

AuNPs in doses of 0,025 mg/Kg, 0,07 mg/Kg and 0,22 mg/Kg, saline solution (0,9%) or HC030031 (300mg/kg/10ml) were administered intraperitoneally once a day, on the day of CRPS-I induction right after the ischemia/reperfusion procedure and three days thereafter always with a 24-hour difference between applications.

The development of mechanical and cold hyperalgesia was evaluated until the 4th day in the acute model and on the 5th, 9th, 12th and 17th days in the chronic model of the CRPS-I; afterwards, AuNPs, vehicle or TRPA1 receptor antagonist (HC030031) were administered.

The animals were divided into 10 groups (7 animals per group), as shown in table 1.

The administrations (vehicle, TRPA1 HC030031 antagonist and AuNPs) were performed as follows:

Table 1 - Division of groups for the acute and chronic model of SDCR-I

Acute test 4 dias	Chronic test 17 dias
Control – vehicle/saline	Control – vehicle/saline
Control - antagonist (HC030031)	Control + AuNPs 0,025 mg/Kg
Control + AuNPs 0,025 mg/Kg	Control + AuNPs 0,07 mg/Kg
Control + AuNPs 0,07 mg/Kg	Control + AuNPs 0,22 mg/Kg
Control + AuNPs 0,22 mg/Kg	Ischemia vehicle/saline
Ischemia vehicle/saline	Ischemia AuNPs 0,025 mg/Kg
Ischemia antagonist (HC030031)	Ischemia AuNPs 0,07 mg/Kg
Ischemia AuNPs 0,025 mg/Kg	Ischemia AuNPs 0,22 mg/Kg
Ischemia AuNPs 0,07 mg/Kg	
Ischemia AuNPs 0,22 mg/Kg	

(Source: The author, 2019)

The order of procedures consisted of Von Frey test (mechanical stimulus), Acetone test (cold hyperalgesia) and administration of AuNPs and TRPA1 receptor antagonist, so the effect of the previous day's treatment was evaluated in the following day.

2.5 Von Frey test (mechanical stimulus)

To study the sensitivity to mechanical stimulus, the test was performed using von Frey filaments of increasing intensity (0.02-10g) (DIXON, 1980; ROSSATO et al., 2011; TREVISAN et al., 2012). The animals were briefly acclimated in the experimentation site, which consists of chambers elevated with wire mesh floor, for 1 hour. After this period, the left hind paw of each animal was stimulated with von Frey filaments by the up-and-down method for baseline measurement. The first filament used caused a pressure of 0.4g, if the paw was removed, a lower pressure filamento

was applied. If no removal occurred, a higher pressure filament was used. Seven stimulations were performed, using 0.02; 0.07; 0.16; 0.40; 1.4; 2.0; and 4.0g filaments which allowed calculating the value corresponding to 50% of the threshold (g), that each animal tolerated. Significant decrease in this thresold was considered as mechanical hyperalgesia while its reversal represented an antinociceptive (anti-hyperalgesic) effect (DIXON, 1980).

After SDCR-I induction, this test was performed daily till the 4th day (acute model) and at the 5th, 9th, 12th and 17th days (chronic model).

2.6 Acetone test (cold hyperalgesia)

Allodynia to thermal cold was measured using a modification of the acetone drop method. After acclimatizing the animals, a drop of 99.5% acetone PA (20 µL) was administered topically and placed on the skin surface of the animal's paw. The behavioral responses of removing the paw after the acetone drop was timed using a stopwatch and recording the time the animal remained with the paw lifted (TREVISAN et al, 2012).

The acetone test was performed daily till the 4th day in the acute model and at the 5th, 9th, 12th and 17th days in the chronic model.

2.7 Samples Preparation

Erythrocyte and plasma preparation

For erythrocyte separation, peripheral blood was collected and transferred to heparinized tubes, which were centrifuged at 1,000 rpm, and the plasma was removed by aspiration and maintained frozen at −80 °C until assay. Erythrocytes were washed three times with cold saline solution (0.153 mol/L sodium chloride) and lysates were prepared by the addition of 1 mL of distilled water to 100 µL washed erythrocytes and maintained frozen at −80 °C until determination of the antioxidant enzyme activities (LIMA *et al*., 2017). For the determination of antioxidant enzyme activity, erythrocytes were frozen and thawed three times, and centrifuged at 13,500 rpm for 10 min. The supernatant was diluted in order to contain approximately 0.5 mg/mL of protein (LIMA *et al*., 2017).

Serum preparation

Serum was prepared from total blood samples obtained from rats. The peripheral blood was rapidly collected and transferred to tubes without anticoagulant, centrifuged at 1,000 rpm for 10 min, after the serum was separated and used to the analyses of liver and kidney function (LIMA *et al*., 2017).

Sciatic nerve preparation

The sciatic nerve of the ischemic hindpaw was removed, kept on ice-cold buffered sodium phosphate (20 mM, pH 7.4, 140 mM KCl) and homogenized in ten volumes (1:10 w/v) of appropriate buffer. Homogenates were prepared using a Potter-Elvehejem homogenizer (Remi motors, Mumbai, India) by passing 5 pulses and centrifuged at 800 rpm for 10 min at 4°C to discard nuclei and cell debris. The pellet was discarded and the supernatant was saved and stored at −80°C for further determination of parameters of oxidative stress (LIMA *et al*., 2017).

2.8 Biochemical studies

Thiobarbituric acid reactive substances (TBA-RS)

TBA-RS were determined according to the method described by Ohkawa *et al.* (1979). The methodology for the analysis of TBA-RS measures malondialdehyde (MDA), a product of lipoperoxidation, caused mainly by hydroxyl free radicals. Initially, plasma or sciatic nerve in 1.15% KCl was mixed with 20% trichloroacetic acid and 0.8% thiobarbituric acid and heated in a boiling water bath for 60 min. TBA-RS were determined by the absorbance at 535 nm. A calibration curve was obtained using 1,1,3,3-tetramethoxypropane as the MDA precursor and each curve point was subjected to the same treatment as that of the supernatants. TBA-RS content was expressed as nanomoles of MDA formed/mg of protein.

Total Sulfhydryl Content

The total sulfhydryl content was determined according to the method of Aksenov & Markersbery (2001), which is based on the reduction of dithionitrobenzoic acid (DTNB) by thiols, generating a yellow derivative (TNB), which is measured

spectrophotometrically at 412 nm. For the assay, 50 µL of homogenate or plasm were added to 1 mL of phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4, containing 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). The reaction was started by the addition of 30 µL of 10 mM DTNB and incubated for 30 minutes at room temperature in the dark. Analyses of a blank (DTNB absorbance) was also performed. The results were expressed as nanomoles of TNB/mg protein.

Protein carbonyl Content

Protein carbonyl content was assayed by a method described by Reznick & Packer (1994), based on the reaction of protein carbonyls with dinitrophenylhydrazine to form dinitrophenylhydrazone, a yellow compound that is measured spectrophotometrically at 370 nm. Briefly, 200 µL of homogenate or plasm were added to plastic tubes containing 400 µL of 10 mM dinitrophenylhydrazine (prepared in 2M HCl). Samples were kept in the dark for 1h and vortexed every 15 min. Subsequently, 500 µL of 20% trichloroacetic acid were added to each tube. The mixture was vortexed and centrifuged at 14,000 rpm for 3 min and the supernatant obtained was discarded. The pellet was washed with 1 mL ethanol/ethyl acetate (1:1 v/v), vortexed and centrifuged at 14,000 rpm for 3 min. The supernatant was discarded and the pellet re-suspended in 600 µL of 6 M guanidine (prepared in a 20 mM potassium phosphate solution, pH 2.3), before vortexing and incubating at 60ºC for 15 min. Samples were then centrifuged at 14,000 rpm for 3 min and the supernatant was used to measure absorbance at 370 nm (UV) in a quartz cuvette. Results were reported as carbonyl content (nmol/mg protein).

Catalase Assay (CAT)

CAT activity was determined by the method of Aebi (1984). The method used is based on the disappearance of hydrogen peroxide (H_2O_2) at 240 nm in a reaction medium containing 20 mM H_2O_2, 0.1% Triton X-100, 10 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0. One CAT unit is defined as 1 µmol of H_2O_2 consumed per minute and the specific activity is calculated as CAT units/mg protein.

Superoxide Dismutase Assay (SOD)

The activity of SOD was assayed by the method described by Marklund (1985), a highly dependent superoxide ($O2^{\bullet-}$) process, which is a substrate for SOD. 15 µL of each sample were added to 215 µL of a mixture containing 50 µM Tris buffer, 1 µM EDTA, pH 8.2, and 30 µM CAT. Subsequently, 20 µL of pyrogallol was added and the absorbance was measured every 30 seconds for 3 minutes at 420 nm using a spectrophotometer. Inhibition of auto-oxidation of pyrogallol occurs in the presence of SOD, whose activity can be indirectly tested spectrophotometrically. One unit of SOD is defined as the amount of SOD required to inhibit 50% of the auto-oxidation of pyrogallol and the specific activity is reported as SOD units/mg protein.

Glutathione Peroxidase Assay (GSH-Px)

GSH-Px activity was measured by the method of Wendel (1981), using *tert*-butylhydroperoxide as substrate. The decomposition of NADPH was monitored in a spectrophotometer at 340 nm for 4 minutes. The medium contained 2.0 mM GSH, 0.15 U/mL GSH reductase, 0.4 mM azide, 0.5 mM *tert*-butylhydroperoxide and 0.1 mM NADPH. One GSH-Px unit is defined as 1 µmol of NADPH consumed per minute and the specific activity is reported as GSH-Px units/mg of protein.

Protein determination

Protein was measured by the Lowry *et al.* (1951) method, using serum bovine albumin as standard.

Determination of transaminases, urea and creatinine

The measurements of aspartate amino transferase (AST), alanine amino transferase (ALT), urea and creatinine were performed with Liquiform kits (Labtest). Absorbance was determined using a UV-vis Shimadzu spectrophotometer, following the manufacturer's package insert.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the IBM Statistical Package for Social Sciences (SPSS) for Windows, version 20.0, using a PC compatible computer (IBM Corp. Armonk, NY, USA). The Kolmogorov-Smirnov normality test was performed to

confirm a parametric distribution; data were then analyzed by ANOVA, followed by Duncan's *post-hoc* test, when the F-test was significant. Values of p <0.05 were considered significant. Results are expressed as means ± SD for seven independent experiments (animals) performed in duplicate. ***p<0.001, **p<0.01 and *p<0.05, compared to the Duncan's multiple range test.

3 RESULTS

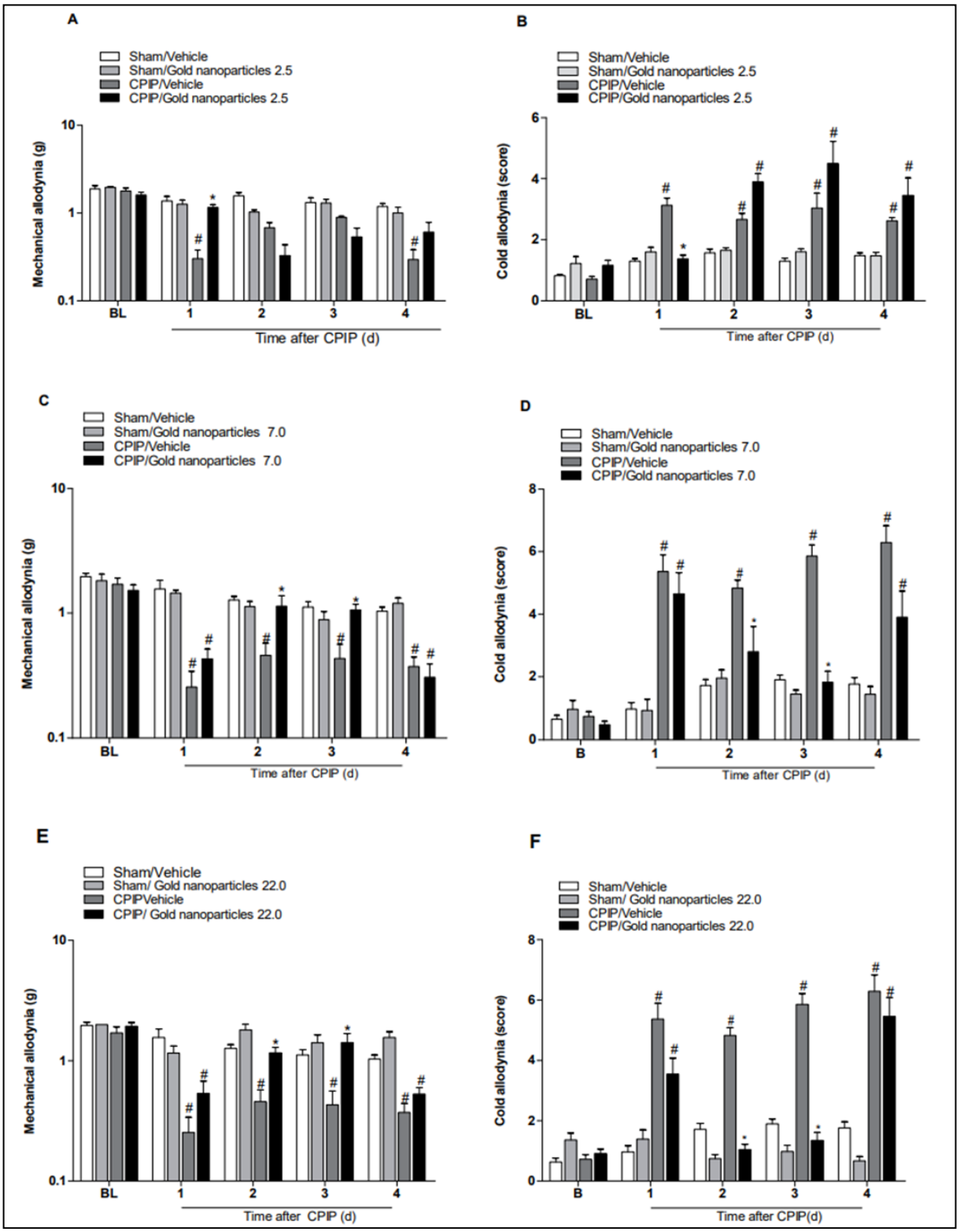
3.1 Effect of the administrations of gold nanoparticles on acute post-ischaemia induced mechanical and cold allodynia

The 2,5 mg/L nanoparticle showed a mechanical anti-allodynia effect within 1 day after treatment compared to the vehicle treated group (Figure 2 A and B). However, the same treatment (0,025 mg/Kg nanoparticle) reduced cold allodynia significantly only in the first day after CDRS -I induction.

The 7.0 mg/L nanoparticle showed a significant mechanical anti-allodynia effect at 2 and 3 days only after treatment compared to the vehicle treated group (Figure 2 C and D) and relevant thermal anti-allodynamic effect in the second and third days in the acute model.

The 22.0 mg/L nanoparticle showed a mechanical and thermal anti-allodynamic effect at 2 and 3 days only after treatment compared to the vehicle-treated group (Figure 2 E and F) in the acute model. However, the same treatment (nanoparticle 7.0 mg / L) did not significantly inhibit mechanical and cold allodynia at 1 and 4 days after treatment compared to the Ischemia / Vehicle group in the animals evaluated that presented this nociception induced by the model of ischemia.

Figure 2 – Effect of the AuNPs with effects of mechanical and thermal allodynia at a concentration of 2,5 mg/L (A and B), at a concentration of 7,0 mg/L (C and D), at a concentration of 22,0 mg/L (E and F) in acute test.



(A, C, E) Effects demonstrated in mechanical allodynia and (B, D, F) effects demonstrated in cold allodynia. Basal (BL) measurements were determined before CPIP-I induction. Each column represents the mean ± SEM of seven mice, except for the cold allodynia graph where data are shown as median ± interquartile range for seven mice. Asterisks denote significance levels. #P <0.05, compared with the sham group; *P <0.05, compared with the CPIP-I group treated with vehicle; two-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test, followed by the Mann-Whitney test.

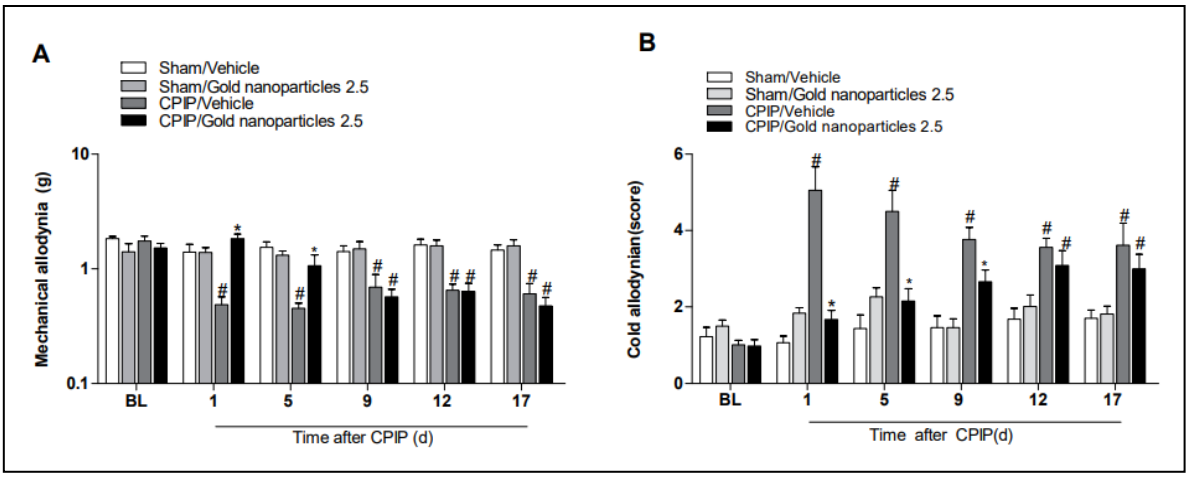
3.2 Effect of the administrations of gold nanoparticles on chronic post-ischaemia induced mechanical and cold allodynia

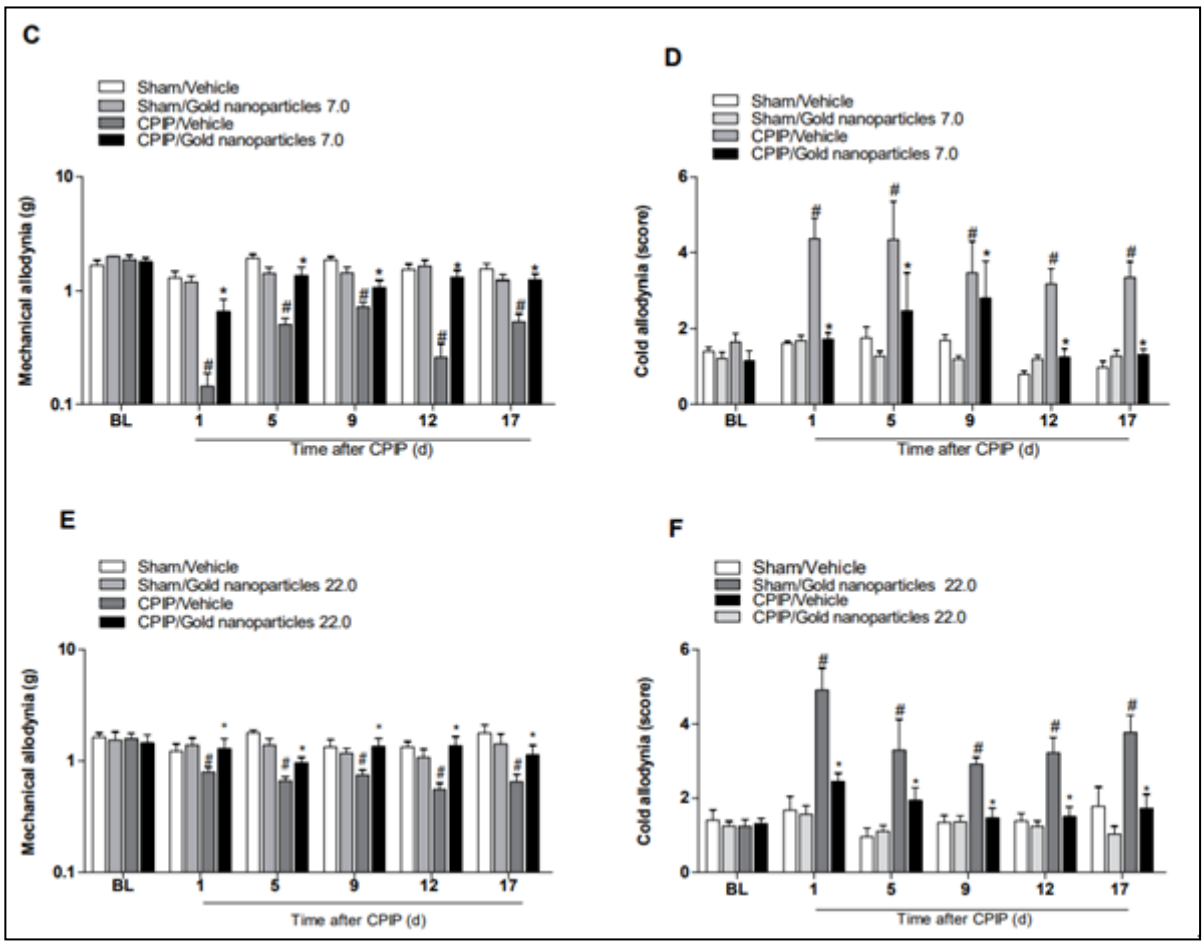
The 2.5mg / L nanoparticle treatment showed a mechanical anti-allodynia effect in 1 to 5 days, and thermal in 1, 5 and 9 days after treatment with the nanoparticle compared to controls (Figure 3 A and B) in the chronic model. However, the same treatment (2.5mg / L nanoparticle) did not significantly inhibit mechanical allodynia on the other days. Still, the same treatment considerably inhibited allodynia to the cold in the periods of 9 to 17 days in the evaluated animals. Cold allodynia was significantly inhibited by GNPs in the 5th and from 9th-17th days of the chronic model.

The 7.0mg /L nanoparticle showed significant mechanical and thermal anti-allodynia effect from 1st -17th day compared to controls (Figure 3 C and D) in the chronic model.

The nanoparticle 22.0mg / L showed mechanical and thermal anti-allodynamic effect from 1 to 17 days after treatment compared to the vehicle treated group (Figure 3 E and F)

Figure 3 - Effect of the AuNPs with effects of mechanical and thermal allodynia at a concentration of 2,5 mg/L (A and B), at a concentration of 7,0 mg/L (C and D), at a concentration of 22,0 mg/L (E and F) in chronic test.



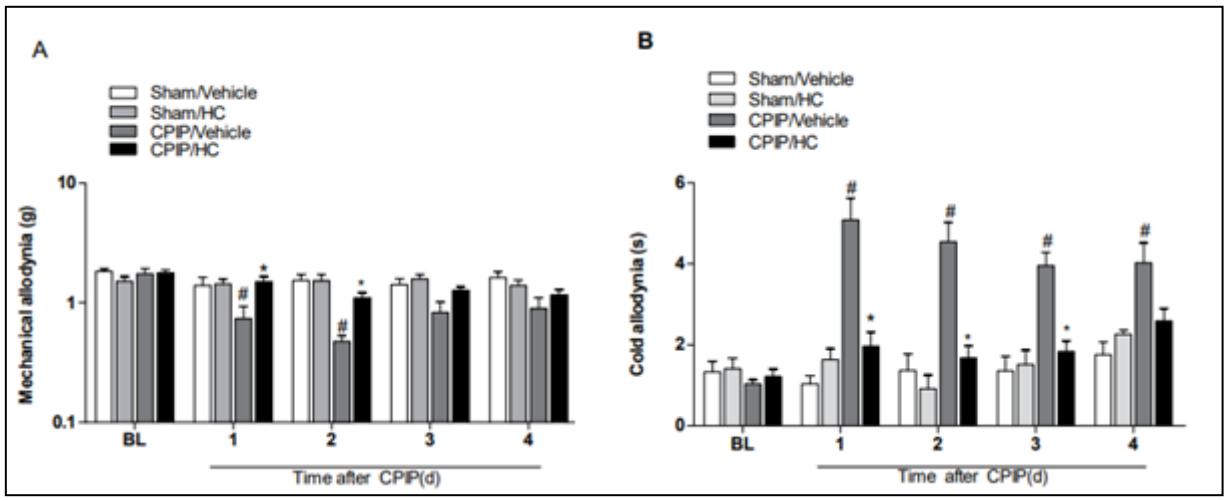


(A, C, E) Effects demonstrated in mechanical allodynia and (B, D, F) effects demonstrated in cold allodynia. Basal (BL) measurements were determined before CPIP-I induction. Each column represents the mean ± SEM of seven mice, except for the cold allodynia graph where data are shown as median ± interquartile range for seven mice. Asterisks denote significance levels. #P <0.05, compared with the sham group; *P <0.05, compared with the CPIP-I group treated with vehicle; two-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test, followed by the Mann-Whitney test.

3.3 Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) channel antagonism reduced acute post-ischaemia induced mechanical and cold allodynia

CRPS-I induced mechanical allodynia was markedly reduced by HC-030031 (300 mg/kg) up to 2 days after the procedure (Figure 4 A). Cold allodynia was significantly reduced up to 3 days by HC-030031 (Figure 4 B).

Figure 4 A and B – Effect of the HC-030031 with effects of mechanical and thermal allodynia.

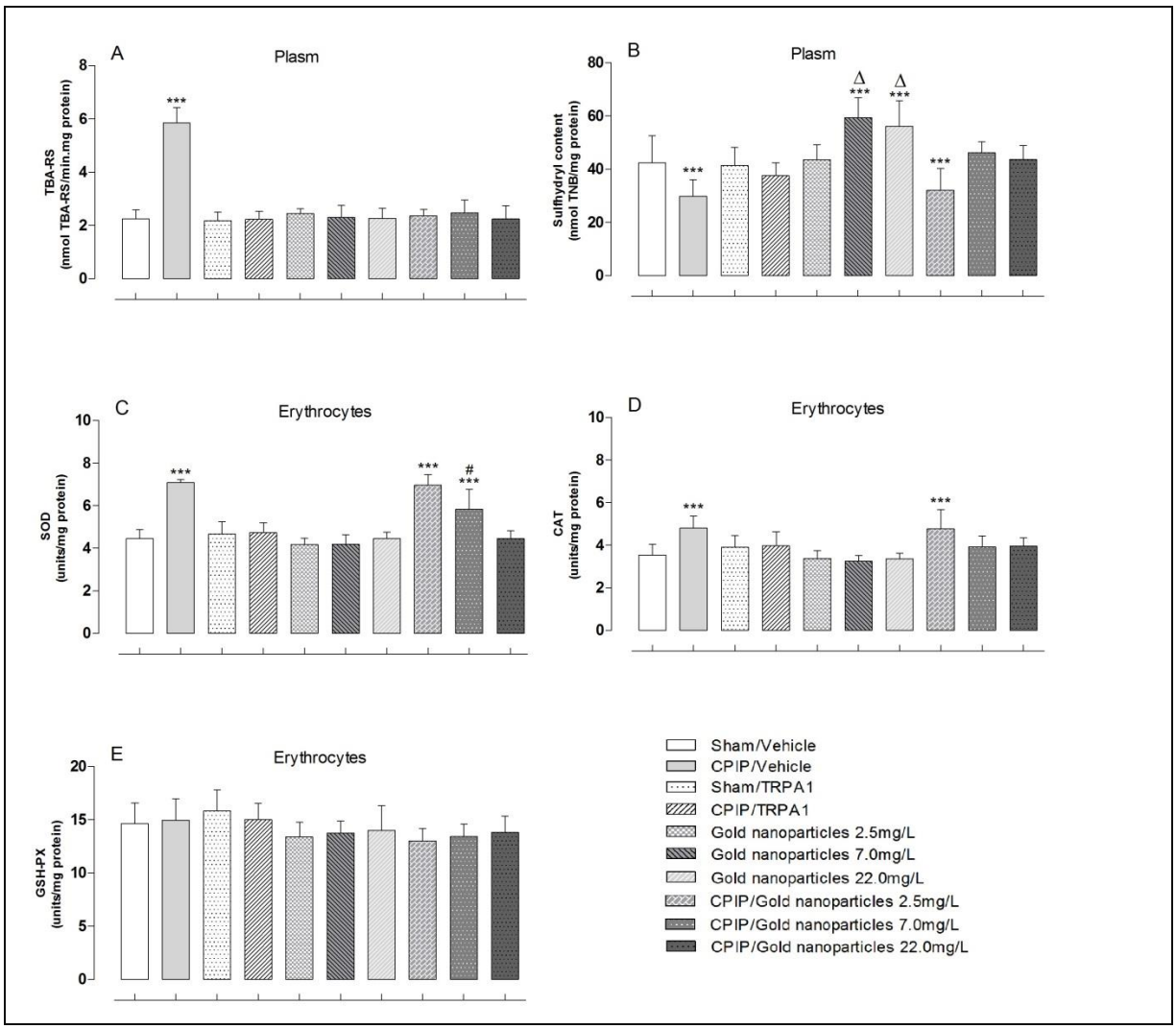


(A) Effects demonstrated in mechanical allodynia and (B) effects demonstrated in cold allodynia. Basal (BL) measurements were determined before CPIP-I induction. Each column represents the mean ± SEM of seven mice, except for the cold allodynia graph where data are shown as median ± interquartile range for seven mice. Asterisks denote significance levels. #P <0.05, compared with the sham group; *P <0.05, compared with the CPIP-I group treated with vehicle; two-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test, followed by the Mann-Whitney test.

3.4 Acute and chronic effect of the administrations of gold nanoparticles and TRPA1 antagonist (HC-030031) on the alterations in the blood oxidative stress parameters

CRPS-I model increased TBA-RS (A) [p<0.001; 161%], reduced total sulfhydryl content (B) [p<0.001;29,8%], increased SOD (C) [p<0.001;59,5%] and CAT (D) [p<0.001; 35,2%] activities and did not alter GSH-Px (E) activity [p>0.05] (Figure 5). *Post hoc* analysis showed that AuNPs and TRPA1 antagonist did not alter the parameters analyzed when compared to the control group, except for total sulfhydryl content (B), which were raised in 40.0 % and 32,4% by AuNPs 7.0 and 22.0 mg/L, respectivelly.

Figure 5 - Acute effect of the administrations of gold nanoparticles and TRPA1 antagonist (HC-030031) on the alterations in the blood oxidative stress parameters

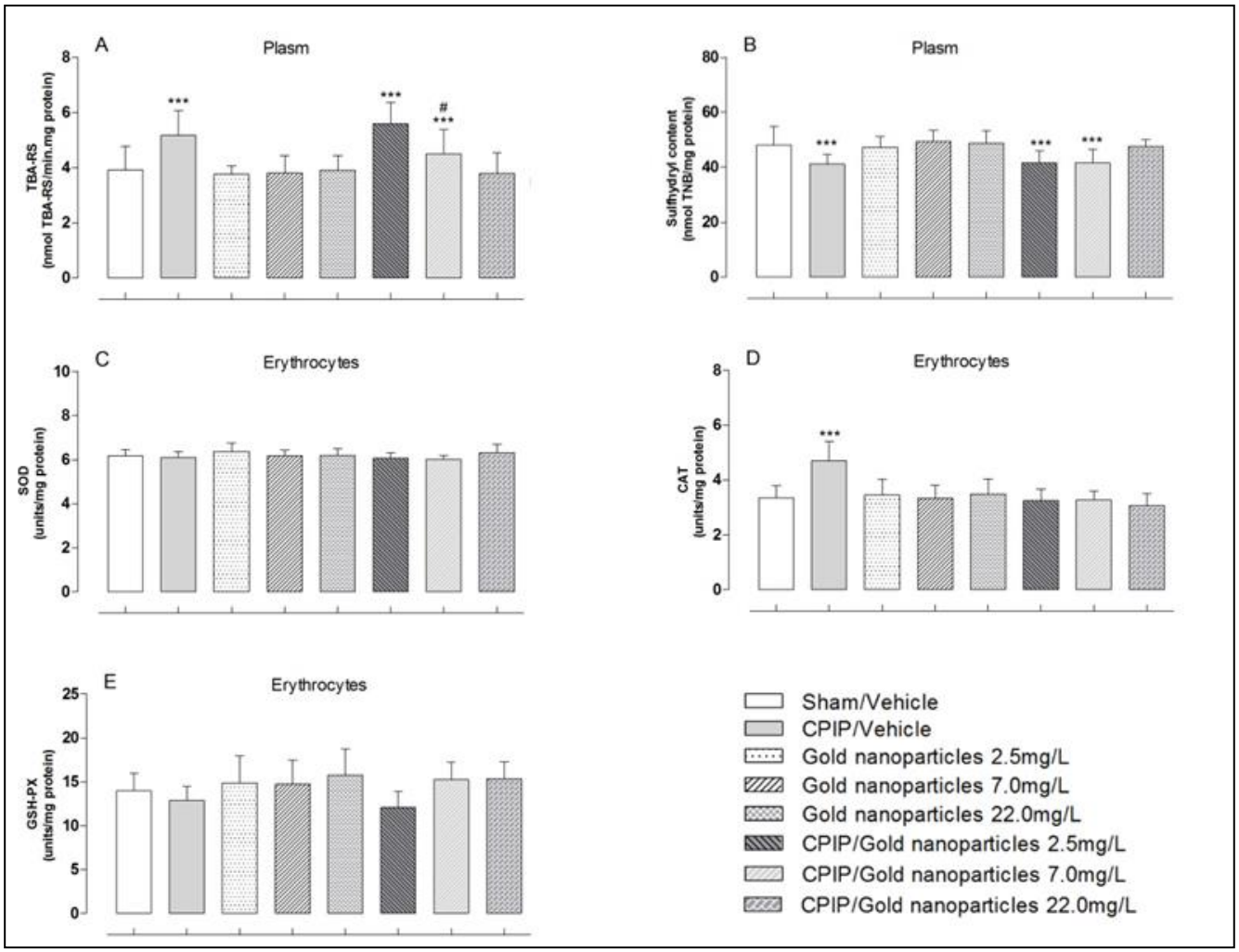


(A) Thiobarbituric acid reactive substances (TBA-RS), (B) sulfhydryl content in the plasm (C) SOD activity (D) CAT activity and (E) GSH-Px activity in the erythrocytes of male *Mus musculus* adult Swiss mice (20 - 30 g, 60 days). Results are expressed as means ± SD (ANOVA and Duncan's multiple range test). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, # partially prevented, Δ Potentiation of the effect.

TRPA1 antagonist reversed the alterations caused by CRPS-I in the parameters of oxidative stress. Moreover, acute administration of AuNPs at concentrations of 2.5, 7.0 and 22.0 mg/L reversed (59.8%, 57.7% and 61.7%, respectively) the increases in TBA-RS levels (Figure 5 A) and at concentrations of 7.0 and 22.0 mg/L reversed (55% and 46.4%) the reduction and isolated increased the sulfhydryl content (40.0% and 32.2%, respectively) (Figure 5 B) and reversed the increase in CAT activity (18.5% and 17.7%, respectively) (Figure 5D). Regarding SOD (Figure 5 C), the administration of AuNPs at concentration of 7.0 mg/L partially reversed (17.8%) and at 22.0 mg/L reversed (37.8%) the increase in the enzyme activity.

Considering the chronic effect of the administrations of AuNPs, Figure 6 shows that the CRPS-I model increased TBA-RS (A) [p<0.001; 32.3%], reduced total sulfhydryl content (B) [p<0.01; 14.2%], increased CAT activity (D) [p<0.001; 40.3%] and did not alter SOD (C) [p>0.05] and GSH-Px (E) [p>0.05] activities. *Post hoc* analysis showed that AuNPs did not alter the parameters analyzed, when compared to the control group. Furthermore, AuNPs at concentration of 7.0 mg/L partially reversed (12.8%) and at 22.0 mg/L totally reversed (26.6%) the increases in TBA-RS levels (Figure 6A), at concentrations of 22.0 mg/L reversed the reduction in sulfhydryl content (15.4%) (Figure 6B) and at all concentrations reversed the increase in CAT activity (31.9%, 30.2% and 34.7%, respectively) (Figure 6D) caused by CRPS-I model in the blood of mice, when compared to the control group.

Figure 6 - Chronic effect of the administrations of gold nanoparticles and TRPA1 antagonist (HC-030031) on the alterations in the blood oxidative stress parameters

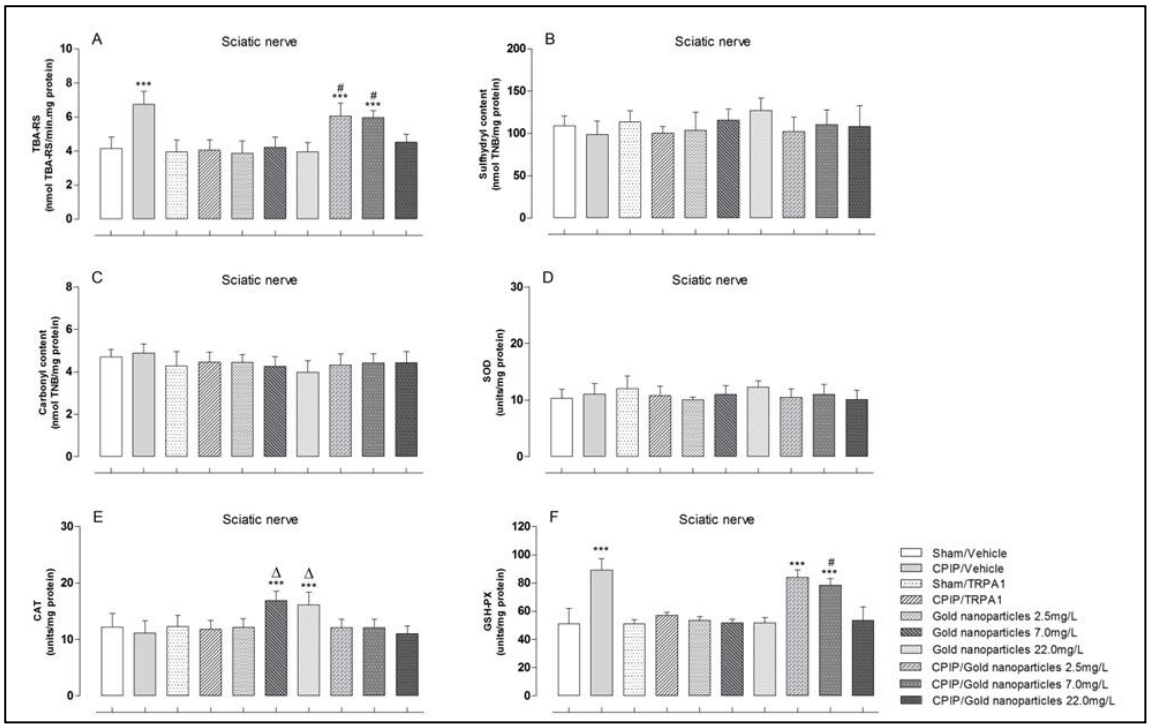


(A) Thiobarbituric acid reactive substances (TBA-RS), (B) sulfhydryl content in the plasm (C) SOD activity (D) CAT activity and (E) GSH-Px activity in the erythrocytes of male *Mus musculus* adult Swiss mice (20 - 30 g, 60 days). Results are expressed as means ± SD (ANOVA and Duncan's multiple range test). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, # partially prevented, Δ Potentiation of the effect.

3.5 Acute and chronic effect of the administrations of gold nanoparticles and TRPA1 antagonist (HC-030031) on the alterations in the sciatic nerve oxidative stress parameters caused by a model of regional complex pain syndrome (CRPS-I).

Figure 7 shows that CRPS-I model increased TBA-RS (A) [p<0.001; 63.4%] and GSH-Px activity (E) [p<0.001; 74.7%] acutely, but did not alter total sulfhydryl content (B) [p>0.05], protein carbonyl content (C) [p>0.05] and the activities of SOD (D) [p>0.05] and CAT (E) [p>0.05] in the sciatic nerve of mice. *Post hoc* analysis showed that AuNPs and TRPA1 antagonist did not alter the parameters analyzed, when compared to the control group, except CAT activity, that AuNPs at concentrations of 7.0 (38.7 %) and 22.0 mg/L (32.6 %) increased. Furthermore, TRPA1 antagonist reversed the alterations caused by CRPS-I in the parameters of oxidative stress. Additionally, AuNPs at concentration of 2.5 (10.4%) and 7.0 mg/L (11.9%) partially reversed and at 22.0 mg/L (32.8%) totally reversed the increases in TBA-RS levels (Figure 7A) and at concentrations of 7.0 mg/L (12.1%) partially reversed and 22.0 mg/L (40.1%) reversed the alteration caused in GSH-Px activity (Figure 7F).

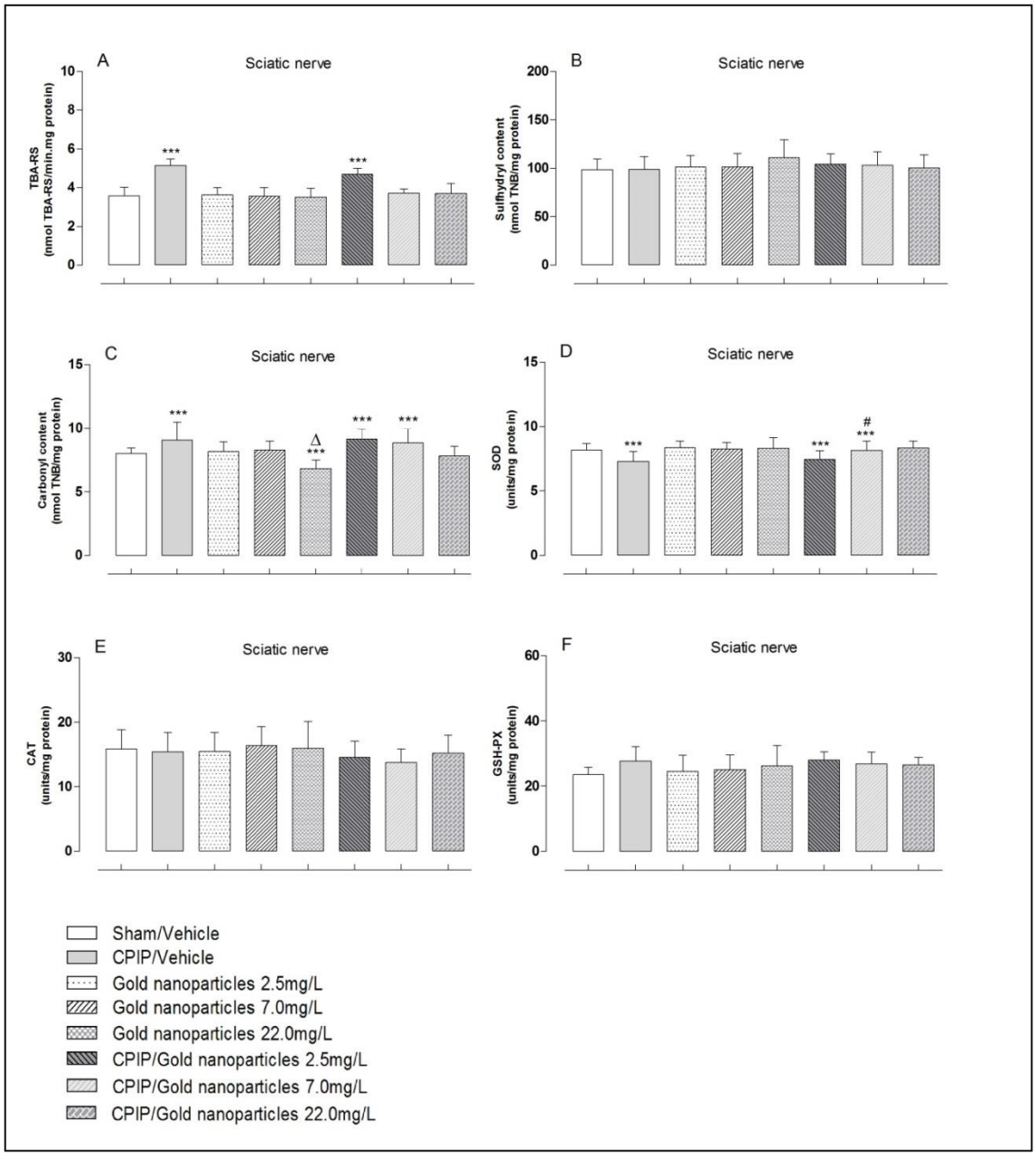
Figure 7 - Acute effect of the administrations of gold nanoparticles and TRPA1 antagonist (HC-030031) on the alterations in the sciatic nerve oxidative stress parameters.



(A) Thiobarbituric acid reactive substances (TBA-RS), (B) sulfhydryl content (C) carbonyl content, (D) SOD activity (E) CAT activity and (F) GSH-Px activity in the sciatic nerve of male *Mus musculus* adult Swiss mice (20 - 30 g, 60 days). Results are expressed as means ± SD (ANOVA and Duncan's multiple range test). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, # partially prevented, Δ Potentiation of the effect.

In order to check the chronic effect of the administrations of AuNPs, Figure 8 shows that CRPS-I model increased TBA-RS (A) [p<0.001; 45.7%] and protein carbonyl content (C) [p<0.05; 13.5%], and reduced SOD activity (D) [p<0.05; 11.0%] in the sciatic nerve of mice. Conversely, did not alter total sulfhydryl content (B) [p>0.05], CAT (E) [p>0.05] and GSH-Px (F) [p>0.05] antioxidant enzymes activities, when compared to the control group. *Post hoc* analysis showed that AuNPs did not alter the parameters analyzed, when compared to the control group, except at 22.0 mg/L decreased protein carbonyl content (15.0%) (Figure 8C).

Figure 8 - Chronic effect of the administrations of gold nanoparticles and TRPA1 antagonist (HC-030031) on the alterations in the sciatic nerve oxidative stress parameters



(A) Thiobarbituric acid reactive substances (TBA-RS), (B) sulfhydryl content (C) carbonyl content, (D) SOD activity (E) CAT activity and (F) GSH-Px activity in the sciatic nerve of male *Mus musculus* adult Swiss mice (20 - 30 g, 60 days). Results are expressed as means ± SD (ANOVA and Duncan's multiple range test). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, # partially prevented, Δ Potentiation of the effect.

Furthermore, AuNPs at concentrations of 7.0 (27.4%) and 22.0 mg/L (27.4%) reversed the increases in TBA-RS levels (Figure 8A) and at concentration of 22.0 mg/L (14.1%) reversed the increases in protein carbonyl content (C) and at 7.0

mg/L partially reversed (11.0%) and 22.0 mg/L totally reversed (14.4%) the decrease in the activity of SOD (Figure 8D).

2.6 Investigation of hepatotoxicity and nephrotoxicity of gold nanoparticles

Finally, we also verified the effect of the administrations of AuNPs (2.5, 7.0 and 22.0 mg/L) on the activity of transaminases (AST and ALT) to assess hepatotoxicity and on urea and creatinine to assess nephrotoxicity in mice. Table 2 (A) and (B) shows that AuNPs in none of the concentrations used altered the activity of AST [p>0.05], ALT [p>0.05], urea [p>0.05] and creatinine [p>0.05].

Table 2 (A)

Grupo (n = 7)	TGO (U/L)	TGP (U/L)
Controle	99,33 ± 9,03	16,90 ± 2,10
AuNPs 2.5 mg/L	79,83 ± 4,68	20,38 ± 1,61
AuNPs 7.0 mg/L	108,00 ± 9,92	17,24 ± 1,23
AuNPs 22.0 mg/L	100,17 ± 6,36	15,80 ± 1,45

(B)

Grupo (n = 7)	Ureia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)
Controle	55,65 ± 2,00	0,29 ± 0,01
AuNPs 2.5 mg/L	52,10 ± 6,31	0,27 ± 0,01
AuNPs 7.0 mg/L	56,25 ± 1,25	0,28 ± 0,01
AuNPs 22.0 mg/L	52,85 ± 1,29	0,30 ± 0,01

4 DISCUSSION

Considering that the efficacy of analgesics available for CRPS-I is not well established and is below expectations, the objective of the present study was to investigate the effect of AuNPs in the acute and chronic phases of an animal model of CRPS-I, on oxidative stress parameters and on the activity of antioxidant enzymes in the blood and sciatic nerve of mice. We also evaluated the acute hepatic and nephrotoxicity of AuNPs in the serum of mice

Literature data show that the ischemia-reperfusion model by application of the tourniquet promotes a state of nociceptive sensory hypersensitivity that lasts up to 4 weeks in rats, allowing acute and chronic evaluation of possible treatments (CODERRE et al, 2004). In the same study, the authors showed that the application of antioxidant compounds 48 hours after the ischemic injury significantly reversed the mechanical allodynia of the animals, showing the contribution of oxidative stress to the installed process.

Subsequently, Coderre & Bennet (2010) deepened the pathophysiological characterization of the model; when installed, CRPS-I is characterized by significant regional edema, which develops due to plasma leakage into the interstitial space, due to increased vascular permeability and the pressure exerted by the accumulation of fluid in the interstitial compresses capillaries of adjacent tissues and it causes a syndrome called compartment, in which capillary flow occlusion occurs.

CRPS-I arises after fractures, sprains, surgery, crushing of deep tissues. In its most severe form, musculoskeletal compartment syndrome leads to ischemia that is sufficient to cause tissue necrosis. Thus, it is possible that the edema created by the period that occurs after the removal of the tourniquet causes a compartment syndrome (Coderre & Bennet, 2010).

The compartment syndrome can cause microvascular injury, since the ischemic tissue accumulates oxidative enzymes, primarily xanthine oxidase and NADPH oxidase. In reperfusion, the accumulated oxidases reduce the molecular oxygen that is returning to the cells and the cells that make up microvessels are exposed to high levels of free radicals that damage both the endothelium and the smooth muscle cells (Coderre & Bennet, 2010). The ischemia-reperfusion injury is a multifactorial phenomenon that involves several mechanisms that affect arterioles, capillaries and venules (Coderre & Bennet, 2010).

Tang et al (2017) verified the applicability of the model in mice and, through the application of the tourniquet, observed the development of edema in both males and females and installation of the CRPS-I condition at 3 days after reperfusion in males and two after in females. Allodynia was associated with increased serum levels of interleukin-2, TNF-alpha and various isoprostanoids and malondialdehyde, showing the involvement of inflammation and oxidative stress in the process (Tang et al, 2017). Similar to the findings by Coderre et al (2004), there was the development of edema in males and females, mechanical allodynia, an increase in pro-

inflammatory cytokines (interleukin-2 and TNF-alpha) and a fall in interleukin-4 (which is anti-inflammatory). Together, the studies suggest that CRPS-I is due to mechanisms involving the consequences of ischemic injury, which causes release of cytokines, inflammation and oxidative stress, resulting in acute and chronic pain.

De PRÁ et al (2019) showed that in the acute phase of the ischemia-reperfusion model, edema, temperature increase and myeloperoxidase and n-acetylglucosaminidase enzymes occur, indicating neutrophilic and monocytic infiltration in the first hours after induction. In that same work, indomethacin and dexamethasone, which are anti-inflammatory, attenuated thermal and mechanical allodynia. However, in the long term, it is the anticonvulsants and antidepressants that are used in the management of neuropathic pain. Thus, 17 days after the induction of CRPS-I, pregabalin was effective in attenuating thermal and mechanical allodynia and amitriptyline, only mechanical allodynia. Therefore, the progression to the chronic phase of CRPS is marked by neuropathy with symptoms of hypersensitivity to pain, which is probably maintained by central sensitization to sensory processing. The authors also showed in this study that, in the chronic phase, calcium channel blocking compounds and TRPA1 receptor antagonists reduced thermal and mechanical allodynia after induction of ischemia-reperfusion. Thus, the chronic phase depends on the changes in excitability that occur in the long term after nerve damage, and not on the inflammatory response.

In our study, the analgesic effect of AuNPs was maintained until the 17th day, even with the interruption of administration on the 4th. Thus, it is possible that the greater permanence of AuNPs in the intracellular environment may have exerted function modulations in the long term that possibly have contributed to minimizing ischemic damage to the limb.

There was a similar tendency for analgesia between the mechanical allodynia test and the cold test. TRPA1 receptors participate in sensory signaling mediated by primary afferent fibers for the perception of cold (KOIVISTO et al, 2018). Therefore, it is understandable that after the ischemic nerve injury, a state of greater sensitivity to this form of thermal perception is triggered. Therefore, blocking TRPA1 receptors with HC-030031 antagonist was significantly effective.

HC-030031 is a competitive TRPA1 receptor antagonist that has been studied in pain models such as Eid et al (2008) and Koivisto et al (2018), more precisely in its

ability to attenuate mechanical and cold allodynia through the process of ischemia / reperfusion in mice (De Prá et al., 2019) and in rats (Klafke et al., 2016).

According to Gupta et al (2016), the antagonist response behaves differently according to the species studied, showing promising results in humans and rodents, but not inhibitory in frogs and zebra fish, suggesting that small changes in the amino acid sequence are responsible for different sensitivities of the receptor to the HC antagonist.

Altogether, the studies indicated show that modulation of TRPA1 receptors through antagonism with HC-030031 at a pre-clinical level can be an important target for the alleviation of thermal and mechanical neuropathic pain.

In view of the nature of the damage induced by the CRPS-I, there is a direct involvement of oxidative stress, which can contribute significantly to the progression of the damage caused by the model.

Considering the biochemical parameters, it is noticed the intense involvement of oxidative stress in the induction of CRPS-I, since animals that suffered ischemia presented significant elevation of TBA-RS in the sciatic nerve and in the plasma, reduction in the total sulfhydryl content in the increased protein carbonylation in the sciatic nerve, indicating that oxidative stress was not limited to the injured nerve.

AuNPs were effective in attenuating lipid peroxidation, since the three concentrations employed reversed the levels of TBA-RS in plasma, while in the sciatic nerve, the concentrations of 7.0 and 22.0 mg/L significantly reversed this parameter, to the point the higher dose resembles the level of control animals, preventing intensely and relevantly neural damage.

Regarding the total sulfhydryl content, albumin is the most abundant source of SH groups in plasma, which can be oxidized by reactive oxygen species (ROS), increasing oxidative tone (VAN DIJK et al., 2020). AuNPs at concentrations of 7.0 and 22.0 mg/L completely reversed the fall of SH groups in plasma and at the concentration of 22.0 mg/L reduced protein carbonylation and reversed the increases in protein carbonyl content observed in the sciatic nerve, indicating the intensity of the effect antioxidant protector.

There were no changes in the activity of CAT and SOD enzymes in the sciatic nerve, but it was observed for GSH-Px, which increased significantly in animals that underwent CRPS-I induction. Guedes et al. (2009) found an increase in GSH-Px activity after sciatic nerve transection and Zoheb et al. (2019) highlight the lack of

GSH-Px activity as a predisposing factor for diabetic neuropathy, highlighting the essentiality of this enzyme as a protective element against ROS and subsequent neural damage, corroborating the finding of the present study in the ischemia-reperfusion model. The higher concentration of AuNPs reversed GSH-Px activity, contributing to pain relief due to the prevention of neural oxidative damage.

In erythrocytes, the CRPS-I model significantly increased the activity of CAT and SOD, but did not alter the activity of GSH-Px. The administration of AuNPs at concentrations of 7.0 mg/L and 22.0 mg/L reversed CAT activity. AuNPs (7.0 mg/L) partially and (22.0 mg/L) completely reversed SOD activity. TRPA1 antagonist reversed the alterations caused by CRPS-I in the parameters of oxidative stress.

It is noticed, again, that the intensity of changes in these parameters reflects the changes needed to counteract the oxidative stress caused by ischemia. In the study by Ryu et al. (2010), which induced CRPS-I by the ischemia-reperfusion model, the administration of allopurinol and SOD resulted in a decrease in mechanical allodynia by reducing the phosphorylation of subunits of NDMA receptors to glutamate. Allopurinol works by blocking xanthine oxidase, resulting in less superoxide production, whereas SOD, by preventing the formation of peroxynitrite, both resulted in less central sensitization, attenuating the increase in nociceptive sensory processing.

The hypothesis of the involvement of oxidative stress in the pathophysiology of CRPS-I is supported by several other findings: Eisenberg et al. (2008) found an increase in TBA-RS, SOD and GSH-Px activity in the serum and saliva of patients with this condition, while Coderre et al. (2004) detected an increase in TBA-RS in the musculature of the hind paw of rats that underwent induction of CRPS that was susceptible to reduction with antioxidant treatment. As mitochondria's are the main sources of ROS, it is reasonable to consider that their dysfunctions linked to oxidative stress may have an important role in the pathogenesis of CRPS-I. However, a better understanding is needed about whether this variable is a cause or consequence of CRPS-I.

According to Sul et al. (2010), bimetallic gold nanoparticles are effective in extinguishing ROS, such as hydrogen peroxide and superoxide anion, by mediating redox reactions. In an experimental model of collagen application arthritis in rats, Kirdaite et al. (2019) found recovery of CAT activity in the serum of animals treated with AuNPs, while Dkhil et al. (2015) observed recovery of GSH-Px activity in the

liver of mice infected with schistosomiasis. Thus, it is possible that AuNPs act either directly on ROS or that they influence the activity or expression of the enzymes involved in their neutralization.

After the administration of AuNPs in the period considered, it was observed that none of the concentrations caused significant changes in blood transaminases, neither in urea or creatinine. Thus, the data indicate that AuNPs did not promote hepatotoxicity and relevant nephrotoxicity in the short term.

Although liver and kidney changes were not observed in the present study, in the study by Chen et al. (2009), the application of AuNPs with size between 8-37 nm at a dose of 8 mg/kg intraperitoneally once a week, a severe picture of liver disease was observed in mice. Structural changes were also observed in the animals 'lungs and spleen, in addition to the presence of AuNPs in the animals' liver by microscopic analysis.

The work of Lopez-Chavez et al. (2017) evaluated the toxicity of AuNPs with dimensions of 10, 30 and 60 nm in rats for nine days intraperitoneally and found that the dimensions directly influenced the degree of intracellular distribution, with more deleterious effects with the smaller nanoparticles, which caused an increase in the production of free radicals and ROS. Abdelhalim and Moussa (2013) found that the intraperitoneal application of 50 microliters of AuNPs with dimensions of 10 and 50 nm for three days was sufficient to cause a significant elevation of TGO for the smallest AuNPs. The application caused an increase in creatinine and urea in the blood of rats, but without statistical significance.

In contrast, in the study by Bailly et al. (2019), the application of a single dose (1 mg/kg) intravenous of AuNPs synthesized with laser and coated with dextran polymer, despite having accumulated in the liver and spleen, did not result in liver or renal toxicity, investigated by biochemical parameters and histological, in addition to not having compromised the general behavior of the animals.

In the study by Isoda et al. (2020), liver and renal toxicity of AuNPs 10, 50 and 100 nm in diameter were evaluated. No degree of toxicity was found when AuNPs were administered alone intravenously (4 mg/kg).

In addition to the possibility of isolated damage, it is still necessary to study the interactions that AuNPs may have with other compounds in the body. Durán et al. (2019) complement that the interactions between nanomaterials with cells, animals, humans and the environment are extremely complex, given that the particle size and

its surface area, morphology, composition, surface chemistry, state of agglomeration/aggregation critically influence the determination of the dose of nanoparticles and, consequently, the precise assessment of their toxicity.

In the present study, no relevant toxicity was found, which may be associated with factors such as the composition, size, shape and type of nanoparticle.

The exposed results indicate that AuNPs have significant thermal and mechanical antiallodynic effects both in the acute and in the chronic test, generating emphasis on the concentration of 2.5 mg/L, suggesting a potential ability to decrease the perception of pain. There is also an important involvement of oxidative stress in the acute and chronic phase of CRPS-I, and AuNPs have antioxidant activity, especially in concentrations of 7.0 mg/L and 22.0 mg/L. Thus, it is possible that treatment strategies can focus on these markers.

It should also be noted that more studies are needed to corroborate the promising results obtained so far, aiming at the development of better therapeutic alternatives for diseases such as CRPS-I.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflicts of interests regarding the publication of this paper.

Acknowledgements

This work was supported by grants from Universidade da Região de Joinville (UNIVILLE).

5 REFERENCES

ABDELHALIM, M. A.; MOUSSA, A. A. The gold nanoparticle size and exposure duration effect on the liver and kidney function of rats: In vivo. Saudi Journal of Biological Sciences, v. 20, n. 2, p. 177-181. Disponivel em https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1319562X13000119. Acesso em 02 fev. 2020. Doi 10.1016/j.sjbs.2013.01.007.

AEBI, H. Catalase in vitro. Methods in Enzimology, v. 105, p. 121-126, 1984. Doi 10.1016/s0076-6879(84)05016-3.

AKSENOV, M. Y.; MARKESBERY, W. R. Changes in thiol contente and expression of glutatione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. Neuroscience Letters, v. 302, p. 141-145, 2001.

BAILLY, A. et al. In vivo evaluation of safety, biodistribution and pharmacokinetics of laser-synthesized gold nanoparticles. Nature Scientific Reports, v. 9, p. 12890. Disponível em https://www.nature.com/articles/s41598-019-48748-3. Acesso em 02 fev. 2021. Doi 10.1038/s41598-019-48748-3.

BIRKLEIN, F; DIMOVA, V. Complex regional pain syndrome–up-to-date. PAIN Reports: November/December 2017 - Volume 2 - Issue 6 - p e624.

BORTAGARAY, S. et al. Métodos de diagnóstico e tratamento da síndrome da dor regional complexa: uma revisão integrativa da literatura. BrJP vol.2 no.4 São Paulo Oct./Dec. 2019 Epub Dec 02, 2019.

CHEN, Y. et al. Assessment of the in vivo toxicity of gold nanoparticles. Nanoscale Research Letters, v. 4, p. 858-864, 2009. Doi 10.1007/s11671-009-9334-6.

CHEN, H; DORRIGAN, A; SAAD, S; HARE, D. J; CORTIE, M. B; VALENZUELA, S. M. In vivo study of spherical gold nanoparticles: inflammatory effects and distribution in mice. PLoSOne. 2013; 8(2): e58208.

CODERRE, T. J.; XANTHOS, D. N.; FRANCIS, L.; BENNETT, G. J. Chronic post-ischemia pain (CPIP): a novel animal model of complex regional pain syndrome-type I (CRPS-I; reflex sympathetic dystrophy) produced by prolonged hindpaw ischemia and reperfusion in the rat. Pain, v. 112, p. 94-105, 2004. Doi: 10.1016/j.pain.2004.08.001.

CODERRE T J, BENNETT G J. A Hypothesis for the Cause of Complex Regional Pain Syndrome - Type I (Reflex Sympathetic Dystrophy): Pain Due to Deep-Tissue Microvascular Pathology. Pain Med. 2010; 11(8): 1224–1238.

DE PRÁ et al.; Nociceptive mechanisms involved in the acute and chronic phases of a complex regional pain syndrome type 1 model in mice. Eur J Pharmacol. 2019 Sep 15;859:172555.

DKHIL, M. A.; BAOUMY, A. A.; DIAB, M. S. M.; AL-QURAISHY, S. Antioxidant and hepatoprotective role of gold nanoparticles against murine hepatic schistosomiasis.

International Journal of Nanomedicine, v. 10, p. 7647-7475, 2015. Doi: 10.2147/IJN.S97622.

DIXON, W. J. Efficient analysis of experimental observations. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 1980; 20:441–62.

DURAN, N. et al. Nanotoxicologia de nanopartículas de prata: toxicidade em animais e humanos. Química Nova, v.42, n. 2, p. 206-213, 2019. Disponível emhttp://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010040422019000200206&lng=en&nrm=iso. Acesso em 02 fev. 2021. Doi 10.21577/0100-4042.20170318.

EISENBERG, E.; SHTAHL, S.; GEELER, R.; REZNICK, A. Z.; SHARF, O.; RAVBINOVICH, M.; ERENREICH, A.; NAGLER, R. M. Serum and salivary oxidative analysis in Complex Regional Pain Syndrome. Pain, v. 138, n. 1, p. 226-232, 2008. Doi: 10.1016/j.pain.2008.04.019.

ELY, L. S. ENGROFF, P.; GUISELLI, S. R.; CARDOSO, G. C.; MORRONE, F. B.; CARLI, G. A. Uso de anti-inflamatórios e analgésicos por uma população de idosos atendida na Estratégia Saúde da Família. Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia, v. 18, n. 3, p. 475-485, 2015. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1809982320150003004 75&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 23 set. 2020. Doi: 10.1590/1809-9823.2015.14141

GIERTHMUHLEN, J.; BINDER, A.; BARON, R. Mechanism-based treatment in complex regional pain syndromes. Nature Reviews Neurology, v. 10, p. 518-528, 2014.

GUEDES, R. P; DAL BOSCO, L.; ARAÚJO, A. S.; BELLÓ-KLEIN, A.; RIBEIRO, M. F.; PARTATA, W. A. Sciatic nerve transection increases gluthatione antioxidant system activity and neuronal nitric oxide synthase expression in the spinal cord. Brain Research Bulletin, v. 80, n. 6, p. 422-427, 2009. Doi: 10.1016/j.brainresbull.2009.08.007.

ISODA, K. et al. Toxicity of gold nanoparticles in mice due to nanoparticle/drug interaction induces acute kidney damage. Nanoscale Research Letters, v. 15, p. 141-149, 2020. Disponível em https://link.springer.com/article/10.1186/s11671-020-03371-4. Acesso em 02 fev. 2021. Doi 10.1186/s11671-020-03371-4.

KIRDAITE, G.; LEONAVICIENE, L.; BRADUNAITE, R.; VASILIAUSKAS, A.; RUDYS, R.; RAMANAVICIENE, A.; MACKIEWICZ, Z. Antioxidant effects of gold nanoparticles on early stage of collagen-induced arthritis in rats. Research in Veterinary Science, v. 124, p. 32-37, 2019. Doi: 10.1016/j.rvsc.2019.02.002.

KLAFKE, J. Z.; SILVA, M. A.; ROSSATO, M. F.; PRÁ, S. D.; RIGO, F.; WALKER, C. I. B.; BOCHI, G. V.; MORESCO, R. N.; FERREIRA, J. B.; TREVISAN, G. Acute and chronic nociceptive phases observed in a rat hind paw ischemia/reperfusion model depend on different mechanisms. European Journal of Physiology, v. 468, n. 2, p. 229-234, 2016.

KOIVISTO, A. et al. TRPA1 Antagonists for Pain Relief. Pharmaceuticals 2018, 11, 117;

LIMA, A. B. et al. Hypolipemiant and antioxidant effects of Eugenia brasiliensis in an animal model of coconut oil-induced hypertriglyceridemia. Biomedicine & Pharmacotherapy 96 (2017) 642–649.

LOPEZ-CHAVEZ, C. et al. Gold nanoparticles: distribution, bioaccumulation and toxicity. In vitro and in vivo studies. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine, v. 14, n. 1, p. 1-12, 2017. Disponível em https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1549963417301582. Acesso em 02 fev. 2021. Doi: 10.1016/j.nano.2017.08.011.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N.; FARR, A. L.; RANDALL, R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry, v. 193, p. 265-267, 1951.

OLIVEIRA JUNIOR, J. O.; CORREA, C. F.; FERREIRA, J. A. Tratamento invasivo para o controle da dor neuropática. Revista Dor, v. 17, supl. 1, p. 98-106, 2016. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S180600132016000500098&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 23 set. 2020. Doi: 10.5935/1806-0013.20160059

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Analytical Biochemistry, v. 95, p. 351-358, 1979.

OLIVEIRA, R. M.; LEITE, A. C. S.; SILVA, L. M. S.; ALMEIDA, P. C.; OLIVEIRA, S. K. P.; CHAVES, A. C. P. Análise comparativa da capacidade funcional entre mulheres com fibromialgia e lombalgia. Revista Dor, v. 14, n. 1, p. 39-43, 2013. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S180600132013000100010&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 23 set. 2020. Doi: 10.1590/S1806-00132013000100010.

MARKLUND, S. L. Pyrogallol autoxidation. In: GREENWALD, R. A. Handbook of methods for oxygen radical research. Boca Raton: CRC Press, 1985, p. 243-247.

NEUMEISTER, M. W; ROMANELLI, M. R. Complex Regional Pain Syndrome. Neumeister, Síndrome complexa de dor regional. Clínicas em Cirurgia Plástica. doi: 10.1016 / j.cps.2019.12.009 , 2020.

REZNICK, A. Z.; PACKER, L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay, Methods in Enzimology, v. 233, p. 357-363, 1994. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8015470/>. Acesso em 24 set. 2020. Doi: 10.1016/s0076-6879(94)33041-7.

RYU, T. H.; JUNG, K. Y.; HA, M. J.; KWAK, K. H.; LIM, D. G.; HONG, J. G. Superoxide and nitric oxide involvement in enhancing of n-methyl-d-aspartate receptor-mediated central sensitization in the chronic post-ischemia pain model. Korean Journal of Pain, v. 23, n. 1, p. 1-10, 2010. Doi: 10.3344/kjp.2010.23.1.1.

ROSSATO, M. F; TREVISAN, G; WALKER, C. I. B; KLAFKE, J. Z; DE OLIVEIRA, A. P, VILLARINHO, J. G, et al. Eriodictyol: a flavonoid antagonist of the TRPV1 receptor with antioxidant activity. Biochem Pharmacol. 2011; 15;81(4):544–51.

SILVA, M. A.; FIGUEIRA, P. J.; SILVA, V. B.; BOAVENTURA, S. B.; MARQUES, E.; BRANCO, P. S. Síndrome dolorosa regional complexa do tipo I: da prevenção ao tratamento. Revista Portuguesa de Ortopedia e Traumatologia, v. 26, n. 1, p. 30-42, 2018. Disponível em <http://www.scielo.mec.pt/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S164621222018000100004&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em 24 set. 2020.

SUL, O.; KIM, J. C.; KYUNG, T. W; KIM, H. J.; KIM, Y. Y.; KIM, S. H.; KIM, J. S.; CHOI, H. S. Gold nanoparticles inhibited the receptor activator of nuclear fator-κB ligand (RANKL)-induced osteoclast formation by acting as an antioxidante. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, v. 74, n. 11, p. 2209-2213, 2010.

TANG, C. et al. Sex differences in complex regional pain syndrome type I (CRPS-I) in mice. Journal of pain research, v. 10, p. 1811-1819, 2017.

TREVISAN, G; ROSSATO, M. F; WALKER, C. I. B; KLAFKE, J. Z; ROSA, F; OLIVEIRA, S. M, et al. Identification of the plant steroid α-spinasterol as a novel transient receptor potential vanilloid 1 antagonist with antinociceptive properties. J Pharmacol Exp Ther. 2012; 343(2):258–69.

TURKEVICH, J; STEVENSON, P. C; HILLIER, J. “A Study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold”, Discussions of the Faraday Society, Vol. 11, 1951, pp. 55-75.

ZOHEB, M.; PARVEEN, Z.; AFREEN, A.; SIDDIQUI, S.; YOUSRA, T.; MUSTAFAVI, S.; MOHIUDDIN, M.; ISHAQ, M. Role of glutathione peroxidase [GPx] in peripheral neuropathy: a critical update on clinical and experimental studies. International Journal of Research and Review, v. 6, n. 12, p. 360-364, 2019.

VAN DIJK, P. R.; PASCH, A.; VAN OCKENBURG-BRUNET, S. L.; WAANDERS, F.; ABDULLE, A. E.; MUIS, M. J.; HILLEBRANDS, J. L.; BILO, H. J. G.; VAN GOOR, H. Thiols as markers of redox status in type 1 diabetes mellitus. Therapeutic Advances in Endocrinology and Metabolism, v. 6, n. 47, p. 3246-3251, 2020. Doi: 10.1177/2042018820903641.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. Methods in Enzimology, v. 77, p. 325-333, 1981.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo utilizou o modelo de dor da SDCR-I em camundongos, levando a um quadro de nocicepção, com poucas alterações no animal, como a perda de peso e alterações locomotoras.

No ensaio agudo, AuNPs apresentaram resultados significativos em efeito anti-alodínico térmico e mecânico no dia 1 (dose de 0,025 mg/kg), dias 2 e 3 (doses de 0,07 e 0,22 mg/kg). No ensaio crônico, as AuNPs apresentaram efeitos significantes para alodinia mecânica nos dias 1 e 5 (dose de 0,025 mg/kg) e térmico foi percebido nos dias 1, 5 e 9 (dose de 0,025 mg/kg).

Em relação as doses de 0,07 e 0,22 mg/kg, os dias 1, 5, 9, 12 e 17 foram estatisticamente significativos para efeitos anti-alodínicos térmicos e mecânicos.

Em relação ao estresse oxidativo, o modelo de SDCR promoveu elevação significativa dos níveis de TBA-RS no nervo ciático e no plasma dos animais, os quais foram significativamente reduzidos pelas AuNPs (doses de 0,07 e 0,22 mg/kg). O nível de SH sofreu decréscimo significativo no plasma dos animais que passaram por isquemia e essa diminuição foi significativamente revertida pelas AuNPs (doses de 0,07 e 0,22 mg/kg). Elevações estatisticamente significativas da atividade da CAT e da SOD foram observadas nos animais que passaram pela indução de SDCR e essas alterações foram relevantemente atenuadas pelo tratamento com as AuNPs (doses de 0,07 e 0,22 mg/kg).

Esses resultados indicam que há envolvimento importante do estresse oxidativo na instalação e manutenção da SDCR, assim, é possível que estratégias de tratamento possam voltar-se para esses marcadores.

Em relação a toxicidade, os dados encontrados permitem inferir que as AuNPs, em tratamento de curto prazo, não são promotoras significativas de hepato ou nefrotoxicidade, sendo bem toleradas nesse sentido no que tange a segurança de seu uso no tratamento de dor nesse prazo. É possível que períodos mais longos de tratamento impliquem em perfil diferente de toxicidade, o que pode motivar outros estudos, assim como investigações de toxicidade ligada a mutagênese, carcinogênese e teratogênese, que são imprescindíveis na triagem de efeitos adversos de novos compostos com atividade biológica.

Ressalta-se ainda que, mais estudos se fazem necessários para corroborar com os resultados promissores obtidos até aqui, almejando o desenvolvimento de melhores alternativas terapêuticas para doenças como a SDCR.

REFERÊNCIAS

AEBI, H. Catalase in Vitro. Methods Enzymol. 1984; 105: 121-126.

AKSENOV, M. Y; MARKESBERY, W. R. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. Neurosci Lett. 2001; 302: 141–145.

ALVES, J. E. O, et al. Mecanismos fisiopatológicos da nocicepção e bases da analgesia perioperatória em pequenos animais. Acta Biomedica Brasiliensia / Volume 8/ nº 1/ Julho de 2017.

ANDERSSON DA, Gentry C, Moss S, Bevan S. Transient receptor potential A1 is a sensory receptor for multiple products of oxidative stress. J Neurosci 28: 2485–2494, 2008. doi:10.1523/JNEUROSCI.5369-07.2008

ANDRADE JÚNIOR, D. R. DE et al. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. Jornal Brasileiro de Pneumologia, v. 31, n. 1, p. 60–68, 2005.

ANTONIAZZI, C. T. D., et al. opical treatment with a transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) antagonist reduced nociception and inflammation in a thermal lesion model in rats. European Journal of Pharmaceutical Science. Volume 125, 1 December 2018, Pages 28-38

ARTIOLI, D. P et al. phyTratamento fisioterapêutico na síndrome complexa de dor regional tipo I. Relato de caso. Rev Bras Clin Med. São Paulo, 2011 jan-fev;9(1):83-6

BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: Conceito, implicações e fatores modulatórios. Revista de Nutrição, v. 23, n. 4, p. 629–643, 2010.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. Quimica Nova, v. 29, n. 1, p. 113–123, 2006.

BARROS, P. P. et al. Lycopene and resveratrol pretreatment did not interfere with the liver of hepatectomized rats. Acta Cirúrgica Brasileira, v. 32, n. 3, p. 194–202, 2017.

BARROS, W. M. Prejuízo cognitivo-emocional de camundongos submetidos ao modelo da síndrome da dor complexa regional tipo I. Dissertação (Mestrado em Neurociências) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.

BEAL, D. J., COHEN, R. R., BURKE, M. J., & MCLENDON, C. L. Cohesion and performance in groups: A Meta-analytic clarification of construct relations. Journal of Applied Psychology , 88(6), 989-1004, 2003.

BEDÊ, P. M. Produção e caracterização de nanopartículas polimérico-magnéticas para utilização biomédica. Dissertação (Mestrado) - Instituto Militar de Engenharia. 73 p. 2010.

BESSAC BF, Sivula M, von Hehn CA, Escalera J, Cohn L, Jordt SE. TRPA1 is a major oxidant sensor in murine airway sensory neurons. J Clin Invest 118: 1899–1910, 2008. doi:10.1172/JCI34192.

BIRBEN, E, et al. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. World Allergy Organ J 5, 9–19 (2012).

BIRKLEIN, F; DIMOVA, V. Complex regional pain syndrome–up-to-date. PAIN Reports: November/December 2017 - Volume 2 - Issue 6 - p e624.

BORTAGARAY, S. et al. Métodos de diagnóstico e tratamento da síndrome da dor regional complexa: uma revisão integrativa da literatura. BrJP vol.2 no.4 São Paulo Oct./Dec. 2019 Epub Dec 02, 2019

BRASIL. Fundacentro. NANOREG lança repositório de dados e disponibiliza relatório final sobre os efeitos dos nanomateriais na saúde humana e meio ambiente, 2018. Disponível em: <https://www.gov.br/fundacentro/pt-br/acesso-a-informacao/acoes-e-programas/nanotecnologia

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. Portaria Nº 3.459, de 26 de julho de 2019. Institui a Iniciativa Brasileira de Nanotecnologia, como principal programa estratégico para incentivo da Nanotecnologia no país.Brasília, 2019. Disponível em: < https://www.in.gov.br/web/dou/-/portaria-n-3.459-de-26-de-julho-de-2019-209514505>.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. Portaria interministerial Nº 510, de 9 de julho de 2012. Institui Comitê Interministerial de Nanotecnologias – CIN. Brasília, 2012. Disponível em: <

http://www.lex.com.br/legis_23491756_PORTARIA_INTERMINISTERIAL_N_510_DE_9_DE_JULHO_DE_2012.aspx>.

BRATTI, T. Caracterização comportamental, bioquímica e farmacológica e efeito da natação sobre o modelo experimental da síndrome da dor complexa regional tipo I em camundongos. Dissertação (Mestrado em Neurociências) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

BROWN, SD; NATIVO, P .; SMITH, J.-A .; STIRLING, D .; EDWARDS, PR; VENUGOPAL, B .; FLINT, DJ; PLUMB, JA; GRAHAM, D .; Wheate, NJJ. Am. Chem.Soc, 2010,132, 4678-4684.

CANCINO, J.; MARANGONI, V.; ZUCOLOTTO, V. Nanotecnologia em medicina: aspectos fundamentais e principais preocupações. Química Nova, v. 37, n. 3, p. 521-526, 2014. Disponível em https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422014000300022. Acesso em: 12 dez. 2020. Doi 10.5935/0100-4042.20140086.

CARACENI, P.; DOMENICALI, M.; VENDEMIALE, G.; GRATTAGLIANO, I.; PERTOSA, A.; NARDO, B. et al. The reduced tolerance of rat fatty liver to ischemia reperfusion is associated with mitochondrial oxidative injury. J Surg Res. 2005;124(2):160-8

CASTRO LOPEZ, J. M. Fisiopatologia da dor. Lisboa: Permanyer Portugal, 2003. 36p. DYSON, D. H. Analgesia and chemical restraint for the emergent veterinary patient. Vet. Clin. Small Anim., v. 38, p. 1329-1352, 2008.

CERCHIARO & HONÓRIO. Pathophysiologic relationships between oxidative stress and atherosclerosis. Quím. Nova vol.34 no.2 São Paulo, 2011.

CHEN, H; DORRIGAN, A; SAAD, S; HARE, D. J; CORTIE, M. B; VALENZUELA, S. M. In vivo study of spherical gold nanoparticles: inflammatory effects and distribution in mice. PLoSOne. 2013; 8(2): e58208.

CHIES, A.B.; CORRÊA, F.M.; DE ANDRADE, C.R.; ROSA-E-SILVA, A.A.; PEREIRA, F.C.; DE OLIVEIRA, A.M. Vascular non-endothelial nitric oxide induced by swimming exercise stress in rats. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2003;30(12):951-7.

CODERRE, T. J. et al. Chronic post-ischemia pain (CPIP): a novel animal model of complex regional pain syndrome-Type I (CRPS-I; reflex sympathetic dystrophy)

produced by prolonged hindpaw ischemia and reperfusion in the rat. Pain, v. 112, p. 94-105. 2004.

COLLOCA, L, et al. Neuropathic pain. Nat Rev Dis Primers. 2017 Feb 16; 3: 17002.

CONKLIM et al. Am J Physiol Heart Circ Physiol 316: H889–H899, 2019.

CORDON, F. C. O; LINO LEMONICA, T. S. A. Síndrome Dolorosa Complexa Regional: Epidemiologia, Fisiopatologia, Manifestações Clínicas
COTINGUIBA, G. G, et al. Método de Avaliação da Defesa Antioxidante: Uma Revisão de Literatura. UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde 2013;15(3):231-7

COURA, M. F. *et al*. Como obter nanopartículas de ouro usando suco de limão? Química Nova, v. 41, n. 5, p. 533-539, 2018.Disponível em https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010040422018000500533&lang=pt em Acesso em: 28 nov. 2020. Doi 10.21577/0100-4042.20170202.

DALLE-DONNE et al. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. Clinica Chimica Acta 329(1-2):23-38. April 2003.

DAS et al. Review on gold nanoparticles and their applications. Toxicology and Environmental Health Sciences volume 3, pages193–205(2011)

DE PRÁ, S. D. T. Participação do receptor de potencial transitório anquirina 1 (TRPA1) no desenvolvimento e manutenção das fases aguda e crônica da nocicepção induzida por isquemia/reperfusão em camundongos. Tese (Ciências da Saúde) - Universidade Do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 2017.

DEUIS,J. R et al. Methods Used to Evaluate Pain Behaviors in Rodents. Front. Mol. Neurosci. 10:284. doi: 10.3389/fnmol.2017.00284, 2017.

DIXON, W. J. Efficient analysis of experimental observations. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 1980; 20:441–62.

DRUMMOND, P. D. Sensory disturbances in complex regional pain syndrome: clinical observations, autonomic interactions, and possible mechanisms. Pain Med, 11 (2010), pp. 1257-1266.

ELY, L. S. ENGROFF, P.; GUISELLI, S. R.; CARDOSO, G. C.; MORRONE, F. B.; CARLI, G. A. Uso de anti-inflamatórios e analgésicos por uma população de idosos atendida na Estratégia Saúde da Família. Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia, v. 18, n. 3, p. 475-485, 2015. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S180998232015000300475&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 23 set. 2020. Doi: 10.1590/1809-9823.2015.14141.

ENGERS, V. K.; BEHLING, C. S.; FRIZZO, M. N. A influência do estresse oxidativo no processo de envelhecimento celular. Revista Contexto e Saúde, v. 10, n. 20, p. 93–102, 2011.

FELIU, M.H.; EDWARDS, C.L. Psychologic factors in the development of complex regional pain syndrome: History, myth, and evidence. Clin J Pain. v.26: 258–63. 2010.

FERREIRA, J. C. P. Investigação das atividades anti-inflamatória e antiproliferativa de nanopartículas de ouro. Universidade Federal do Paraná; Trabalho de conclusão de curso em Biomedicina;. 2017.

FONDEVILA, C; BUSUTTIL, R. W. & KUPIEC-WEGLINSKI; J.W. 2003. Hepatic ische-mia/reperfusion injury-a fresh look. Exp. Molecul. Pathol. 74(2):86-93.

FRIJHOFF J, P. Clinical relevance of biomarkers of oxidative stress. Antioxidants & Redox Signaling, v. 23, n. 14, p. 1144-1170, 2015. Doi: 10.1089/ars.2015.6317.

GIERTHMUHLEN, J.; BINDER, A.; BARON, R. Mechanism-based treatment in complex regional pain syndromes. Nature Reviews Neurology, v. 10, p. 518-528, 2014.

GIORGI et al. Is TRPA1 Burning Down TRPV1 as Druggable Target for the Treatment of Chronic Pain? Int. J. Mol. Sci. 2019, 20(12), 2906; https://doi.org/10.3390/ijms20122906.

GUPTA, R. et al. Structural basis of TRPA1 inhibition by HC-030031 utilizing species-specific diferences. Sci. Rep. 6, 37460; doi: 10.1038/srep37460 (2016).

HUANG, D .; Liao, F.; MOLESA, S .; REDINGER, D .; SUBRAMANIAN, V. Journal of the Electrochemical Society , 2003 , 150 , G412-417.

IGHODARO, O. M; AKINLOYE, O. A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. Alexandria Journal of Medicine, Volume 54, 2018 - Issue 4

JACOB, K. D., Noren Hooten, N., Trzeciak, A. R., & Evans, M. K. (2013). Markers of oxidant stress that are clinically relevant in aging and age-related disease. Mechanisms of ageing and development, 134(3-4), 139–157. https://doi.org/10.1016/j.mad.2013.02.008

JARDÍN, I, et al. TRPs in Pain Sensation. Frontiers in Physiology. June 2017 | Volume 8 | Article 392.

KATZ, E. e Willner, I. (2004), Integrated Nanoparticle – Biomolecule Hybrid Systems: Synthesis, Properties, and Applications. Angewandte Chemie International Edition, 43: 6042-6108.

KAZANOWSKI, M. K; LACCETTI, M.S. Dor: fundamentos, abordagem clínica, tratamento. Rio de Janeiro (RJ): Guanabara Koogan. 2005.
Keshari et al. Oxidative Stress: A Review. The International Journal Of Science & Technoledge . Vol 3 Issue 7, July 2015.

KIRKHAM, P, RAHANB, I.; BISWAS, S. K.;. A. Regulation Of Inflammation And Redox Signaling By Dietary Polyphenols. Biochem Pharmacol., v.72, n.11, p.1439-1452, 2006.

KLAFKE, J. Z; DA SILVA, M. A; ROSSATO, M. F; DE PRÁ, S. D. T; RIGO, F. K; WALKER, C. I. B, et al. Acute and chronic nociceptive phases observed in a rat hind paw ischemia/reperfusion model depend on different mechanisms. Pflügers Arch - Eur J Physiol. 2016; 21;468(2):229–41.

KLAUMANN, P. R, et al. PATOFISIOLOGIA DA DOR. Archives of Veterinary Science, v. 13, n.1, p.1-12, 2008.

KOIVISTO, A. et al. TRPA1 Antagonists for Pain Relief. Pharmaceuticals 2018, 11, 117;

LAU, F.H. & CHUNG, K.C. Silas Weir Mitchell, MD: The physician who discovered causalgia. J Hand Surg. v.29: p.181–187. 2004.

LEAL, P. C; SAKATA, R. K. Métodos para a avaliação da hiperalgesia induzida por opioides no período perioperatório. Rev. dor vol.15 no.4 São Paulo Oct./Dec. 2014.

LEITE, Leni Everson de Araújo; RESENDE,Thaís de Lima; NOGUEIRA, Guilherme Marcos; CRUZ; Ivana Beatrice Mânica da; SCHNEIDER, Rodolfo Herberto; GOTLIEB, Maria Gabriela Valle. Envelhecimento, Estresse Oxidativo e Sarcopenia: uma abordagem sistêmica. Rev. Bras. Geriatr. Gerontol. Rio de JaneiRo, Vol. 15 Nº 2 - 2012, p. 365-380.

LEVINE, R. L. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. Free Radical Biology and Medicine

LIANGOS, O; DOMHAN, S; SCHWAGER, C; ZEIER, M; HUBER, P. E; ADDABBO, F; GOLIGORSKY, M. S; HLATKY, L; JABER, B. L; ABDOLLAHI, A. Whole blood transcriptomics in cardiac surgery identifies a gene regulatory network connecting ischemia reperfusion with systemic inflammation. PLoS ONE. 2010;5:e13658.

LOURAL, C. A. Um panorama de novas tecnologias e seus impactos na indústria, Unicamp: Campinas, 2014.

LOWRY, O. H; ROSEBROUGH, N. J; FARR, A. L; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 1951; 193: 265–275.

MALISKA, A. M. Microscopia eletrônica de varredura. 2011. Disponível em: http://www.materiais.ufsc.br/lcm/web- MEV/MEV_index.htm. Acesso em: 13 fev. 2014.

MALTA, D. C. Avaliação da função renal na população adulta brasileira, segundo critérios laboratoriais da Pesquisa Nacional de Saúde. Revista Brasileira de Epidemiologia, v. 22, supl. 2, E190010.SUPL.2, 2019. Disponível em http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415790X2019000300407&lng=en&nrm=iso. Acesso em 02 fev. 2020. Doi 10.1590/1980-549720190010.supl.2.

MALVERN. Zeta size nano series: User manual. Malvern Instruments Ltd. 2004.

MANNHEIMER, W. A. Microscopia dos materiais – uma introdução. São Paulo: Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise. 126 p. 2002.

MARKLUND, S. Pyrogallol autooxidation. Handbook of Methods for Oxygen Radical Research. Greenwald, Press boca raton: 1985; p. 243-247.

MARTELLI, A; ZAVARIZE, S. F. Vias Nociceptivas da Dor e seus Impactos nas Atividades da Vida Diária. UNICIÊNCIAS, v. 17, n. 1, p. 47-51, Dez. 2013.
MARTINEZ, J. E; MACEDO, A. C; PINHEIRO, D. F. C. Perfil clínico e demográfico dos pacientes com dor músculo-esquelética crônica acompanhados nos três níveis de atendimento de saúde de Sorocaba. Acta Fisiatrica. 2004;11:67-71.

MELO JR, M. A. *et al.* Preparação de nanopartículas de prata e ouro: um método simples para a introdução da nanociência em laboratório de ensino. Química Nova, v. 35, n. 9, p. 1872-1878, 2012. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422012000900030. Acesso em: 20 nov. 2020. Doi 10.1590/S0100-40422012000900030.

MIGUEL, M. P; et al. Fisiopatologia do estresse oxidativo após isquemia e reperfusão cerebral e potencial neuroproteção do pequi (caryocar brasiliense). Enciclopédia biosfera, Centro Científico Conhecer, Goiânia, v.8, n.15; p. 1960, 2012.

MILLECAMPS, M. et al. Role of peripheral endothelin receptors in an animal model of complex regional pain syndrome type 1 (CRPS-I). Pain, v.151, n. 1, p. 174-183. 2010.

MIYAMOTO T, Dubin AE, Petrus MJ, Patapoutian A. TRPV1 and TRPA1 mediate peripheral nitric oxide-induced nociception in mice. PLoS One 4: e7596, 2009. doi:10.1371/journal.pone.0007596

MOFFAT, R; ERA, C. P. Anatomy, physiology and pharmacology of pain. PAIN. volume 12, issue 1, p12-15, january 01, 2011.

MONTALTO, M. C; HART, M. L; JORDAN, J. E; WADA, K; STAHL, G. L. Role for complement in mediating intestinal nitric oxide synthase-2 and superoxide dismutase expression. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2003;285:G197–G206.

MOS, M de, AGJ de Bruijn, FJPM Huygen, et al.The incidence of complex regional pain syndrome: a population-based study. Pain, 129 (2007), pp. 12-20

MUIR III, W. W.; HUBBELL, J. A. E.; SKARDA, R. T.; BEDNARSKI, R. M. Manual de anesthesia veterinária. 3 ed. Porto Alegre:Artmed, 2001. p. 242-249.

NAIDU, K. N; PHAM, T. M. Pain Management. Street J. (eds) Basic Clinical Anesthesia. Springer, New York, NY. 2015.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de bioquímica de lehninger. 6. ed Porto Alegre: Artmed, 2014.
NEUMEISTER, M. W; ROMANELLI, M. R. Complex Regional Pain Syndrome. Neumeister, Síndrome complexa de dor regional. Clínicas em Cirurgia Plástica. doi: 10.1016 / j.cps.2019.12.009 , 2020.

OHKAWA, H; OHISHI, N; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal Biochem. 1979; 95: 351-358.

OLIVEIRA, A. J. E, et al. Aspectos clínicos e experimentais da dor em equinos: revisão de literatura. Science and animal health. V.4 N.2 MAIO/AGO 2016 P. 131-147

OLIVEIRA, M. C. de; SCHOFFEN, J. P. F. Oxidative stress action in cellular aging. Brazilian Archives of Biology and Technology, v. 53, n. 6, p. 1333-1342, 2010.

OLIVEIRA, R. M.; LEITE, A. C. S.; SILVA, L. M. S.; ALMEIDA, P. C.; OLIVEIRA, S. K. P.; CHAVES, A. C. P. Análise comparativa da capacidade funcional entre mulheres com fibromialgia e lombalgia. Revista Dor, v. 14, n. 1, p. 39-43, 2013. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S180600132013000100010&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 23 set. 2020. Doi: 10.1590/S1806-00132013000100010.

PARK et al. Complex regional pain syndrome type II after cervical transforaminal epidural injection. Medicine (Baltimore). 2018 May; 97(20): e10784.

PATAPOUTIAN, A, et al. Transient receptor potential channels: targeting pain at the source. Nat Rev Drug Discov. 2009 January ; 8(1): 55–68.

PENG G, et al. Diagnosing lung cancer in exhaled breath using gold nanoparticles. Nature Nano tech. 2009, 4: 6 69-73.

PERRAULT, SD; Chan, WCW Proc. Nat. Acad. Sci. EUA , 2010 , 107 , 11194-11199.

QUINA, F. H. Nanotecnologia e o meio ambiente: perspectivas e riscos. Quím. Nova vol.27 no.6 São Paulo Nov./Dec. 2004. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422004000600031&script=sci_arttext>, acesso em 10 out. 2019

RAJA, S. N. et al. The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. PAIN: September 2020 - Volume 161 - Issue 9 - p 1976-1982

REZNICK, A. Z, PACKER, L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. Methods Enzymol. 1994; 233: 57-63.

ROCHA, B. C; et al. Modelo experimental de isquemia/reperfusão intestinal por clampeamento de aorta abdominal em ratos Wistar. Rev. Col. Bras. Cir. 2012; 39(3): 207-210.

ROESSNER et al. Oxidative stress in ulcerative colitis-associated carcinogenesis. Pathology - Research and Practice

ROSSATO, M. F; TREVISAN, G; WALKER, C. I. B; KLAFKE, J. Z; DE OLIVEIRA, A. P, VILLARINHO, J. G, et al. Eriodictyol: a flavonoid antagonist of the TRPV1 receptor with antioxidant activity. Biochem Pharmacol. 2011; 15;81(4):544–51.

SAMPAIO, R. C.; MORAES, C. Estresse oxidativo e envelhecimento: papel do exercício físico. Motriz, v. 16, n. 2, p. 506- 515, 2010.

SANTOS, P. C. Nanopartículas: toxicidade biológica. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa. 2015

SASAKI A, Mizoguchi S, Kagaya K, Shiro M, Sakai A, Andoh T, et al. A mouse model of peripheral postischemic dysesthesia: involvement of reperfusion-induced oxidative stress and TRPA1 channel. J Pharmacol Exp Ther. 2014 Dec;351(3):568–75.

SAWADA Y, Hosokawa H, Matsumura K, Kobayashi S. Activation of transient receptor potential ankyrin 1 by hydrogen peroxide. Eur J Neurosci 27: 1131–1142, 2008. doi:10.1111/j.1460-9568.2008.06093.

SETHNA NF, Meier PM, Zurakowski D, Berde CB. Cutaneous sensory abnormalities in children and adolescents with complex regional pain syndromes. Pain. 2007;131(1-2):153-161. doi:10.1016/j.pain.2006.12.028.

SHAMI, N. J. I. E; MOREIRA, E. A. M. Licopeno como agente antioxidante. Rev. Nutr. [conectados]. 2004, vol.17, n.2, pp.227-236. ISSN 1678-9865

SILVA Jr, O. C.; CENTURION, S.; PACHECO, E. G.; BRISOTTI, J. L.; OLIVEIRA, A. F.; SASSO, K. D. Aspectos básicos da lesão de isquemia e reperfusão e do précondicionamento isquêmico. Acta Cirurgica Brasileira, São Paulo, v. 17, suppl. c3, p.96-100, 2002.

SILVA, C. T; JASIULIONIS, M. G. Relação entre estresse oxidativo, alterações epigenéticas e câncer. Cienc. Cult. vol.66 no.1 São Paulo 2014

SILVA, M. A.; FIGUEIRA, P. J.; SILVA, V. B.; BOAVENTURA, S. B.; MARQUES, E.; BRANCO, P. S. Síndrome dolorosa regional complexa do tipo I: da prevenção ao tratamento. Revista Portuguesa de Ortopedia e Traumatologia, v. 26, n. 1, p. 30-42, 2018. Disponível em <http://www.scielo.mec.pt/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1646212220180001000004&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em 24 set. 2020.

SILVA, W. J. M.; FERRARI, C. K. B. Metabolismo mitocondrial, radicais livres e envelhecimento. Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia, v. 14, n. 3, p. 441–451, 2011.

SO K, Tei Y, Zhao M, Miyake T, Hiyama H, Shirakawa H, et al. Hypoxia-induced sensitisation of TRPA1 in painful dysesthesia evoked by transient hindlimb ischemia/reperfusion in mice. Sci Rep. 2016;6:23261.

SOARES, Elaine dos R. et al. Compostos bioativos em alimentos, estresse oxidativo e inflamação: uma visão molecular da nutrição. Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto, v. 14, n. 3, 2015.

SODRE, F. L.; COSTA, J. C. B.; LIMA, J. C. C. Avaliação da função e da lesão renal: um desafio laboratorial. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, v. 43, n. 5, p. 329-337, 2007. Disponível em http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S167624442007000500005&lng=en&nrm=iso. Acesso em 02 fev. 2021. Doi 10.1590/S1676-24442007000500005.

STANTON-HICKS M, Jänig W, Hassenbusch S,et al.:Reflex sympathetic dystrophy: changing concepts and taxonomy.Pain 1995,63:127–133.

STUCHINSKAYA, T .; MORENO, M .; COOK, MJ; EDWARDS, DR; RUSSELL, D. A. Photochem. Photobiol. Sci. , 2011 , 10 , 822-831

SUCIU, A. *et al*. Transminases: oldies but goldies. Minerva Gastroenterologica e Dietologica, v. 66, n. 3, p. 246-251, 2020. Disponível em https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31994373/. Acesso em: 20 nov. 2020. Doi 10.1590/S0102-865020150040000007.

TANG, C. et al. Sex diferences in complex regional pain syndrome type – I (CRPS-I) in mice. J. Pain Res, v. 10, p. 1811-19. 2017.

TEIXEIRA J., FEIO M., FIGUEIRA M.L. O Papel do Stress Oxidativo no Envelhecimento e na Demência. Revista do Serviço de Psiquiatria do Hospital Professor Doutor Fernando Fonseca, EPE, vol. 12, nº 1, pg. 1-15, 2014.

TELLI, E. M. R. P.; FRIGERI, M.; MELLO, S. R. Avaliação da atividade de enzimas hepáticas em dependentes, ex-dependentes e não usuários do etanol. Revista Brasileira de Análises Clínicas, v. 40, n. 2, p. 15-22, 2016. Disponível em http://www.rbac.org.br/artigos/avaliacao-da-atividade-de-enzimas-hepaticas-em-dependentes-ex-dependentes-e-nao-usuarios-do-etanol-48n-3/. Acesso em 20 jan. 2021.

TORTORA, G.J.; DERRICKSON, B. Princípios de anatomia e fisiologia. 14ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2016

TRACEY, W. D. Nociception. Current Biology 27, R123–R138, February 20, 2017.

TREVISAN, G. et al. Transient Receptor Potential Ankyrin 1 Receptor Stimulation by Hydrogen Peroxide Is Critical to Trigger Pain During Monosodium Urate-Induced Inflammation in Rodents. Arthritis Rheum. 2013a Nov;65(11):2984–95.

TREVISAN, G; ROSSATO, M. F; WALKER, C. I. B; KLAFKE, J. Z; ROSA, F; OLIVEIRA, S. M, et al. Identification of the plant steroid α-spinasterol as a novel transient receptor potential vanilloid 1 antagonist with antinociceptive properties. J Pharmacol Exp Ther. 2012; 343(2):258–69.

TURKEVICH, J; STEVENSON, P. C; HILLIER, J. “A Study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold”, Discussions of the Faraday Society, Vol. 11, 1951, pp. 55-75.

UMA LIMA; HASHIM, U .; MUSTAFA, S .; CHE MAN, YB; ISLÃ, Kh. N. Journal of Nanomaterials 2012 , 2012 , Artigo ID 103607

VAN DIJK, P. R.; PASCH, A.; VAN OCKENBURG-BRUNET, S. L.; WAANDERS, F.; ABDULLE, A. E.; MUIS, M. J.; HILLEBRANDS, J. L.; BILO, H. J. G.; VAN GOOR, H. Thiols as markers of redox status in type 1 diabetes mellitus. Therapeutic Advances in Endocrinology and Metabolism, v. 6, n. 47, p. 3246-3251, 2020. Doi: 10.1177/2042018820903641.

VASCONCELOS, S. M. L, et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. Quím. Nova vol.30 no.5 São Paulo Sept./Oct. 2007.

VASCONCELOS, T. B, et al. Radicais Livres e Antioxidantes: Proteção ou Perigo? UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde 2014;16(3):213-9.

VELDMAN, P.H.; REYNEN, H.M.; ARNTZ, I.E.; GORIS, R.J. Signs and symptoms of reflex sympathetic dystrophy: prospective study of 829 patients. Lancet. v.342: 1012–6. 1993.

VIANA, F. TRPA1 channels: molecular sentinels of cellular stress and tissue damage. J Physiol 594.15 (2016) pp 4151–4169.

VICTOR, E. G; et al. Pulsed ultrasound associated with gold nanoparticle gel reduces oxidative stress parameters and expression of pro-inflammatory molecules in an animal model of muscle injury. J Nanobiotechnology. 2012; 12;10:11.

VIEIRA, F. C. S. Toxicidade de Hidrocarbonetos Monoaromáticos do petróleo sobre metamysidopsis elongata atlântica (Crustácea: Mysidacea). Dissertação de mestrado do Programa de Pós Graduação em Engenharia Ambiental - Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Florianópolis, 2004.

VITOR, A. O, et al. Psicofisiologia da dor: uma revisão bibliográfica. RECIIS – R. Eletr. de Com. Inf. Inov. Saúde. Rio de Janeiro, v.2, n.1, p.87-96, jan.-jun., 2008.Volume 204, Issue 7, 25 July 2008,

WADA, K; MONTALTO, M. C; STAHL, G. L. Inhibition of complement C5 reduces local and remote organ injury after intestinal ischemia/reperfusion in the rat. Gastroenterology. 2001;120:126–133.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. Methods Enzymol. 1981; 77: 325-33.

WILLIAMS, D. B., CARTER C. B. Transmission Electron Microscopy. A Text Book for Materials Science, Springer. 2 ed. New York, 2009.
WOOLF CJ. What is this thing called pain? J Clin Invest. 2010 Nov 1;120(11):3742–4.

YAMAKI, V. N et al. Efeito protetor do per-condicionamento isquêmico remoto nas lesões da síndrome de isquemia e reperfusão renal em ratos. Rev. Col. Bras. Cir. 2012; 39(6): 529-533

YAMAKI, V. N.; GONÇALVES, T. B.; COELHO, J. V. B.; PONTES, R. V. S.; COSTA, F. L. S.; BRITO, M. V. H.; Efeito Protetor Do Per-condicionamento Isquêmico Remoto Nas Lesões Da Síndrome De Isquemia E Reperfusão Renal Em Ratos; Rev. Col. Bras. Cir., 529- 533, 2012.

YAO, Y. *et al.* The toxicity of metallic nanoparticles on liver: the subcellular damages, mechanisms and outcomes. International Journal of Nanomedicine, v. 14, p. 8787-8804, 2019. Disponível em https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6844216. Acesso em 03 fev. 2020. Doi 10.2147/IJN.S212907.

ZANG et al. Ischemia Reperfusion Injury: Opportunities for Nanoparticles. ACS Biomater. Sci. Eng. 2020, 6, 12, 6528–6539 Eng.

ZARBIN, A. J. G. Química de (nano)materiais. Química Nova, São Paulo, v. 30, n. 6, p. 1469-1479, 2007.

ANEXO 1

FUNDAÇÃO EDUCACIONAL DA REGIÃO DE JOINVILLE - FURJ
UNIVERSIDADE DA REGIÃO DE JOINVILLE

UNIVILLE
UNIVERSIDADE

Joinville, 19 de dezembro de 2018

OFÍCIO N° 014/2018 – PRPPG/Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais

Para: Pesquisadora Daniela Delwig de Lima
Projeto de Dissertação vinculado ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente.

Assunto: Parecer do Processo 004/1118

O projeto de pesquisa intitulado "**Efeito das nanopartículas de ouro na dor neuropática observada em um modelo de síndrome da dor complexa regional**", de sua responsabilidade, foi considerado **APROVADO** de acordo com o Parecer Consubstanciado emitido em 18/12/2018, em anexo.

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais – UNIVILLE, de acordo com as atribuições definidas na Lei 11.794, de 08 de outubro de 2008 e Resolução 16/17 CONSUM/Univille e demais normas, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa CEUA n° 004/1118, protocolado em 22/11/2018.

Atenciosamente,

Profª. Márcia Luciane Lange Silveira
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais da Univille

Campus Joinville
Rua Fabio Malschitzky, nº 10 - Zona Industrial
CEP: 89219-710 - Joinville/SC
Fone: (47) 3461-9000 - Fax: (47) 3473-0131
www.univille.br

Unidade Centro - Joinville
Rua Ministro Calogeras, 437 - Centro
CEP 89202-207 - Joinville/SC
Fone: (47) 3422-3021

Unidade São Francisco do Sul
Rodovia Duque de Caxias Km 8 Poste 128 - Iperoba
CEP: 89.240-000 - São Francisco do Sul/SC
Telefone: (47) 3442-2577

Campus São Bento do Sul
R. Norberto Eduardo Weihermann, 230 - Colonial
Caixa Postal 41 - CEP: 89290-000 - São Bento do Sul/SC
Telefone: (47) 3631-9100

AUTORIZAÇÃO

Nome do autor: **Alessandra Betina Gastaldi**

RG: **4.504.647**

Título da Dissertação: **Efeito das nanopartículas de ouro na dor neuropática observada em um modelo de síndrome da dor complexa regional.**

Autorizo a Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE, através da Biblioteca Universitária, disponibilizar cópias da dissertação de minha autoria.

Joinville, 23 de junho de 2021.

Alessandra Betina Gastaldi

Assinatura do aluno